

Dominguezia

Museo de Farmacobotánica
"Juan A. Domínguez"

Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires



Ipomea purpurea (L.) Roth. (Convolvulaceae)

Dominguezia

Vol. 34(2) - 2018

Director Responsable:

Dr. Marcelo Luis Wagner

Comisión Redactora:

Dr. Arnaldo L. Bandoni
Dr. Alberto A. Gurni
Dr. Marcelo L. Wagner

Comisión Científica Asesora:

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 Cañigüeral Folcará (Universidad de Barcelona, España)
Dr. Eduardo Dellacassa Beltrame (Universidad de la República, Uruguay)
Dra. Martha Gattuso (Universidad Nacional de Rosario, Argentina)
Dr. Héctor Alejandro Keller (Universidad Nacional del Nordeste, Argentina)
Dr. José Luis López (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Dr. José María Prieto-García (University of London, Gran Bretaña)
Dr. Lionel G. Robineau (Universidad de las Antillas y de la Guyana)
Dr. Carlos Taira (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Dra. E. C. Villaamil (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Comisión Científica Honoraria:

Dr. Ramón A. de Torres (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Dra. Marta Nájera (Universidad Nacional de La Plata, Argentina)
Dr. Otmaro Rosés (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Dra. María L. Tomaro (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Dra. Etilé Spegazzini (Universidad Nacional de La Plata, Argentina)

Editores Científicos:

Dr. José María Prieto-García
Dra. Catalina M. van Baren
Dr. Rafael A. Ricco
Dra. Graciela B. Bassols
Dra. Cecilia Dobrecky

Secretaría, Edición electrónica y Webmaster:

Fernando Gabriel Ranea

Edición 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:
***Ipomea purpurea* (L.) Roth. (Convolvulaceae)**

Lámina realizada por Milly Acharya (2008)
American Society of Botanical Artist

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 CABI, LIS; UBL, Electronic Sites of Leading Botany, Plant Biology and Science Journals.
Providing links to the world's electronic journals.

Registro de la Propiedad Intelectual N.º 5353064.

Se terminó de editar en diciembre de 2018.

Índice de contenido

Las recetas de <i>El Libro de las Medicinas</i> (siríaco) y las que figuran en la literatura farmacéutica árabe: una comparación	5
Daniel Asade	
Morfoanatomía foliar para el reconocimiento de especies de Asteraceae conocidas como “contrayerba” en la herboristería argentina	15
Victoria A. Diaz Avalos, Fernanda P. Ravachine, Hernán G. Bach, Marcelo L. Wagner, Beatriz G. Varela	
Estudio farmacobotánico de <i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth (Convolvulaceae)	21
María A. Monsalvo, Renée H. Fortunato, Marcelo L. Wagner, Rafael A. Ricco	
Estudio químico de <i>Baccharis punctulata</i>	31
María Dolores González, Celia María Luis	
Compuestos antifúngicos en <i>Prosopis ruscifolia</i>: identificación y análisis de su utilidad en el control de especies toxigénicas de <i>Aspergillus</i>	37
Analia de los Ángeles Gómez, Diego Alejandro Sampietro, Tsvetelina Mandova, Raphael Grougnet, Marina Kritsanida, Marta Vattuone	
Perspectiva del uso de aceites esenciales del género Citrus para el manejo de isópodos plaga en siembra directa	47
Lilian R. Descamps, Carolina Sánchez Chopa	
Influencia de reguladores de crecimiento sobre el establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de <i>Salvia hispanica</i> L. (“chía”) y sobre su contenido de ácidos grasos	53
Martín Bari, Patricia Marconi, María Cristina López, María Alejandra Álvarez	

Index

<i>The Book of Medicines (Syriac) and the Recipes in Arabic Pharmaceutical Literature: a comparison</i>	5
Daniel Asade	
Foliar Morphoanatomy for the Recognition of Asteraceae Species Known as “Contrayerba” in Argentine Herbalism	15
Victoria A. Diaz Avalos, Fernanda P. Ravachine, Hernán G. Bach, Marcelo L. Wagner, Beatriz G. Varela	
Pharmacobotanical Study of <i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth (Convolvulaceae)	21
María A. Monsalvo, Renée H. Fortunato, Marcelo L. Wagner, Rafael A. Ricco	
Chemical Study of <i>Baccharis punctulata</i>	31
María Dolores González, Celia María Luis	
Antifungal Compounds in <i>Prosopis rusCIFolia</i>: Analysis and Identification of its Use to Control Toxigenic Species of <i>Aspergillus</i>	37
Analía de los Ángeles Gómez, Diego Alejandro Sampietro, Tsvetelina Mandova, Raphael Grougnet, Marina Kritsanida, Marta Vattuone	
Potential of Citrus Essential Oils for Isopods Pest Control under No-Tillage Systems	47
Lilian R. Descamps, Carolina Sánchez Chopa	
Influence of Plant Growth Regulators on the Establishment of <i>in vitro</i> Cultures of <i>Salvia hispanica</i> L. (“chía”) and on its Fatty Acid Content	53
Martín Bari, Patricia Marconi, María Cristina López, María Alejandra Álvarez	

Las recetas de *El Libro de las Medicinas* (siríaco) y las que figuran en la literatura farmacéutica árabe: una comparación

Daniel Asade

Museo de Farmacobotánica “Juan Aníbal Domínguez”, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956 1° piso (1113) Buenos Aires, República Argentina.

Autor a quién dirigir la correspondencia: danielasade@hotmail.com

Compendio de tesis

Lugar y fecha de aprobación de la tesis:

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. 21 de diciembre de 2017.

Resumen

Este trabajo es un fragmento de la tesis de doctorado “La literatura farmacéutica siríaca y árabe. Comparación de las recetas de El libro de las medicinas (siríaco) con recetas en la literatura farmacéutica árabe”. Se identifica los paralelos literarios existentes en el medicamento *Hiera de Galeno* (en cuanto al nombre propio, indicaciones clínicas, composición cuali-cuantitativa, posología y vía de administración, farmacotecnia, conservación y referencias citadas) de un texto árabe medieval de Avicena (Ibn Sina), y los del texto siríaco-arameo de un manuscrito medieval editado por Ernest A. Wallis Budge (1913), llamado *El Libro de las medicinas*. Además, indaga su origen en la medicina clásica de lengua griega. Este medicamento ha sido identificado por su taxonomía constitutiva y, mediante el análisis filológico de sus simples, demostramos en varios casos los préstamos del siríaco al árabe, o al menos su nombre vulgar anterior al período árabe islámico; de modo que, sumado a los paralelos literarios mencionados anteriormente, nos permitió demostrar que los cristianos de lengua siríaca-aramea fueron, al menos en los casos considerados, traductores de la medicina clásica más tempranos que los árabes musulmanes, como sostienen los académicos en estudios siríacos, bizantinos y árabes; y los especialistas en la Historia de la Ciencia.

The *Book of Medicines* (Syriac) and the Recipes in Arabic Pharmaceutical Literature: a Comparison

Summary

This compendium of doctoral thesis identifies the literary existing parallels between the *Hiera of Galen* medicine (in their proper name, clinical indication, pharmaceuticals, conservation and references mentioned) of a medieval Arabic text of Avicenna, and the Syriac-Aramaic text of a medieval manuscript edited by Ernest A. Wallis Budge (1913), called *The Book of Medicines*. Investigation also goes into the origin of the classic medicine in Greek. All drugs were identified by their constitutive taxonomy. Through the philological analysis of simple drugs, the loan from the Syriac to Arabic was proven in several cases, or at least its common use

Palabras clave: medicina islámica medieval - farmacia árabe - farmacia siríaca - *Libro de las medicinas* - tradición clásica - *Hiera de Galeno*.

Key words: medieval islamic medicine - arabic pharmacy - syriac pharmacy - *The Book of Medicines* - classical tradition - *Hiera of Galen*.

name previous to the Arabic-Islamic period; therefore, adding the literary parallelism previously mentioned, we were able to demonstrate that Christians of the Syriac-Aramaic tongue were, at least in the considered cases, were earlier translators of classic medicine than the Arabic-Muslims, as indicated by academics in Syriac, Byzantine and Arab Studies, as well as specialists in History of Science.

Introducción

En territorio bizantino y persa sasánida (Figura 1) surgió un movimiento intelectual en lengua siríaca¹-cristianos orientales-, y más tarde, con el arribo del Islam (Figuras 2 y 3), en árabe -musulmanes y cristianos orientales- que rescató parte del conocimiento griego (Lindberg, 2002). Luego, las traducciones del árabe al latín permitieron que en el siglo XIII se completase en Occidente lo que no llegó a realizarse durante la Edad Media inicial (Lindberg, 2002), y que, de no haber sido recogidos, se hubiesen perdido para siempre (Brock, 2006).

La literatura siríaca y árabe contiene un importante cuerpo de textos farmacéuticos. Este es el material considerado en la tesis de doctorado (“La literatura farmacéutica siríaca y árabe. Comparación de las recetas de El libro de las medicinas (siríaco) con recetas en la literatura farmacéutica árabe”) de la cual el presente trabajo es un resumen extendido. Muchos desconocen que varias obras griegas no llegaron del mundo griego al árabe, sino que fueron primero vertidas a la lengua siríaca. Éste es el problema estudiado en esta tesis, ejemplificado en este artículo con la *Hiera de Galeno*; que pone de relieve los paralelos literarios hallados entre la terapéutica en lengua siríaca y árabe, de modo de explorar cómo aquella lengua fue un intermediario necesario del original griego, en la transmisión del depósito científico-cultural helénico, que terminó traducido al árabe.

1. El siríaco es un dialecto del arameo, hablado por los cristianos del Medio Oriente antes del arribo del Islam. La Edad de Oro de la literatura siríaca comprendió los siglos III-VIII d.C. Luego, a partir del siglo IX, toda la literatura comienza a traducirse al árabe, que pasa a ser la lengua oficial del Islam. A partir de entonces, los cristianos de lengua siríaca comienzan a reemplazar su lengua por el árabe; no obstante, ciertos núcleos rurales conservaron su lengua siríaca de forma coloquial, inclusive hasta el día de hoy. El árabe pasará a ser el vehículo de las ciencias médicas, filosóficas, matemáticas, entre otras, llegando a Europa hasta finalmente ser traducido al latín (Brockelmann, 1928; Margoliouth, 1927).

Figura 1.- Territorio bizantino y persa sasánida (600 dC)



Mapa tomado de: <https://airfreshener.club/quotes/end-roman-empire-barbarians.html>

Figura 2.- El califato de Abbasid (c. 850 dC)



Mapa basado del *Atlas of World History (2007) - Progress of Islam*, tomado de https://en.wikipedia.org/wiki/Abbasid_Caliphate#/media/File:Abbasids850.png

Figura 3.- El califato de Córdoba (c. 1000 dC)



Mapa tomado de https://es.wikipedia.org/wiki/Califato_de_C%C3%B3rdoba#/media/File:Califato_de_C%C3%B3rdoba_-_1000.svg

Objetivos

El objetivo es demostrar que el conocimiento “rescatado” por los árabes en muchas ocasiones fue un trabajo comenzado por los cristianos siríacos, que muchos textos terapéuticos árabes medievales, además de haber sido traducidos a partir de textos griegos, también lo fueron mediante la lengua siríaca.

Literatura farmacéutica medieval en lengua siríaca y árabe estudiada en este artículo

En lengua siríaca:

• Budge, E.A.W. (1913), *Syrian Anatomy, Pathology and Therapeutics: Syriac text: or “The Book of Medicines”: the Syriac text, edited from a rare manuscript, with an English translation, etc.*, vols. I y II, Oxford University Press, Londres.

En lengua árabe²:

• Ibn Sina (1593), *Kitab al Qanoun fi Al Toubb (The Book of the Canon of Medicine)*, The Medical Press, Roma. Publicado por la Biblioteca Médica Saab de la Universidad Americana de Beirut. Disponible en <http://ddc.aub.edu.lb/projects/saab/avicenna/contents-eng.htm>

Criterios de selección de textos

Hemos localizado textos árabes de diversos autores y de diferentes lugares y períodos históricos. A continuación, y con el fin de seleccionar las recetas a comparar, se cotejaron las ediciones en inglés del *Libro de las medicinas* siríaco y de los textos árabes. A partir de acá y a fin de comparar los medicamentos de cada receta, se trabajó con los originales editados en siríaco y árabe.

Se compararon dieciséis recetas siríacas del *Libro de las medicinas* con recetas análogas en textos árabes y, en todos los casos en que fue posible, también con textos griegos, egipcios y mesopotámicos. También se analizó el término utilizado para cada uno de los simples, para poder determinar si el término árabe proviene del siríaco (mediante el estudio de los préstamos

o *loanwords*), o si, por lo menos, se trata de un término de utilización tardío respecto de este último.

Al final de la comparación de cada receta se discutió qué relación tienen las recetas árabes con la siríaca del *Libro de las medicinas*, y qué relación tienen ambas con la griega, egipcia o mesopotámica en caso de que existiese. Estas discusiones parciales fueron elaboradas en una discusión general.

Resultados

Prescripciones médicas siríacas y árabes

La *Hiera de Galeno*, u otras de las dieciséis recetas siríacas estudiadas del *Libro de las medicinas* descritas en la tesis, muestran paralelos literarios (en cuanto al nombre propio, indicaciones clínicas, composición cuali-cuantitativa, posología y vía de administración, farmacotecnia, conservación y referencias citadas) con recetas de diversos autores árabes de regiones y períodos diferentes; así como también con recetas clásicas en latín y griego. Algunos casos, pueden remontarse a prescripciones médicas egipcias o mesopotámicas.

El resultado y la discusión de cada una de las recetas podrán observarse en el núcleo de la tesis; también una discusión general que demuestra que todas las recetas siríacas provienen de fuentes clásicas, y que el siríaco ha sido utilizado como intermediario entre el griego y el árabe. A continuación, se exponen solamente una de ellas: la *Hiera de Galeno*³.

Textos

Texto siríaco (Tabla 1).

La *Hiera de Galeno*⁴, Anónimo (Budge, 1913: 24a).

La *Hiera de Galeno* se utiliza en las enfermedades relacionadas con la disuria y poliuria. Se bebe mezclado con infusión de apio⁵, ásaro⁶, o pastinaca⁷ (Gignoux, 2011).

3. El resto de los medicamentos compuestos también puede consultarse en el texto completo de la tesis de doctorado.

4. Galeno de Pérgamo (129 a. C. - 216 d. C.).

5. ⲁⲓⲱⲛ krps' *Apium graveolens* L. (Apiaceae).

6. ⲁⲓⲱⲛ asrwn. También conocido como Nardo salvaje: *Asarum europaeum* L. (Aristolochiaceae).

7. ⲁⲓⲱⲛ astplyn. *Pastinaca sativa* L. (Apiaceae).

2. La receta *Hiera de Galeno* se halló sólo en el texto árabe de Ibn Sina, de todos los textos árabes estudiados. Tampoco se halló en textos de Egipto ni Mesopotamia.

Tabla 1.- Texto siríaco de la composición y dosis de la *Hiera de Galeno*

Nombre vulgar	Nombre científico	Transliteración	Nombre siríaco	Cantidad
Pulpa de Coloquintida (Pith of colocynth)	<i>Citrullus colocynthis</i> (L.) Schrad. (Cucurbitaceae)	gw' dgnplws	ܘܠܥܘܩܘܢܬܝܢܐ	4 dracmas
Camaedrio (Chamaedrys)	<i>Teucrium chamaedrys</i> L. (Lamiaceae)	km' dr'ws	ܩܘܪܝܢܐ	3 dracmas y 2 dnq'
Cebolla albarrana asada (Roasted sea-onion)	<i>Drimia maritima</i> (L.) Stearn (Asparagaceae)	'sqyl dmtwy'	ܕܪܝܡܝܐ ܡܪܝܬܝܡܐ	3 dracmas y 2 dnq'
Agárico (Agarikon fungus)	<i>Laricifomes officinalis</i> Kotl. et Pouzar (Fomitopsidaceae)	'gryqwn	ܠܪܝܥܝܦܘܡܝܢܐ	3 dracmas y 2 dnq'
Escamonia (Skamonia -convulvus-)	<i>Convolvulus scammonia</i> L. (Convolvulaceae)	sqmwny'	ܟܘܡܘܢܝܐ	3 dracmas y 2 dnq'
Eléboro negro (Black hellebore)	<i>Helleborus niger</i> L. (Ranunculaceae)	hwrby'	ܠܗܠܝܒܘܪܝܢܐ	3 dracmas y 2 dnq'
Hierba mora? o Cantueso? (Strychnus) ¹	<i>Solanum nigrum</i> L. (Solanaceae) ² <i>Lavandula stoechas</i> L. (Lamiaceae) ³	'stwkwdws	ܩܘܪܝܢܐ ܕܥܘܩܘܢܬܝܢܐ	3 dracmas y 2 dnq'
Goma amoniaco (Ammoniac)	<i>Dorema ammoniacum</i> D. Don. (Apiaceae)	'mwnyqwn	ܕܘܪܝܡܐ ܐܡܘܢܝܐܩܘܢܝܐ	3 dracmas y 2 dnq'
Hipérico (Haprikon)	<i>Hypericum perforatum</i> L. (Hypericaceae)	Hwptryqwn	ܠܗܝܦܪܝܩܘܢܝܐ	3 dracmas y 2 dnq'
Flores de tomillo (Flowers of thyme)	<i>Cuscuta epithymum</i> (L.) L. (Convolvulaceae)	'ftymwn	ܟܘܨܩܘܬܐ ܐܦܝܬܝܡܘܡܐ	1,5 dracmas
Zamarrilla (Teucrium polium)	<i>Teucrium polium</i> L. (Lamiaceae)	Pwlywn	ܩܘܪܝܢܐ ܩܘܠܝܘܡܐ	1,5 dracmas
Bedelio (Bdellium)	<i>Commiphora africana</i> (A. Rich.) Endl. (Bursereaceae)	mwql'	ܩܘܡܝܦܘܪܐ ܐܦܪܝܩܝܢܐ	1,5 dracmas
Camapiteos (Chamaepitys azuga)	<i>Ajuga chamaepitys</i> (L.) Schreb. (Lamiaceae)	km' ptws	ܩܘܪܝܢܐ ܩܘܡܝܦܘܪܐ	1,5 dracmas
Aloe (Aloes)	<i>Aloe vera</i> (L.) Brum. f. (Xanthorrhoeaceae)	'lwy	ܐܠܘܐ	1,5 dracmas
Canela (Cassia)	<i>Cinnamomum cassia</i> (L.) J. Presl (Lauraceae)? ⁴	qsy'	ܩܘܨܝܐ	1,5 dracmas
Polipodio (Polypodium)	<i>Polypodium vulgare</i> L. (Polypodiaceae)	Plwpdywn	ܩܘܠܝܩܘܢܝܐ ܩܘܠܝܩܘܢܝܐ	1,5 dracmas
Mirra (Myrrh)	<i>Commiphora myrrha</i> (Nees) Engl. (Bursereaceae)	mwr'	ܩܘܡܝܦܘܪܐ ܡܝܪܪܐ	5 dnq'
Pimienta de los tres tipos ⁵ (Peppers, of the three kinds)	<i>Piper nigrum</i> L. <i>Piper longum</i> L. (Piperaceae)	plpl' tlyhyn	ܩܘܠܝܩܘܢܝܐ ܩܘܠܝܩܘܢܝܐ ܩܘܠܝܩܘܢܝܐ	5 dnq'
Canela china (Cinnamon)	<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl (Lauraceae)	qwnm'	ܩܘܨܝܐ ܩܘܨܝܐ	5 dnq'
Azafran (Crocus)	<i>Crocus sativus</i> L. (Iridaceae)	kwrkm'	ܩܘܪܝܢܐ ܩܘܪܝܢܐ	5 dnq'
Ferula opopanax (Opopanax)	<i>Opopanax chironium</i> W. D. J. Koch (Apiaceae)	'ppnqws	ܩܘܦܘܢܝܩܘܨܝܐ	5 dnq'
Sagapeno (Fennel) ⁶	<i>Ferula persica</i> Willd. ? (Apiaceae) <i>Narthex asafoetida</i> Falc. ex Lindl. H. Karst. ? (Apiaceae)	Sgpnws	ܩܘܦܘܢܝܩܘܨܝܐ	5 dnq'

Tabla 1.- (continúa)

Nombre vulgar	Nombre científico	Transliteración	Nombre siríaco	Cantidad
(Betonica) ⁷	<i>Stachys officinalis</i> (L.) Trevis (Lamiaceae)	Sin texto	Sin texto	5 dnq'
Castóreo (Castoreum)	<i>Castoreum</i> (Castoridae)	qštwrywn	ܩܫܬܘܪܝܘܢ	5 dnq'
Aristolochia (Round aristolachia)	<i>Aristolochia rotunda</i> L. (Aristolochiaceae)	splwl' glyl'	ܣܦܠܘܠ ܓܠܝܠ	5 dnq'
Genciana (Gentian)	<i>Gentiana lutea</i> L. (Gentianaceae)	gntyn'	ܓܢܬܝܢ	5 dnq'
Euforbio (Euphorbium)	<i>Euphorbia resinifera</i> O. Berg. (Euphorbiaceae)	'prbywn	ܦܪܒܝܘܢ	5 dnq'
Perejil (Petroselinum)	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Fuss. (Apiaceae)?	ptr' slynwn	ܦܬܪ ܣܠܝܘܢ	4 dnq'
Miel		dbš'	ܕܒܫܐ	c. s.

1. Con este nombre traduce Budge (1913) al inglés la palabra *ܫܘܪܝܘܢ*.
2. Véase Gignoux (2011) y Margoliouth (1927). Actualmente los taxónomos consideran que puede ser una sinonimia de *S. americanum* Mill.
3. Véase Brockelmann (1928).
4. Cassia podría tratarse de *Cinnamomum cassia*, o bien de *Cassia fistula*. Es una discusión que viene desde antiguo.
5. Sugiero que se trata de pimienta negra, blanca y larga.
6. Budge (1913) sugiere que se trata del hinojo *Foeniculum vulgare* Mill. (Apiaceae).
7. Parece un añadido de Budge en el texto inglés, ya que en el siríaco no aparece nada entre sagapeno y castóreo.

Nota: Beber dos dracmas. Utilizar como la Hiera Lgwdyá.

Texto clásico (Tabla 2).

La *Hiera de Galeno* (Paulus Aegineta: 501).

Esta hiera se encuentra atestiguada en escritos de Paulus Aegineta (Adams, 1844): *Acerca de los antídotos llamados hiera*.

Análisis siríaco-griego (Tabla 3).

Texto árabe (Tabla 4).

Ibn Sina (103) *Capítulo acerca de la fabricación de la Hiera de Galeno, copia de Ibn Sarafíun*⁸ (Ibn Sina, ed. 1593: 198).

Análisis siríaco-árabe (Tabla 5).

8. No detalla las indicaciones terapéuticas. Aquí se analiza la *Hiera de Galeno, copia de Ibn Sarafíun* según el *Canon* de Ibn Sina. Este último también incluye en el canon otras Hieras de Galeno, según copias de otros autores, a saber: *pública*; y otra según *Faulos* (probablemente Paulus Aegineta). Ambas son diferentes a la descrita en siríaco.

Discusión

El esqueleto de la *Hiera de Galeno* que describe Paulus Aegineta se encuentra también en la *Hiera de Galeno* de la receta anónima siríaca.

El texto siríaco deja en evidencia varias adiciones (dado que no se halló un texto clásico igual).

Dichas evidencias se repiten en el texto árabe, donde a su vez existen otras pequeñas adiciones, sustracciones y/o modificaciones.

El estudio sobre los términos árabes utilizados para los medicamentos simples (ver Corpus y metodología), deja en evidencia que en la receta árabe abundan los préstamos del siríaco y las traducciones idiomáticas.

De todo este contexto se desprende que la receta en lengua árabe posiblemente haya tenido una receta siríaca en común.

Tabla 2.- Texto clásico, nombre científico, dosis de los componentes de la *Hiera de Galeno*

Nombre vulgar	Nombre científico	Cantidad (dracmas)
Camedrio (Germander)	<i>Teucrium chamaedrys</i> L. (Lamiaceae)	XVI
Pimienta larga (Longpepper)	<i>Piper nigrum</i> L.	XVI
Pimienta blanca (White pepper)	<i>Piper longum</i> L. (Piperaceae)	
Cantueso (Cassidony)	<i>Lavandula stoechas</i> L. (Lamiaceae)	XVI
Eléboro negro (Black hellebore)	<i>Helleborus niger</i> L. (Ranunculaceae)	XVI
Escamonea (Scammony)	<i>Convolvulus scammonia</i> L. (Convolvulaceae)	XVI
Nardo (Spikenard)	<i>Nardostachys jatamansi</i> (D. Don) DC.(Caprifoliaceae)	XVI
Cebolla asada (Bakedsquills)	<i>Drimia maritima</i> (L.) Stearn (Aspargaceae)	XVI
Flores de tomillo (Dodderofthyme)	<i>Cuscuta epithymum</i> L. (Convolvulaceae)	XVI
Mirra (Myrrh)	<i>Commiphora myrrha</i> (Nees) Engl. (Bursaceae)	VIII
Azafrán (Saffron)	<i>Crocus sativus</i> L. (Iridaceae)	VIII
Goma Amoniaco (Ammoniac perfume)	<i>Dorema ammoniacum</i> D. Don.(Apiaceae)	VIII
Euforbio (Euphorbium)	<i>Euphorbia resinifera</i> O. Berg. (Euphorbiaceae)	VIII
Miel (Honey)		No indica

Conclusiones generales

Del estudio se desprende que el siríaco fue el idioma intermediario entre el griego y el árabe, o que las traducciones del griego al siríaco existieron antes que las traducciones del griego al árabe. Esta conclusión, quedó demostrada en los resultados obtenidos, especialmente al analizar los términos árabes y siríacos de los medicamentos simples⁹.

Los académicos en estudios siríacos, bizantinos y árabes y los especialistas en Historia de la Ciencia, sostienen que la lengua siríaca de los cristianos

9. Se analizaron 120 medicamentos simples, que pueden consultarse en el texto completo de la tesis.

orientales ha servido como intermediaria para traducir textos griegos que finalmente acabarían en árabe y luego en latín. Esto se evidencia mediante los paralelos literarios encontrados entre las recetas siríacas y árabes¹⁰.

10. Este artículo válido para la *Hiera de Galeno*, puede ser ejemplificador para los 16 medicamentos compuestos analizados en el texto completo de la tesis. Si bien en este caso pudo compararse solamente la receta siríaca con la receta árabe de Ibn Sina y la griega de Paulus, hay otras recetas que permitieron la comparación con las de más de un autor árabe, griego o del Cercano Oriente antiguo.

Tabla 3.- Análisis siríaco-griego. Comparación entre la receta siríaca y la griega de la *Hiera de Galeno*

	Siríaco - Anónimo	Griego - Paulus Aegineta
Nombre propio	Hiera de Galeno	Hiera de Galeno
Composición cuali-cuantitativa	Describe 30 simples ¹	Describe 14 simples. Omite: pulpa de coloquintida, agárico, hipérico, zamarrilla, bedelio, camapiteos, aloe, canela, polipodio, pimienta negra, canela china, férula opopanax, sagapeno, castóreo, aristoloquia redonda, genciana, perejil. Adiciona: nardo. El resto de los simples son iguales, aunque el orden es diferente. Las cantidades también expresadas en dracmas, no coinciden.
Posología y vía de administración	2 dracmas en infusión de apio, nardo, o pastinaca. Vía oral.	No indica
Farmacotecnia	Vehículo: miel No describe operaciones farmacotécnicas.	No indica
Conservación	No indica	No indica
Ref. cit.	Hiera Lgwdy'	No indica

1. Incluye los tres tipos de pimientas y la miel.

Tabla 4.- Texto árabe. Fabricación de la *Hiera de Galeno*, copia de *Ibn Sarafiu*n

Nombre vulgar	Nombre científico	Transliteración	Nombre árabe	Cantidad
Pulpa de coloquintida	<i>Citrullus colocynthis</i> (L.) Schrad. (Cucurbitaceae)	šhm 'lhnzl	شحم الحنظل	4 dracmas
Camedrio	<i>Teucrium chamaedrys</i> L. (Lamiaceae)	km'dryws	كمانديوس	3 dracmas y 1 dnq'
Cebolla albarrana asada	<i>Drimia maritima</i> (L.) Stearn. (Asparagaceae)	bšl 'lf'r mšwy'	بصل الفار مشويا	3 dracmas y 1 dnq'
Agárico	<i>Laricifomes officinalis</i> Kotl. et Pouzar (Fomitopsidaceae)	'g'ryqwn	اغاريقون	3 dracmas y 1 dnq'
Escamonea	<i>Convolvulus scammonia</i> L. (Convolvulaceae)	sqmwny'	سقمونيا	3 dracmas y 1 dnq'
Eléboro negro	<i>Helleborus niger</i> L. (Ranunculaceae)	hrbf'swd	خربق اسود	3 dracmas y 1 dnq'
Cantueso	<i>Lavandula stoechas</i> L. (Lamiaceae)	'stwhwdws	اسطوخودوس	3 dracmas y 1 dnq'
Goma amoniaco	<i>Dorema ammoniacum</i> D.Don. (Apiaceae)	'šq	اشق	3 dracmas y 1 dnq'
Hipérico	<i>Hypericum perforatum</i> L. (Hypericaceae)	hywf'ryqwn	هيوفاريقون	3 dracmas y 1 dnq'
Flores de tomillo	<i>Cuscuta epithimum</i> (L.) L. (Convolvulaceae)	'ftymwn	اقتيمون	1,5 dracmas

Tabla 4.- (continúa)

Nombre vulgar	Nombre científico	Transliteración	Nombre árabe	Cantidad
Zamarrila	<i>Teucrium polium</i> L. (Lamiaceae)	ğ‘dt	جعدة	1,5 dracmas
Bedelio	<i>Commiphora</i> sp. (Burseraceae)	Mql	مقل	1,5 dracmas
Camapiteos	<i>Ajuga chamaepitys</i> (L.) Schreb. (Lamiaceae)	km‘fyṭws	كمايطوس	1,5 dracmas
Marrubio	<i>Marrubium vulgare</i> L. (Lamiaceae)	fr‘sywn	فراسيون	1,5 dracmas
Aloe	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f. (Xanthorrhoeaceae)	ṣbr	صبر	1,5 dracmas
Canela	<i>Cinnamomum cassia</i> (L.) J.Presl (Lauraceae)?	slyḥt	سليخة	1,5 dracmas
Polipodio	<i>Polypodium vulgare</i> L. (Polypodiaceae)	bsğ‘nğ	بسغانج	1,5 dracmas
Tres tipos de pimienta	<i>Piper nigrum</i> L. <i>Piper longum</i> L. (Piperaceae)	‘lṭl‘tt fl‘fl	الثلاثة فلفل	0,5 + 1/3 dracmas
Mirra	<i>Commiphora myrrha</i> (Nees) Engl. (Burseraceae)	Mr	مر	0,5 + 1/3 dracmas
Canela china	<i>Cinnamomum verum</i> J.Presl (Lauraceae)	d‘r sywn	دار صيني	0,5 + 1/3 dracmas
Opopanax	<i>Opopanax chironium</i> W.D.J.Koch (Apiaceae)	Ğ‘wšyr	جاوشير	0,5 + 1/3 dracmas
Sagapeno	<i>Ferula persica</i> Willd.? (Apiaceae) <i>Narthex asafoetida</i> Falc. ex Lindl. H.Karst.? (Apiaceae)	Skbynğ	سكبينج	0,5 + 1/3 dracmas
Castor	<i>Castoreum</i> (Castoridae)	Ğndbydstr	جندبيدستر	0,5 + 1/3 dracmas
Perejil	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Fuss. (Apiaceae)?	fṭr‘ s‘lywn	فطر اساليون	0,5 + 1/3 dracmas
Aristolochia redonda	<i>Aristolochia rotunda</i> L. (Aristolochiaceae)	zr‘wnd mdḥrğ	زراوند مدرج	0,5 + 1/3 dracmas
Genciana	<i>Gentiana lutea</i> L. (Gentianaceae)	ğntý‘n’	جنطيانا	0,5 + 1/3 dracmas
Euforbio	<i>Euphorbia resinifera</i> O.Berg. (Euphorbiaceae)	‘wfrbywn	اوفر بيون	0,5 + 1/3 dracmas
Miel		‘sl	عسل	c.s.

Beber como la Hiera Lwg‘dy‘*. Posee los mismos beneficios.

*Es el nombre árabe de la Hiera Logadios (*Lgwdy‘* en siríaco).

Tabla 5.- Análisis siríaco-árabe. Comparación entre la receta siríaca y la árabe de la *Hiera de Galeno*

	Siríaco - Anónimo	Árabe - Ibn Sina
Nombre propio	Hiera de Galeno	Hiera de Galeno según copia de Ibn Sarafíun
Análisis de términos árabes (simples)	NA	Abundan los préstamos del siríaco y las traducciones idiomáticas.
Indicaciones clínicas (paralelos literarios entre siríaco y árabe)	Disuria y poliuria	Dice que posee los mismos beneficios que la hiera Lwg'dy'.
Composición cuali-cuantitativa	Describe 30 simples	Describe 30 simples ¹ . Reemplaza azafrán por marrubio.
Posología y vía de administración	2 dracmas en infusión de apio, nardo o pastinaca	Beber como la Hiera Lwg'dy' (es decir, 4 meticales en agua tibia y miel o en infusión de flores de tomillo con pasas).
Farmacotecnia	Vehículo: miel No describe operaciones farmacotécnicas.	Vehículo: miel. No describe operaciones farmacotécnicas.
Conservación	No indica	No indica
Referencias citadas	Hiera Lgwdy'	Hiera Lwg'dy'

1. Ibid.

El estudio de los medicamentos simples, tanto en lengua siríaca como en árabe, ha sido desarrollado por diversos autores y abordado de forma separada. Sin embargo, consideramos que el estudio comparativo entre los medicamentos compuestos en ambas lenguas, es un trabajo de investigación no realizado hasta el momento de la publicación de esta tesis y que será de utilidad a los especialistas en diversas disciplinas.

Referencias bibliográficas

- Adams, F: Paulus Aegineta (1844). *Seven Books of Paulus Aegineta*, London, The Sydenham Society, 3 vols.
- Brock, S.P. (2006). *An Introduction to Syriac Studies*. Gorgias Press, Piscataway.
- Brockelmann, C. (1928). *Lexicon syriacum*, HalisSaxonum: Sumptibus M. Niemeyer, Stanford.
- Budge, E.A.W. (1913). *Syrian Anatomy, Pathology and Therapeutics: Syriac text: or "The Book of Medicines": the Syriac text, edited from a rare manuscript, with an English translation, etc.*, vols. I y II, Oxford University Press, Londres.
- Gignoux, P. (2011). *Chrétiens En Terre D'Iran V: Lexique des Termes de La Pharmacopée Syriaque*, Studia Iranica Cahier 47, Paris.
- Ibn Sina (1593). *Kitab al Qanoun fi Al Toubb (The Book of the Canon of Medicine)*, The Medical Press, Roma. Publicado por la Biblioteca Médica Saab de la Universidad Americana de Beirut. Disponible en <http://ddc.aub.edu.lb/projects/saab/avicenna/contents-eng.html> [Consulta: 15 de diciembre de 2017].
- Lindberg, D.C. (2002). *Los inicios de la ciencia occidental: la tradición científica europea en el contexto filosófico, religioso e institucional: desde el 600 a.C. hasta 1450*, Paidós, Barcelona.
- Margoliouth, J.P. (Comp) (1927). *Supplement to the Thesaurus Syriacus*, Clarendon Press, Oxford.

Morfoanatomía foliar para el reconocimiento de especies de Asteraceae conocidas como “contrayerba” en la herboristería argentina

Victoria A. Diaz Avalos^{1*}, Fernanda P. Ravachine¹, Hernán G. Bach^{1,2}, Marcelo L. Wagner¹,
Beatriz G. Varela¹

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Farmacología, Cátedra de Farmacobotánica. Junín 956, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina.

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Recursos Biológicos. Buenos Aires, República Argentina

*Autor a quien dirigir la correspondencia: victoriadiazavalo@yahoo.com.ar

Resumen

El complejo “contrayerbas” comprende especies pertenecientes a cuatro familias botánicas: Aristolochiaceae, Asteraceae, Menispermaceae y Moraceae. Dentro de la familia Asteraceae se conocen como “contrayerba” unas 12 especies, utilizadas en medicina popular para tratar problemas digestivos, como diuréticos, antihemorrágicos y cicatrizantes. En este trabajo, se estudiaron las hojas de tres entidades botánicas de “contrayerba”: *Flaveria bidentis*, *Trichocline reptans* y *Trixis divaricata* subsp. *discolor*. Se analizaron también muestras comerciales procedentes de farmacias y herboristerías. El objetivo fue establecer caracteres foliares micrográficos para el control de calidad botánico de las especies estudiadas. Se realizaron observaciones macroscópicas, técnicas de disociación leve y diafanización sobre las hojas, y observaciones microscópicas. Los elementos diagnósticos fueron: tipo de pelos, tipo de estomas, presencia de estructura Kranz y de estructuras secretoras. Sólo una de las muestras comerciales se identificó como *Trixis divaricata* subsp. *discolor*, mientras las otras especies estudiadas no se identificaron en las muestras de “contrayerba”. Se deduce que existe una falta de control y se comercializan bajo el mismo nombre común otras especies que no corresponden al contenido.

Foliar Morphoanatomy for the Recognition of Asteraceae Species Known as “Contrayerba” in Argentine Herbalism

Summary

The complex “*Contrayerbas*” includes species belonging to four botanical families: Aristolochiaceae, Asteraceae, Menispermaceae, and Moraceae. About 13 species within Asteraceae are known as “*contrayerba*”. They are used in folk medicine to treat digestive problems, and as a diuretic, antihemorrhagic and cicatrizant remedy. In this work, the leaves of three botanical entities of “*contrayerba*” were studied: *Flaveria bidentis*, *Trichocline reptans*, and *Trixis divaricata* subsp. *discolor*. Commercial samples from pharmacies and herbalist stores were also analyzed. The objective was to establish micrographic leaf characters for botanical quality control of the species studied. Macroscopical observations, soft dissociation and diaphanization techniques on the leaves, and microscopic observations were performed. The diagnostic elements were: type of hairs, type of

Palabras clave: anatomía foliar - Asteraceae - “contrayerba” - herboristería.

Key words: foliar anatomy - Asteraceae - “contrayerba” - herbalism.

stomata, presence of Kranz structure and secretory structures. Only one of the samples was identified as *Trixis divaricata* subsp. *discolor*, while the other species studied were not identified in the “contrayerba” samples. It follows that there is a lack of control, and other species not corresponding to the content are commercialized under the same common name.

Introducción

El complejo conocido como “Contrayerba” o “Contra hierba” (Zardini, 1984a, 1984b; Cazes Camarero, 2000; Hurrell y col., 2011), comprende unas 16 especies pertenecientes principalmente a cuatro familias botánicas: Aristolochiaceae, Asteraceae, Menispermaceae y Moraceae.

La familia Compositae (= Asteraceae), comprende más de 1700 géneros y unas 24.000-30.000 especies distribuidas por todo el mundo, con excepción de la Antártida. Se reconocen por su inflorescencia, el capítulo, donde las flores (isomorfas o heteromorfas) se disponen en forma sésil sobre un receptáculo ensanchado (Cabrera, 1963; Katinas y col., 2007).

Asteraceae, de gran importancia medicinal, ecológica y económica, es la familia de Angiospermas con mayor riqueza y diversidad biológica. Posee especies productoras de sesquiterpenlactonas, aceites esenciales, flavonoides, resinas y látex (Torres y col., 2006; Del Vitto y Petenatti, 2009).

Esta gran familia se divide en subfamilias y estas a su vez en tribus y sub-tribus. En la flora argentina hay representantes de 13 tribus (Cabrera, 1963; Zardini, 1984a; 1984b; Katinas y col., 2007). Dentro de esta familia, son conocidas como “contrayerba” unas 13 especies, de las cuales se utiliza las partes aéreas: hojas, tallos, inflorescencias, o la planta entera. En medicina popular, se administran en uso externo en forma de cataplasmas y baños como antihemorrágicos y cicatrizantes, o bien en uso interno en forma de infusiones para tratar problemas digestivos y como emenagogos, diuréticos, diaforéticos, vermífugos y alexitéricos (Zardini, 1984a; 1984b; Del Vitto y col., 1997; Marzocca, 1997; Pereira y col., 2005; Torres y col., 2006; Hurrell y col., 2011).

En este trabajo se estudiaron tres entidades botánicas de “contrayerba”: *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze (tribu Helenieae), *Trichocline reptans* (Wedd.) Rob. (tribu Mutisieae) y *Trixis divaricata* (Kunth) Spreng. subsp. *discolor* (Don) Katinas (tribu Nassauvieae) (The Plant List, 2013; Zuloaga y Morrone, 2009). Se analizaron, además, seis muestras comer-

ciales de “contrayerba”. El objetivo fue establecer los caracteres micrográficos diagnósticos para el reconocimiento y el control de calidad botánico de las especies estudiadas.

Materiales y Métodos

Materiales

a) Hojas de ejemplares secos de herbario de *Flaveria bidentis*, *Trichocline reptans* y *Trixis divaricata* subsp. *discolor*; estos ejemplares se utilizaron como material de referencia y están depositados en el Museo de Farmacobotánica “Juan Aníbal Domínguez” (BAF), de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Sus datos se consignan a continuación:

***Flaveria bidentis*:** BAF 4295, C. Federal, V. Lugano. Leg. J.R. Bezzato N°75, V-1992. Det. J.R. Bezzato/93; BAF s/n, Prov. Buenos Aires, La Plata, Arboreto Fac. Agronomía. Leg. J.L. Amorín N° 3049, 4-IV-1968; BAF s/n, San Isidro, Pcia. Buenos Aires. Leg. J.L. Amorín N°118; 16-II-1966. ***Trichocline reptans*:** BAF s/n, Córdoba, N° 6122. Fecha: 1899. Det. E.M. Zardini; BAF s/, Córdoba, Totoral. Leg. Domínguez N° 124. Det: E.M. Zardini; BAF s/n, Trancas, Tucumán. Leg. F.M. Rodríguez, 20-XII-1913.

***Trixis divaricata* subsp. *discolor*:** BAF s/n, Paraguay, San Bernardino. Leg. Osten N° 8788, 11-VII-1916; BAF s/n, Córdoba N° 9826, 20-IV-1901; BAF s/n, Río 1°, Córdoba, 15-III-1905.

b) Seis muestras comerciales de “contrayerba” procedentes de farmacias y herboristerías. Las muestras se presentaban trozadas en grado diverso y se identificaron como M1, M2, M3, M4, M5 y M6.

Métodos

a.- Análisis de los rótulos de las muestras comerciales.

b.- Observación con microscopio estereoescópico Carl-Zeiss para evaluar los caracteres morfológicos. Las hojas secas fueron hidratadas con agua caliente durante 5 minutos.

c.- Disociación leve de las hojas de las muestras de herbario y comerciales con solución acuosa de hidróxido de sodio al 5 %, a ebullición 5-10 min (D'Ambrogio, 1986; IRAM, 1998; Zarlavsky, 2014).

d.- Observación de los disociados para evaluar los caracteres anatómicos, con un microscopio óptico Zeiss Axioskop2 y cámara digital SONY Exawave HAD.

e.- Diafanización foliar con hidrato de cloral y coloración con safranina. Se realizó sobre hojas enteras de los ejemplares de herbario según técnica de Dizeo de Strittmatter (1973).

Resultados y Discusión

Observación macroscópica

Las muestras comerciales consistían en una mezcla de hojas, tallos y a veces partes florales. El análisis de los rótulos permitió detectar irregularidades tales como: sólo nombre común (M1, M2, M3, M6), uso indistinto de nombre común y de nombre científico (M4, M5), en algunas muestras no se indica la parte del vegetal incluida (M1, M3, M4, M6). Sólo la M4 figura autorizada como medicamento herbario.

Las hojas de las muestras observadas bajo lupa presentaban una pubescencia densa. Los caracteres morfológicos relevantes para las especies fueron: el borde foliar, la pubescencia/glabrescencia, la consistencia de la hoja y el tipo de nerviación.

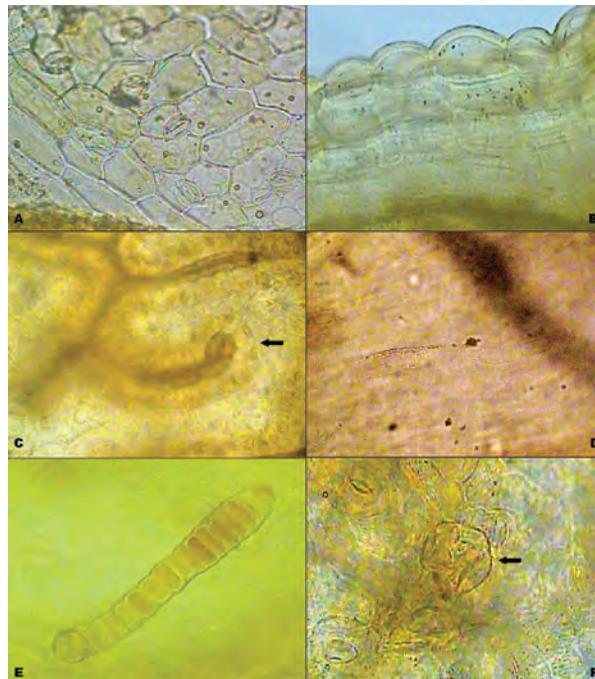
Observación microscópica

Con la técnica de disociación leve se observó la mayoría de los elementos que caracterizan a las especies en el material de referencia y se contrastaron con las muestras comerciales. Los caracteres anatómicos relevantes fueron: tipo y localización de estomas, características epidérmicas, tipo de tricomas y densidad de los pelos, presencia de estructura Kranz. Las figuras 1-3 corresponden a los disociados leves de las especies de referencia.

Con la diafanización foliar se estableció el patrón de venación de las tres especies según terminología

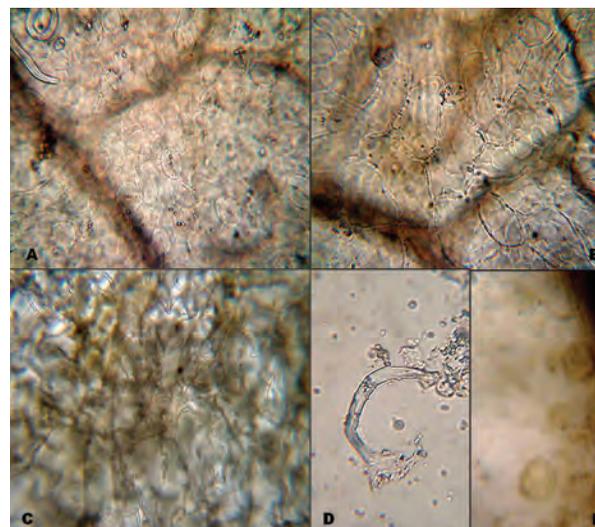
propuesta por Hickey (1974). Se confirmó, además, la anatomía Kranz en *F. bidentis*, en concordancia con lo propuesto por Petenatti y Del Vitto (2000).

Figura 1.- *Flaveria bidentis*. Disociado



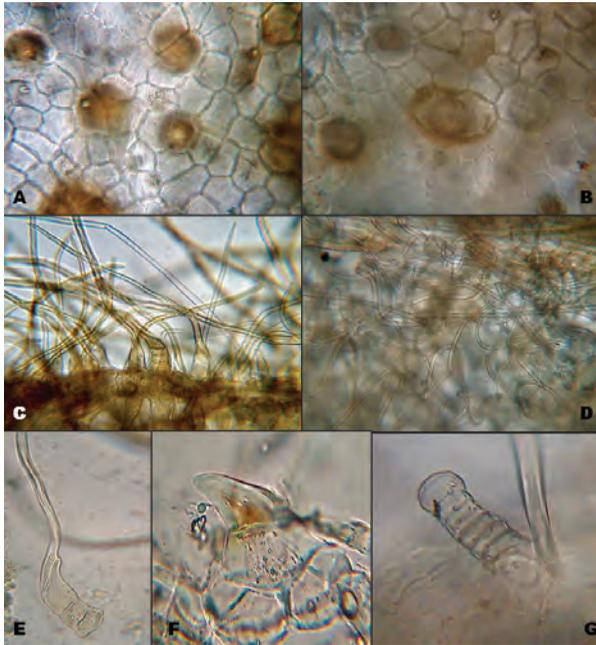
A: epidermis con estomas anomicíticos; B: epidermis papilosa; C: estructura Kranz; D: pelo tector pluricelular; E: pelo glandular pluricelular no capitado; F: pelo glandular de pie y cabeza 1-celular. A, C-F: 400x; B: 200x.

Figura 2.- *Trichocline reptans*. Disociado



A: epidermis abaxial; B: epidermis adaxial; C: pelos flexuosos; D: pelo tector 1-celular; E: pelos glandulares. A, B, D: 400x; C, E: 200x.

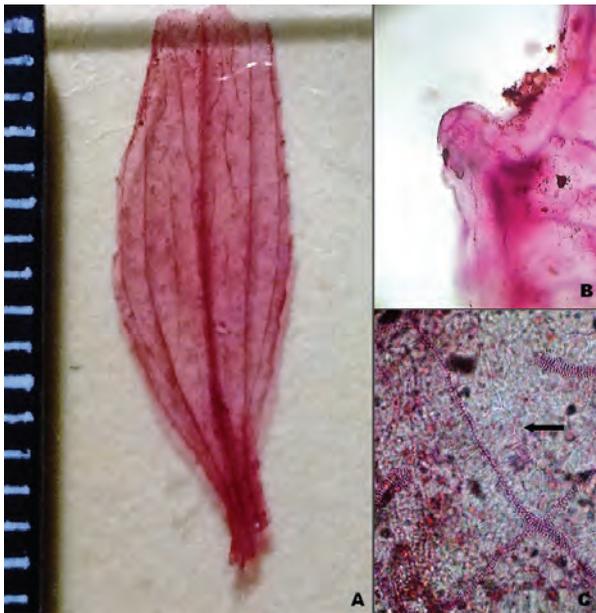
Figura 3.- *Trixis divaricata* subsp. *discolor*. Disociado



A: epidermis adaxial; **B:** epidermis abaxial; **C:** pelos tectores pluricelulares 100x; **D:** pelos flexuosos; **E:** pelo tector en bisel; **F:** base de pelo en bisel; **G:** pelo glandular pluricelular. A-B, E-G: 400x; C, D: 100x; E-G: 100x.

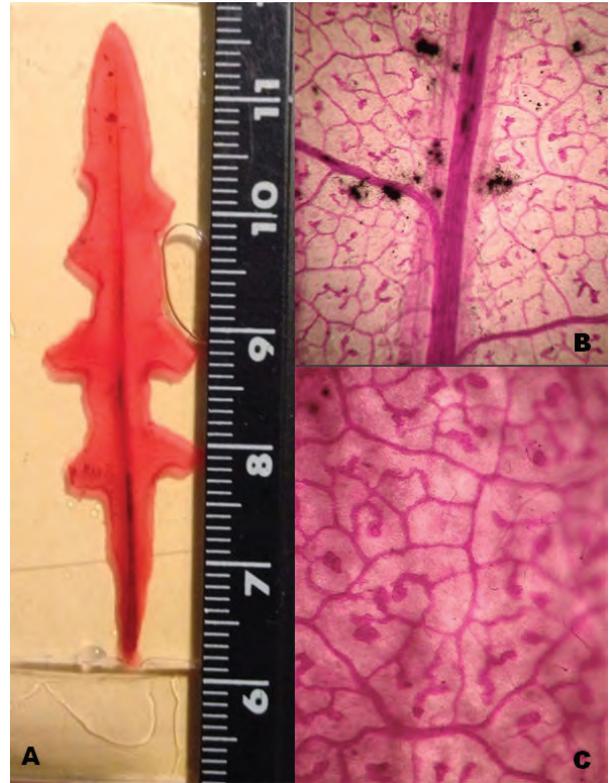
Las figuras 4-6 corresponden a las hojas diafanizadas de las especies estudiadas.

Figura 4.- *Flaveria bidentis*. Diafanizado



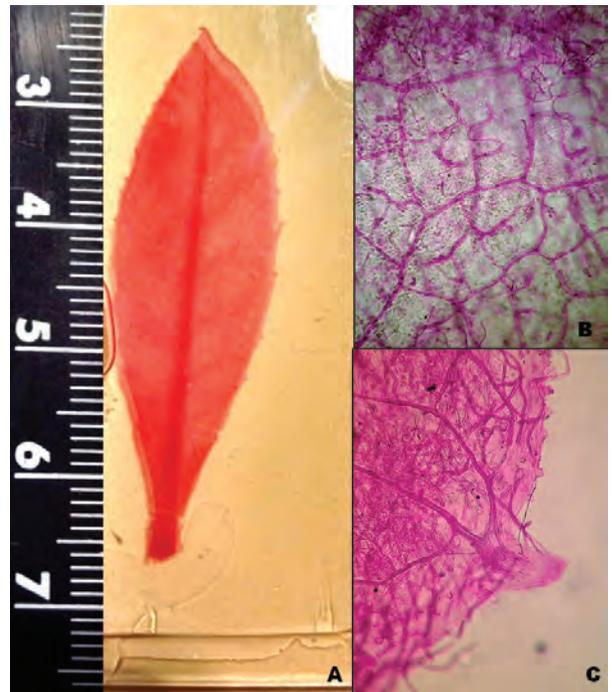
A: venación; **B:** detalle diente marginal; **C:** vaina parenquimática (flecha). B-C: 400x

Figura 5.- *Trichocline reptans*. Diafanizado



A: venación; **B:** nervadura central; **C:** detalle de aréolas. B: 50x; C: 100x.

Figura 6.- *T. divaricata* subsp. *discolor*. Diafanizado



A: venación; **B:** aréolas; **C:** detalle diente marginal. B-C: 100x.

Cuadro 1.- Caracteres morfo-anatómicos diagnósticos para las especies estudiadas

<i>Flaveria bidentis</i> (L.) Kuntze	<i>Trichocline reptans</i> (Wedd.) Rob.	<i>Trixis divaricata</i> (Kunth) Spreng. subsp <i>discolor</i>
Hoja lanceolada, venación 1ª palmada, y 2ª semi-craspedódroma ojalada; borde suavemente aserrado.	Hoja irregular sinuosa, venación 1ª pinnada, y 2ª broquidódroma; borde entero.	Hoja oblanceolada, venación 1ª pinnada, y 2ª semicraspedódroma ojalada; borde algo aserrado.
Epidermis adaxial papilosa con cutícula gruesa. Estomas anomocíticos en ambas epidermis.	Epidermis abaxial con estomas anomocíticos. Epidermis adaxial con escasos estomas.	Epidermis adaxial y abaxial con estomas anomocíticos hundidos.
Pelo tector largo, pluricelular. Pelo glandular no capitado, pluricelular. Pelo glandular, con pie y cabeza unicelular.	Pelo tector simple, 1-celular. Pelo tector largo, flexuoso. Pelo glandular con cabeza 1-celular, en depresiones.	Pelos tectores flexuosos. Pelo tector, com pie 2-3-celular, y con base en bisel. Pelo glandular largo, 5-7 células.
Estructura Kranz, con vaina rodeando al tejido vascular.	Densa pubescencia en la cara inferior.	Nervadura central con cerdas en cara abaxial.

En el cuadro 1 se establece un análisis comparativo de las tres especies con los caracteres morfo-anatómicos diagnósticos.

Por comparación de los disociados de las hojas de referencia y de las muestras comerciales, se identificaron las especies y se hallaron algunas sustituciones de estas especies. En ninguna de las muestras comerciales se identificó *Flaveria bidentis* ni *Trichocline reptans*. Sólo en una de las muestras (M4) se identificó *Trixis divaricata* subsp. *discolor*. Se deduce que el resto de las muestras contiene especies distintas a las aquí analizadas.

Conclusiones

Las técnicas aplicadas permitieron evaluar esos caracteres y detectar en las muestras adulteraciones o sustituciones. La disociación leve es una técnica sencilla que permite observar gran cantidad de elementos, aún en muestras trozadas o muy trituradas.

La falta de control botánico o el control deficiente incide negativamente en la calidad de las hierbas medicinales y de los medicamentos herbarios. Se sugiere completar este estudio con cortes histológicos que aporten más información para los controles de calidad de muestras comerciales.

Agradecimientos

Trabajo realizado mediante el subsidio UBACyT 01/Q641

Referencias bibliográficas

- Cabrera, A.L. (1963). *Flora de la Provincias de Buenos Aires*. Tomo IV, Parte VI. Compuestas. Colección Cient. INTA, Buenos Aires: 443.
- Cazes Camarero, P.L. (2000). "Nombres vulgares de Asteraceae del herbario del Museo Juan A. Domínguez (Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA)". *Dominguezia* 16 (1): 15-45.
- D'Ambrogio, A. (1986). *Manual de técnicas en histología vegetal*. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires: 83.
- Del Vitto, L.A.; Petenatti, E.M.; Petenatti, M.E. (1997). "Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina). Primera parte: plantas nativas". *Multequina* 6: 49-66.
- Del Vitto, L.A.; Petenatti, E.M. (2009). "Asteráceas de importancia económica y ambiental. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial". *Multequina* 18: 87-115.

- Dizeo de Strittmatter, C. (1973). "Nueva técnica de diafanización". *Bol. Soc. Argent. Bot.* 15 (1): 126-129.
- Hickey, L. (1974). "Clasificación de la arquitectura de hojas de Dicotiledóneas". *Bol. Soc. Argent. Bot.* 16 (1-2): 1-25.
- Hurrell, J.A.; Ulibarri, E.A.; Arenas, P.M.; Pochettino, M.L. (2011). *Plantas de herboristería*. Editorial LOLA, Buenos Aires: 242.
- IRAM. Instituto Argentino de Racionalización de Materiales. (1998). Norma 37500: Drogas vegetales. Método para su control por la técnica de disociación débil.
- Katinas, L.; Gutiérrez, D.G.; Grossi, M.A.; Crisci, J.V. (2007). "Panorama de la familia Asteraceae (= Compositae) en la Republica Argentina". *Bol. Soc. Argent. Bot.* 42 (1-2): 113-129.
- Marzocca, A. (1997). *Vademécum de malezas medicinales de la Argentina. Indígenas y exóticas*. Orientación Gráfica Edit., Buenos Aires: 364.
- Pereira, F.H.; Guimarães, L.A.; Cerutti, S.M.; de Oliveira Rodrigues, R.F.; Araujo, C.E. (2005). "Preliminary anti-ulcerogenic and chemical analysis of the aerial parts of *Trixis divaricata* Sprengel". *Acta Farm. Bonaerense* 24 (1): 80-84.
- Petenatti, E.; Del Vitto, L. (2000). "Estructura Kranz en especies argentinas de *Flaveria* (Asteraceae, Helenieae)". *Kurtziana* 28: 251-257.
- The Plant List (2013). Version 1.1. [en línea]; <http://www.theplantlist.org/> [Consulta: Diciembre de 2017].
- Torres, A.M.; Camargo, F.; Ricciardi, G.A.; Ricciardi, A.I.; Dellacassa, E. (2006). "Examen del aceite esencial de *Trixis divaricata* (Kunth) Spreng. de Corrientes". Comunicaciones científicas y tecnológicas (UNNE) E-019.
- Zardini, E.M. (1984a). "Etnobotánica de Compuestas Argentinas con especial referencia a su uso farmacológico (Segunda Parte)". *Acta Farm. Bonaerense* 3 (2): 169-94.
- Zardini, E.M. (1984b). "Etnobotánica de Compuestas Argentinas con especial referencia a su uso farmacológico (Primera Parte)". *Acta Farm. Bonaerense* 3 (1): 77-99.
- Zarlavsky, G.E. (2014). *Histología vegetal. Técnicas simples y complejas*. Soc. Argentina de Botánica, Buenos Aires: 198.
- Zuloaga, F.; Morrone, O. (2009). *Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur* [en línea]. [Consulta: Octubre de 2017]. <http://www2.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/FA.as>

Estudio farmacobotánico de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth (Convolvulaceae)

María A. Monsalvo^{1,4}, Renée H. Fortunato^{1,2,3}, Marcelo L. Wagner⁴, Rafael A. Ricco^{4*}

¹Instituto de Recursos Biológicos (CNIA-CIRN-INTA). N. Repetto & Los Reseros s/n (1686). Hurlingham. Argentina.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina.

³Cátedra de Botánica Morfológica y Sistemática. Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Morón. Cabildo 134 (B1708JPD). Morón. Argentina.

⁴Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Farmacología. Cátedra de Farmacobotánica. Junín 956 (C1113AAB), CABA, Argentina.

*Autor a quien dirigir la correspondencia: raricco@ffybu.uba.ar

Resumen

Ipomoea purpurea (L.) Roth (Convolvulaceae) es una especie que se desarrolla en las zonas tropicales de ambos hemisferios. Por el atractivo de sus flores pertenece al grupo conocido como “Common morning glory”, especies empleadas por diversos grupos nativos en rituales mágico - religiosos y popularmente como alucinógeno, analgésico, antiinflamatorio y purgante, entre otros. Dada la gran similitud de *I. purpurea* con otras especies del mismo género (características ecológica, morfológicas y fitoquímicas), se plantean actualmente discusiones de identificación incluso a nivel taxonómico. El objetivo de este estudio es determinar las principales características diagnósticas para la identificación de *I. purpurea* y registrar sus atributos morfoanatómicos generales. Se trabajó con material fresco proveniente de INTA Castelar y ejemplares de herbario. Se analizaron las hojas, tallos, raíces, flores y semillas. Se realizaron disociados leves, fuertes, raspados, reducción a polvo, cortes transversales, improntas de epidermis y *peeling*. Se realizaron reacciones histoquímicas para almidón, lípidos y antocianos. El material se observó mediante microscopía de luz clara, contraste de fase (DIC) y luz polarizada y se realizó microscopía cuantitativa. Entre los caracteres principales pueden mencionarse: en las hojas, epidermis con estomas paracíticos y anomocíticos, tricomas tectores unicelulares de tres tamaños diferentes, tricomas glandulares pluricelulares, drusas. En los tallos se observaron los mismos tricomas que en las hojas y tubos laticíferos. En la raíz, laticíferos, almidón y drusas. En la flor, tricomas tectores similares a los de las hojas pero con base ensanchada y tricomas glandulares, drusas, antocianinas y granos de polen equinados-pantoporados. En las semillas, esclereidas, lípidos, granos de almidón de diferente tamaño y de formas esférica y ovoidal, ambos con hendidura presente, drusas y cavidades, aparentemente, de tipo esquizógeno. Los tres tamaños diferentes de tricomas tectores, los tricomas glandulares y las cavidades presentes en la semilla constituyen la primera observación para esta especie. Este estudio proporciona datos relevantes para *I. purpurea* y provee elementos de diagnóstico para ser empleados en la diferenciación respecto de otras especies taxonómicamente afines.

Palabras clave: “common morning glory” - *Ipomoea purpurea* - tricomas.

Key words: “common morning glory” - *Ipomoea purpurea* - trichomes.

Pharmacobotanical study of *Ipomoea purpurea* (L.) Roth (Convolvulaceae)

Summary

Ipomoea purpurea (L.) Roth (Convolvulaceae) is a species that develops in the tropical regions of both hemispheres. It belongs to the group known as “Common morning glory” on account of the beauty of its flowers, species used by various native groups in magic - religious rituals and popularly as hallucinogenic, analgesic, anti - inflammatory and laxative, among others. The great similarity of *I. purpurea* with other species of the same genus (such as ecological, morphological and phytochemical characteristics), leads to discussions of identification, even at a taxonomic level. The aim of this study was to determine the main diagnostic characteristics for the identification of *I. purpurea* and to record its general morphoanatomical attributes. We work with fresh INTA Castelar material and herbarium samples. The leaves, stems, roots, flowers and seeds were analyzed by soft, strong, scraped dissociations, reduction to dust, cross sections, traces of the epidermis and desquamation. Histochemical reactions were performed for starch, lipids and anthocyanins. Qualitative and quantitative microscopy was performed on fresh and dry material by bright-field microscopy, phase contrast (DIC) and polarized light. Among the main characters may be mentioned: in the leaves, epidermis with paracytic and anomocytic stomata, unicellular tissue trichomes of three different sizes, pluricellular glandular trichomes, clusters of calcium oxalate. In the stems were observed laticiferous tubes and the same trichomes as in the leaves. In the root, laticiferous, starch and clusters of calcium oxalate. In the flower, trichomes tectores similar to those of the leaves but with widened base and glandular trichomes, clusters of calcium oxalate, anthocyanins and equine-pantopored pollen grains. In the seeds, sclereids, lipids, starch grains of different size and spherical and ovoidal shapes, both with a cleft present, clusters of calcium oxalate and cavities, apparently of the schizogenic type. The three different sizes of trichomes, the glandular trichomes and the cavities present in the seed constitute the first observation for this species. This study provides relevant data for *I. purpurea* and provides diagnostic elements to be used in the differentiation with respect to other species taxonomically related.

Introducción

Ipomoea purpurea (L.) Roth (Convolvulaceae) es una especie que se desarrolla en las zonas tropicales de ambos hemisferios y crece espontáneamente en Argentina (Power y Rogerson, 1908; Zuloaga, 2008). Por el atractivo de sus flores pertenece al grupo conocido como “Common morning glory” que involucra más de 20 especies. Históricamente, estas especies, fueron empleadas por diversos grupos nativos sin una clara diferenciación interespecífica, en rituales mágico-religiosos (Schultes y Hofmann, 2000) por presentar alcaloides con actividad alucinógena (Arias-Ortiz y col., 2011).

Además, *I. purpurea* es usada tradicionalmente como laxante y en el tratamiento de infecciones de sífilis (Bhatt y col., 2013), las semillas contienen alcaloides indólicos derivados del LSD con actividad analgésica como la ergotamina (Steiner y Leistner, 2012) y alcaloides tropánicos

con actividad anticolinérgica (Ott y col., 2013). A pesar de estos antecedentes, *I. purpurea* no se encuentra incluida en ninguna farmacopea debido a la falta de estudios biológicos y a la complejidad en la diferenciación interespecíficas a nivel morfoanatómico.

El objetivo de este estudio es determinar las principales características diagnósticas para la identificación de *I. purpurea* y registrar sus atributos morfoanatómicos generales.

Materiales y Métodos

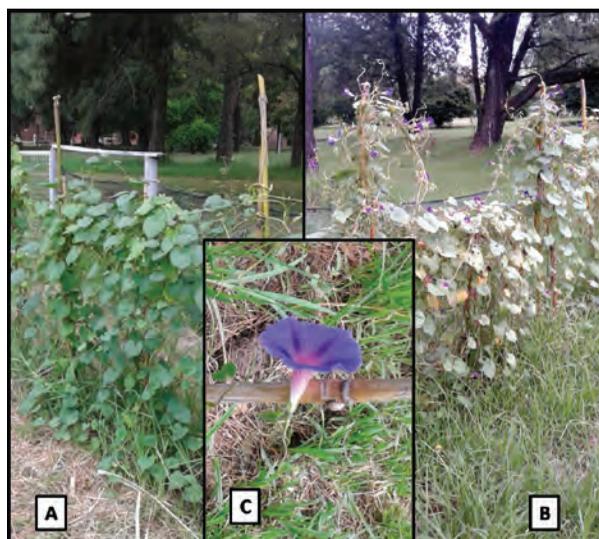
Material vegetal

Se trabajó con material fresco proveniente de Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

Castelar del Partido Hurlingham, Provincia de Buenos Aires.

Se analizaron las hojas, tallos, raíces, flores y semillas. Las plantas (Figura 1) fueron determinadas como *Ipomoea purpurea* (L.) Roth en base a las claves analíticas y descripciones de O'Donnell (1959) y Chiarini y Espinar (2006) y fueron cotejadas con ejemplares conservados en las colecciones del herbario BAB.

Figura 1.- Aspecto general de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. -Convolvulaceae-

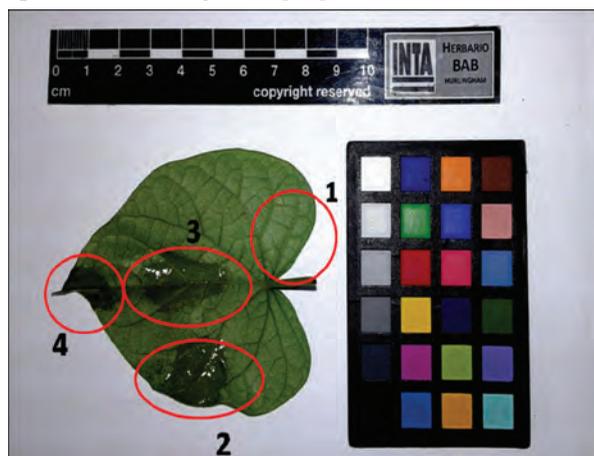


A: plantas en estado vegetativo; B: plantas en floración; C: flor.

Métodos

Se realizaron disociados leves (NaOH 5 %), disociados fuertes (KHO 10 %, H_2CrO_4 25 %), raspados de semillas, cortes transversales de tallo y semilla, improntas de epidermis (Barrientos-Priego y col., 2003) y *peeling* de hojas para el cálculo del índice estomático, considerando 4 posiciones diferentes en hojas de 8 cm de longitud (Figura 2). Se realizaron reacciones histoquímicas para almidón (Lugol), lípidos (Sudán III) y antocianos (reacción de pH mediante exposición a vapores de HCl y NH_4) (Johansen, 1940; D' Ambrogio, 1986; Gattuso y Gattuso, 1999; Zarlavsky, 2014).

Figura 2.- Detalle de la posición de las improntas de la epidermis de la hoja de *I. purpurea*



El trabajo de microscopía, descriptiva y cuantitativa, se realizó con un equipo Carl Zeiss Axioscop 2 Plus utilizando las técnicas de luz clara, contraste de fase (DIC) y luz polarizada. Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Moticam X² WIFI.

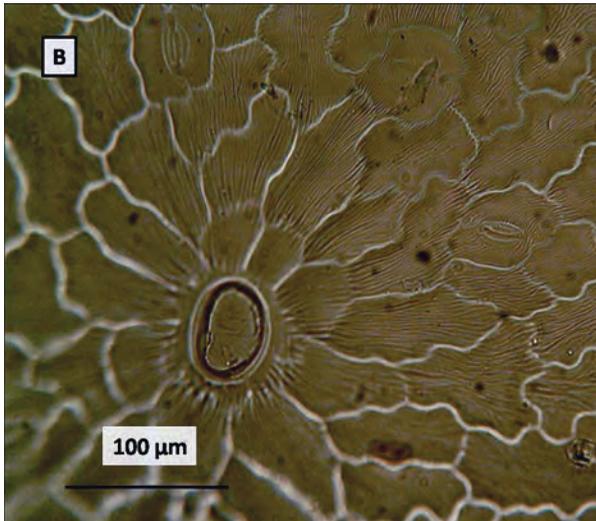
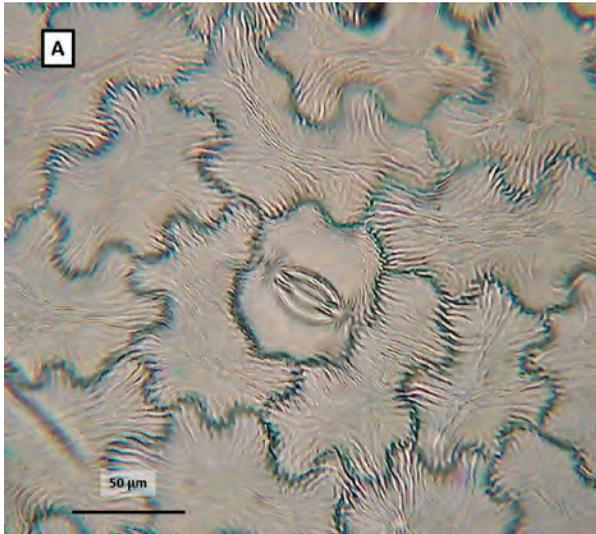
Resultados y Discusión

Hojas

En las hojas, la técnica de impronta permitió observar una cutícula ornamentada con estriado de disposición irregular con respecto a los estomas, a veces formando alas sobre las células subsidiarias y radiado con respecto a los tricomas (Figura 3). Las células epidérmicas se encuentran formando una doble corona alrededor de los tricomas tectores (Figura 4). Se observó la presencia de estomas paracíticos y anomocíticos, tanto en la epidermis abaxial como en la adaxial, que coinciden con la morfología típica de la familia Convolvulaceae (Chiarini y Espinar, 2006). En los cálculos del índice estomático en la epidermis adaxial los valores fueron de 21 a 36 y en la epidermis abaxial con valores comprendidos entre 52 a 115.

Por otro lado, se observó la presencia de cristales de oxalato de calcio, bajo la forma de drusas (Figura 5).

Figura 3.- Imprinta de la epidermis de la hoja de *I. purpurea*



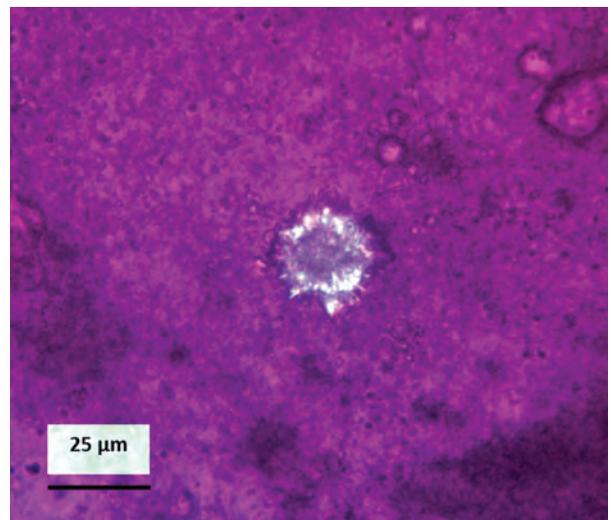
A: estriado de disposición irregular (A = 400 X); **B:** estriado de disposición radiada (A = 250 X); **C:** estriado de disposición radiada y tricoma glandular con cabeza tetra celular (A = 400 X).

Figura 4.- Doble corona de células epidérmicas alrededor del tricoma tector de *I. purpurea*



A = 250 X.

Figura 5.- Drusa en la hoja de *I. purpurea*



A = 400 X; luz polarizada.

El análisis de los disociados también permitió observar tricomas tectores unicelulares (Figura 6) de tres tamaños, del orden de los 170 μm los más cortos, 300 μm los intermedios y > 600 μm los más largos; tricomas glandulares con pie corto unicelular y cabeza tetra celular (ca. $\Theta = 35 \mu\text{m}$). Hasta el momento, esta variedad de apéndices epidérmicos no fue reportada en ninguna otra especie del grupo conocido como “Common morning glory”, por lo que podría resultar de carácter diferencial.

Figura 6.- Tricomas tectores en las hojas de *I. purpurea*

A: tres tamaños diferentes (A = 200 X); **B:** pelo tector mediano (A = 200 X); **C:** pelos tectores chico y grande (A = 200 X).

Tallos

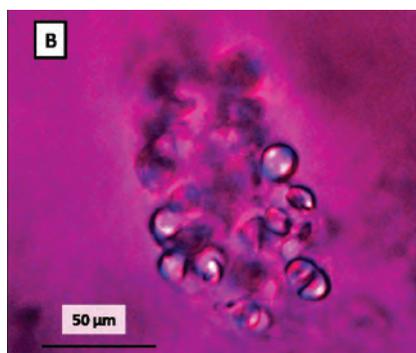
En los tallos se observó la misma variedad de tricomas que en las hojas, donde los pelos tectores se ubican sobre un cojinete de células epidérmicas. Otra característica observada es la presencia de tubos laticíferos. En los fragmentos de tallo que estuvieron expuestos a la luz solar se observa una capa de células subepidérmicas con la presencia de antocianos (Figura 7).

Figura 7.- Corte transversal del tallo de *I. purpurea*

Tricoma glandular y capa de células subepidérmicas con la presencia de antocianos. (A = 400 X).

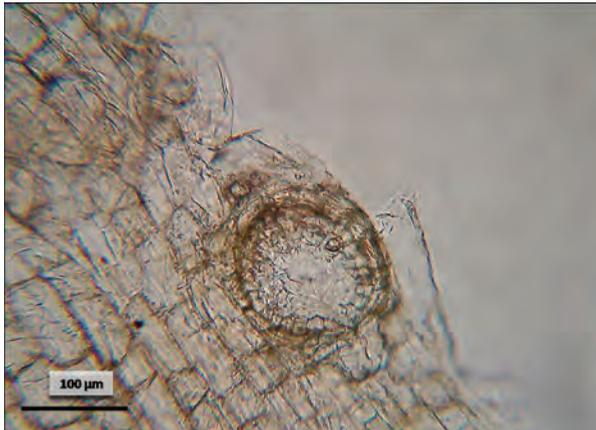
Raíz

En la raíz se detectó la presencia de almidón (Figura 8), drusas, antocianinas en las porciones próximas al tallo y tubos laticíferos. Se observó la presencia de cavidades esquizógenas (Figura 9).

Figura 8.- Granos de almidón de la raíz de *I. purpurea*

A: Granos de almidón (A= 400 X, campo claro); **B:** granos de almidón (A = 400 X, luz polarizada).

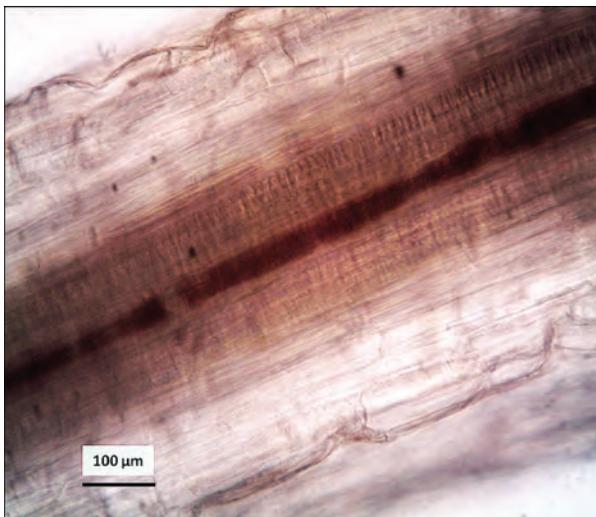
Figura 9.- Cavidades esquizógenas en la raíz de *I. purpurea*



A = 200 X.

Un carácter de relevancia taxonómica y fitoquímica en el género *Ipomoea* es la presencia de látex. De las especies del grupo más emparentadas con *I. purpurea*, ésta es la única que posee esta sustancia según las descripciones botánicas actuales (Chiari-nini y Espinar, 2006). En los cortes histológicos se confirmó la presencia de tubos laticíferos en tallo y raíz (Figura 10) (Cortella, 1989).

Figura 10.- Laticíferos en raíz de *I. purpurea*



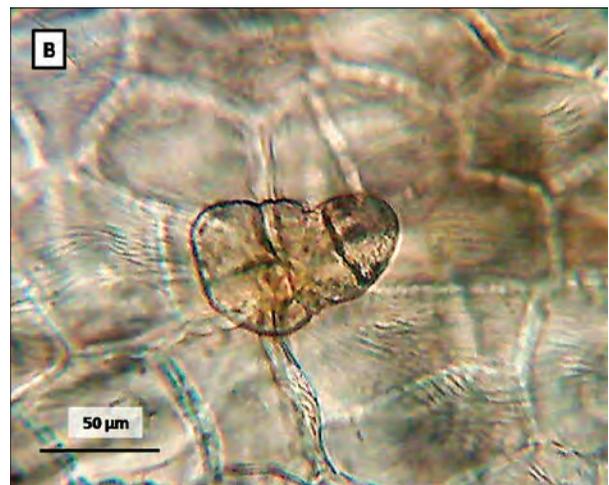
A = 400 X.

Flor

En la flor se observó que la corola presenta tricomas glandulares. Se determinó, además, la presencia de drusas. Los pigmentos encontrados fueron identifi-

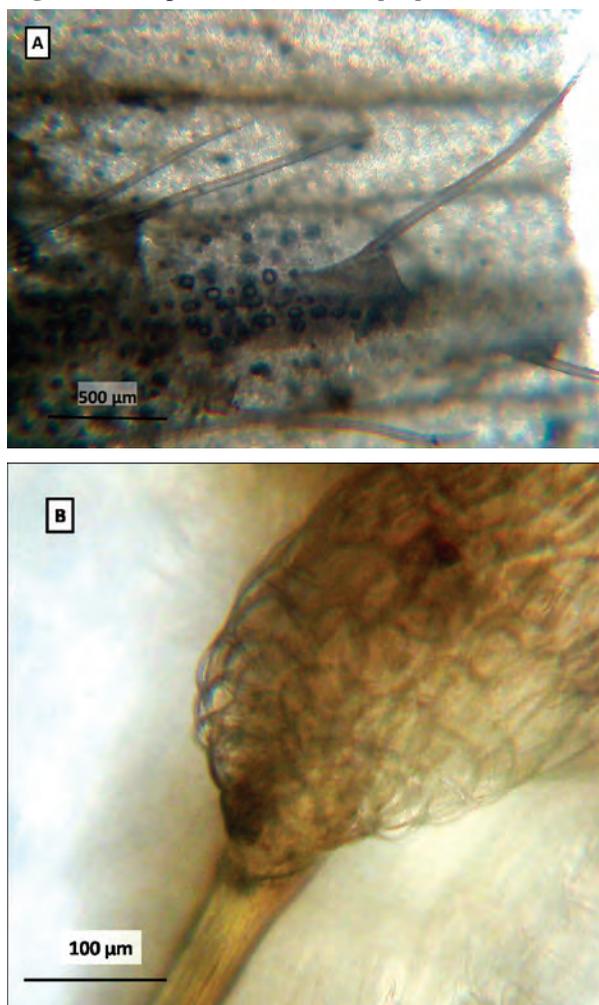
cados como antocianinas responsables del color púrpura (Narbona y col., 2014). En los sépalos internos se observaron pelos simples de distintos tamaños, pelos glandulares, frecuentemente deformes (Figura 11) y la presencia de drusas. En los sépalos externos se evidenció la presencia de pelos tectores con igual variedad de tamaños que en los sépalos internos pero con base de células epidérmicas muy prominente (Figura 12). En la base de los estambres se observó una corona de tricomas multiseriados (Figura 13). Los granos de polen, de tipo equinados-pantoporados (Figura 14), son coincidentes con los estudios palinológicos realizados sobre otras especies de Convolvuláceas (Vasconcelos y col., 2015). Estas estructuras celulares presentes en los verticilos externos del sistema reproductivo resultan de utilidad para definir una descripción más detallada de la morfología floral de la especie.

Figura 11.- Tricomas glandulares en los sépalos internos de *I. purpurea*



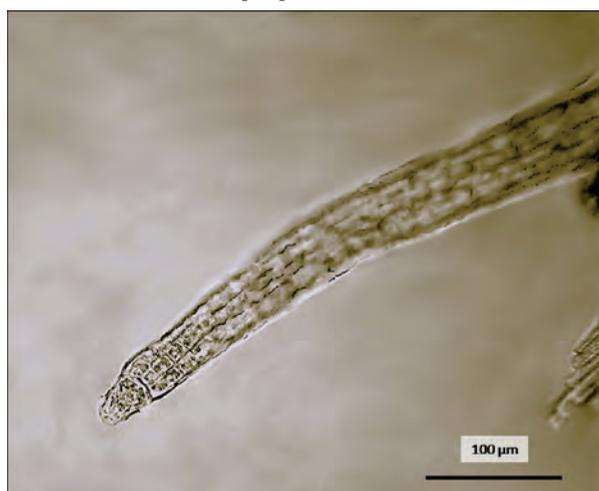
A: normal, B: deforme. (A = 400 X).

Figura 12.- Sépalos externos de *I. purpurea*



A: tricomas tectores sobre cojinete de células epidérmicas (A = 50 X); **B:** detalle de la base del tricoma (A = 200 X).

Figura 13.- Apéndice o tricoma multiseriado de la base de los estambres de *I. purpurea*



A = 200 X.

Figura 14.- Granos de polen de *I. purpurea*

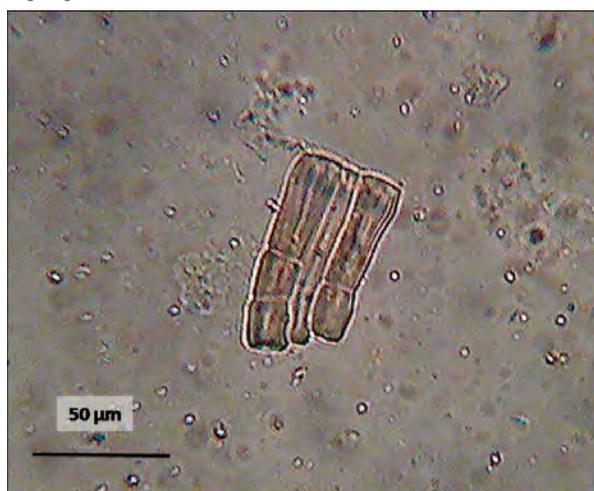


A = 1000 X.

Semilla

En la semilla se determinó la presencia de esclereidas columnares (Figura 15), drusas (Figura 16), lípidos, granos de almidón de diferente tamaño (desde 1 µm a 14 µm) y formas: esféricas y ovoidales, ambos con hendidura presente (Figura 17). En el tejido embrionario se observaron cavidades, aparentemente de tipo esquizógenas (Figura 18) que coincide con lo descrito por Cortella (1989).

Figura 15.- Esclereidas columnares en la semilla de *I. purpurea*



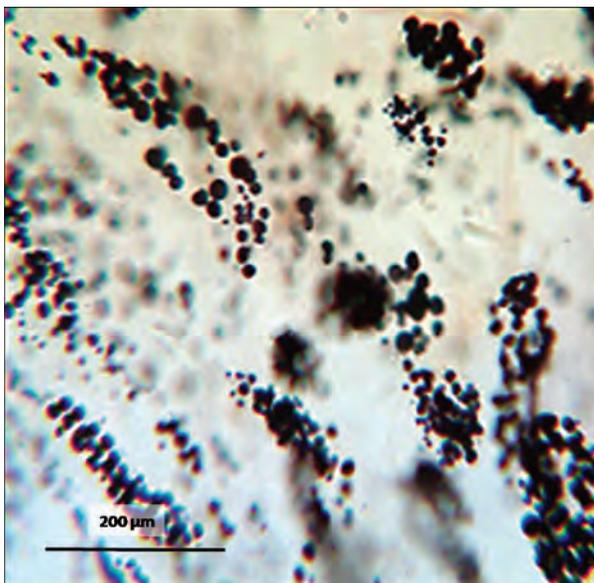
A = 400 X.

Figura 16.- Drusa en la semilla de *I. purpurea*



A = 400 X; DIC.

Figura 17.- Almidón en la semilla de *I. purpurea*



A = 100 X; Lugol positivo.

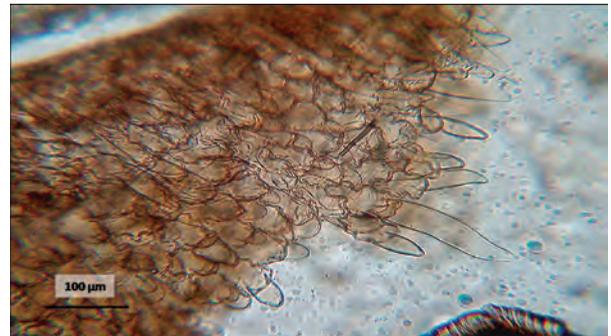
Figura 18.- Cavidades en tejido embrionario en la semilla de *I. purpurea*



A = 200 X.

La cubierta seminal, de importancia taxonómica y fisiológica, es extremadamente diferente entre las especies, variando tanto el número y el grosor de los tegumentos como los patrones de vascularización y disposición de las células que lo componen. Estas variaciones le confieren características de mayor o menor dureza que afectan de manera mecánica al rompimiento de la testa. El tegumento externo de las semillas de *I. purpurea* ha sido definido como un espermodermo rugulado (Sahanmukha y Leela, 1993), lo que le conferiría un aspecto arrugado. Sin embargo, su aspecto es aterciopelado, por estar provisto de células de diferentes tamaños, de forma irregular y prolongadas hacia el exterior del tejido según lo observado en los cortes histológicos realizados. La interpretación de los autores del presente estudio se basa en la morfoanatomía vegetal descriptiva (Lindley, 1951; Pio Font Quer, 1953; 2009) de uso convencional e históricamente vigente. Se propone considerar un cambio en la terminología descriptiva donde el espermodermo de esta especie sería de tipo papiloso (Figura 19).

Figura 19.- Cubierta seminal papilosa en la semilla de *I. purpurea*



A = 200 X.

Conclusiones

Del análisis de la bibliografía disponible, surge que los resultados de este estudio constituyen la primera descripción morfoanatómica de *Ipomoea purpurea* que incluye a todos los órganos vegetales. La presencia de cavidades esquizógenas en la raíz, los tres tamaños diferentes de tricomas tectores y los tricomas glandulares, constituyen observaciones novedosas para esta especie.

Los resultados obtenidos sugieren que las estructuras anatómicas observadas podrían emplearse como elemento de diagnóstico en la diferenciación de esta especie respecto de otras taxonómicamente afines.

Referencias bibliográficas

- Arias Ortiz, H.M.; López Bedoya, A.; Bernal Vera, M.E.; Castaño Ramírez, E. (2011). "Caracterización ecológica y fotoquímica de la Batatilla *Ipomoea purpurea* L. Roth. (Solanales, Convolvulaceae) en el municipio de Manizales". *Boletín Científico Museo Historia Natural Universidad Caldas* 15 (2): 19 - 39.
- Barrientos-Priego, A.F.; Borys, M.W.; Trejo, C.; López-López, L. (2003). "Índice y densidad estomática foliar en plántulas de tres razas de aguacatero". *Revista Fitotécnica Mexicana* 26 (4): 285 - 290.
- Bhatt, D.; Kumar, R.; Joshi, G.; Tewari, L. (2013). "Indigenous uses of medicinal plants by Vanraji Tribes of Kumaun Himalaya, India". *Journal of Medicinal Plant Research*: 2747 - 2754.
- Chiarini, F.; Espinar, L.A. (2006). "Convolvulaceae". *Flora Fanerogámica Argentina*. Fascículo 96 (249). Proflora- CONICET. Argentina: 81.
- Cortella, A.R. (1989). "Secretory tissue in *Ipomoea purpurea* (Convolvulaceae): Laticifers and glands". *Darwiniana* 29 (1 - 4): 17 - 23.
- D' Ambrogio, A. (1986). *Manual de técnicas en histología vegetal*. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires: 84.
- Gattuso, M.; Gattuso, S. (1999). *Manual de procedimientos para el análisis de drogas en polvo*. U.N.R., Rosario: 50.
- Johansen D.A. (1940). *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company inc., New York: 523.
- Lindley, J. (1951). *Glosología o de los términos usados en Botánica*. Universidad Nacional de Tucumán. República Argentina, Tucumán: 123.
- Narbona, E.; Buide, L.M.; Casimiro-Soriguer, I.; Del Valle, J.C. (2014). "Polimorfismos de color floral: causas e implicaciones evolutivas". *Ecosistemas* 23(3): 36 - 47.
- O'Donnell, C.A. (1959). "*Las especies americanas de Ipomoea L. sect. Quamoclit (Moench) Griseb*". *Lilloa* XXIX. Universidad Nacional de Tucumán. República Argentina, Tucumán 29: 222.
- Ott, S.C.; Jenett-Siems, K.; Siems, K.; Müller, F.; Hilker, M.; Eich, E. (2013). "Ipveluntine, 7b-acetoxy-2a-(tigloyloxy)tropane, an unusual tropane alkaloid from *Ipomoea velutina* R. Br. (Convolvulaceae)". *Scientia Pharmaceutica* 81: 543-548.
- Pio Font Quer (1953). *Diccionario de Botánica*. Editorial Labor. España. Barcelona (1ª ed.): 1244 pp.
- Pio Font Quer (2009). *Diccionario de Botánica*. Península, España, Barcelona (4ª ed.): 959.
- Power, F.B.; Rogerson, H. (1908). "Chemical examination of *Ipomoea purpurea*". *The welcome Chemical Research Laboratories*. England. London E.C.:1-36
- Sahanmukha, S.R.; Leela, M. (1993). "Seed morphology (LM and SEM) in some *Ipomoea* L. (Convolvulaceae)". *Feddes Repertorium* 104. 3-4: 209-213.
- Schultes, R.E.; Hofmann, A. (2000). *Plantas de los Dioses: Las fuerzas mágicas de las plantas alucinógenas*. Solar, México, D. F. (2ª ed.): 45.
- Steiner, U.; Leistner, E. (2012). "Ergoline alkaloids in convolvulaceous host plants originate from epibiotic clavicipitaceous fungi of the genus *Periglandula*". *Fungal Ecology* 5: 316-321
- Vasconcelos, L.V.; Dias Saba, M.; Ramos Junquera, M.E.; Simão-Bianchini, R. (2015). "Morfología polínica de espécies das tribos Ipomoeae Hallier f. e Merremieae D.F. Austin (Convolvulaceae) ocorrentes numa região de ecótono do município de Caetite, BA, Brasil". *Hoehnea* 42 (2): 253-264.
- Zarlavsky G.E. (2014). *Histología vegetal. Técnicas simples y complejas*. Soc. Argentina de Botánica, Buenos Aires: 198 pp.
- Zuloaga, F. O., Morrone, O.; Belgrano, M. J. (2008). Catálogo de las plantas vasculares del cono sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/Generos.asp?Letra=M> (Consulta: 26 de septiembre de 2016).

Estudio químico de *Baccharis punctulata*

María Dolores González*, Celia María Luis

Universidad Nacional de Luján. Departamento de Ciencias Básicas, carrera Ingeniería Agronómica, área Química Agrícola. República Argentina.

*Autor a quien dirigir la correspondencia: doloresg@unlu.edu.ar

Resumen

Baccharis L. es un género de distribución exclusivamente americana, el más rico en especies dentro de la tribu Astereae de la familia Compositae (Asteraceae). Apenas la mitad de sus especies ha sido estudiada químicamente. En la Argentina se encuentran 96 especies agrupadas en 15 secciones. *Baccharis punctulata* DC, es una especie nativa, común en la provincia de Buenos Aires y únicamente se encuentra descripta en forma parcial la composición del aceite esencial de sus hojas. El objetivo del trabajo fue investigar los metabolitos secundarios en hojas y flores masculinas y femeninas de *B. punctulata* (dioica). Los materiales vegetales fueron recolectados en los alrededores de Luján (provincia de Buenos Aires). Como métodos de aislamiento se utilizaron las técnicas clásicas de extracción, fraccionamiento y cromatografía en sílicagel y Sephadex LH-20. Los aceites esenciales se obtuvieron por arrastre con vapor y fueron analizados por CG-MS. Los compuestos aislados se identificaron por espectroscopía UV, IR, ¹H- y ¹³C-RMN y experimentos de correlación 2D. El screening inicial mostró la presencia de terpenos y polifenoles y la ausencia de alcaloides pirrolizidínicos. El estudio fitoquímico de los capítulos masculinos de *B. punctulata* condujo a la identificación de algunos de los principales polifenoles en su extracto etanólico: los ácidos 3,4- y 4,5-dicafeoilquínicos y el 3-O- α -L-arabinopiranosido de quercetina (guaijaverina) entre otros glicósidos de quercetina, que se informa por primera vez en el género *Baccharis*. Se demostró la actividad antiplaca dental de guaijaverina, aislada del "guayabo" (*Psidium guajava* L. - Myrtaceae -). Teniendo en cuenta estos antecedentes se estudió la composición de los aceites esenciales de *B. punctulata* y junto con los otros metabolitos se analizó la actividad antiplaca dental. Se comparó, además, la composición de las flores y de las hojas, en el momento de la floración y en el estado vegetativo, detectándose un interesante compuesto y una notable variación estacional.

Chemical Study of *Baccharis punctulata*

Summary

Baccharis L. is the most species-rich genre inside the tribe Compositae (Astereae) of the family Asteraceae, but scarcely the half of its species has been chemically studied. They are found exclusively in America. In Argentina, 96 species grouped in 15 sections can be found. *Baccharis punctulata* DC is a native, common species in the province of Buenos Aires but only the composition of the essential oil of the leaves has been partially reported. The aim of this work was to investigate the secondary metabolites in leaves and male and

Palabras clave: *Baccharis punctulata* - guaijaverina - agente antiplaca dental - sesquiterpenos volátiles.

Key words: *Baccharis punctulata* - guaijaverin- antiplaque agent - volatile sesquiterpenes.

females flowers of the dioecius species *B. punctulata*. Plant materials were collected in Luján's surroundings (Buenos Aires) and classified. Classic methodology of extraction, fractioning and isolation by chromatography in silicagel and Sephadex LH-20 were used. The essential oils were obtained by steam distillation and analyzed by CG-MS. The isolated compounds were analyzed by UV, IR, ¹H - and ¹³C-NMR and of 2D correlation experiments. The initial screening showed the presence of terpenes and polyphenols and the absence of pirrolizidinic alkaloids. Phytochemical study of the male flowers of *B. punctulata* allowed the identification of some of the main polyphenols of the ethanolic extract: 3,4- and 4,5-dicaffeoylquinic acids and quercetin 3-O- α -L-arabinopiranoside (guajaverin) among other quercetin glycosides, and it is reported for the first time in *Baccharis*. Guajaverin was isolated previously of the guava tree (*Psidium guajava* L. - Myrtaceae -) and has demonstrated high potential as antiplaque agent. Given these precedents and a possible synergistic action of metabolites in the antiplaque activity, the study of *B. punctulata* went also to the essential oils. Essential oil composition of flowers and leaves in flowering and vegetative stages was compared. An interesting compound and a notable seasonal variation were detected.

Introducción

El género *Baccharis* L. es el más rico en especies dentro de la tribu Astereae de la familia Compositae (Asteraceae) estimándose en 400 a 500 especies, de las cuales sólo aproximadamente la mitad ha sido estudiada químicamente. Su distribución geográfica es exclusivamente americana. En la Argentina se encuentran 96 especies agrupadas en 15 secciones (Giuliano, 2001). Muchos mono-, sesqui- y diterpenos han sido descritos en el género (Zdero y col., 1986; Jakupovic y col., 1990).

Baccharis punctulata DC es una especie nativa, dentro del grupo de plantas que se denominan vulgarmente "chilcas", común en la provincia de Buenos Aires. Sin embargo, de *B. punctulata* se ha reportado, en forma parcial, únicamente la composición del aceite esencial de sus hojas (Schosler y col., 2009).

En la actualidad se buscan metabolitos secundarios de las plantas que puedan ser alternativas naturales para los antibióticos y antifúngicos sintéticos, a los que los microorganismos van desarrollando resistencia. Este tipo de actividades se han encontrado en algunas especies del género *Baccharis* (Rahalison y col., 1995; Johann y col., 2012; Valarezo y col., 2013; Pereira y col., 2016)

Dado que *B. punctulata* es una especie aún no investigada, el objetivo de este trabajo es revisar sus principales familias de metabolitos secundarios, aislar e identificar compuestos, tanto en los extractos como en su aceite esencial y entonces evaluar sus posibles actividades.

Material vegetal

Los ejemplares vegetales fueron recolectados en los alrededores de Luján (provincia de Buenos Aires) y clasificados por el Daniel Giuliano (UNLP), comenzándose con el estudio de hojas y flores de plantas masculinas de *B. punctulata*. La recolección de las flores tuvo lugar en otoño y la de las hojas en primavera y otoño.

Parte experimental

Investigación fitoquímica de las principales familias de compuestos

La presencia de alcaloides se investigó realizando un extracto metanólico de 2 g de flores masculinas, que se concentró, se llevó a pH = 1 y se extrajo con Cl₂CH₂. La solución acuosa ácida se dividió en dos partes. A una de ella se la trató con Zn en polvo (4 horas, con agitación a temperatura ambiente) y se filtró. Luego, las dos soluciones acuosas se llevaron a pH = 11 y se extrajeron con Cl₂CH₂. Los extractos clorofórmicos concentrados se analizaron por cromatografía en capa delgada (CCD) en silicagel, revelando con el reactivo de Dragendorff.

La presencia de polifenoles y terpenos se investigó en un extracto metanólico de 2 g de flores masculinas, concentrado y diluido con agua, al que se le realizaron extracciones sucesivas con Cl₂CH₂, acetato de etilo y n-butanol. La presencia de esos compuestos se verificó por CCD, con distintas fases móviles, de acuerdo con las distintas

polaridades, se reveló con el reactivo FeCl_3 para polifenoles y anisaldehído/ H_2SO_4 , para detectar terpenos.

Obtención de los aceites esenciales de hojas

Los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación, analizados por GC (Shimadzu Gas Chromatograph 2010, columna Equity-5, detector de ionización de llama, con temperatura programada) y por CG-MS (Shimadzu QP-2010 Plus, Gas Chromatograph, columna Equity-5), identificando los compuestos según sus espectros de masas y sus índices de retención (IR) (Babushok y col., 2011) respecto a la serie de hidrocarburos normales. La composición porcentual de los aceites se obtuvo por el método de normalización de las áreas de los picos de GC, sin usar factores de corrección.

Identificación de compuestos no volátiles

Se utilizaron técnicas usuales de extracción sobre flores masculinas y hojas frescas (etanol a temperatura ambiente, fraccionamiento posterior por partición agua/ Cl_2CH_2) y cromatografías en sílicagel y Sephadex LH-20. Los polifenoles se identificaron por espectroscopía UV, ^1H y ^{13}C -RMN de 600 MHz y experimentos de correlación 2D (realizado por Lucas Fabián del Servicio de Resonancia Magnética Nuclear, IQUIMEFA, Universidad de Buenos Aires - CONICET.). Las fracciones se analizaron por HPLC-DAD en un HPLC Waters Alliance 2695 (Waters Corp. MA, USA), equipado con un detector de arreglo de diodos PDA 2996, en columna Phenomenex Luna C 18 $5\mu\text{m}$ de 250 mm, con una fase móvil con gradiente de concentración entre A: H_3PO_4 0,25% y B: CH_3CN (Zhu y col., 2013).

Resultados

Los ensayos para alcaloides pirrolizidínicos y sus N-óxidos en las flores masculinas resultaron negativos. Los ensayos para terpenos y polifenoles resultaron positivos.

La investigación comenzó con los polifenoles presentes en la porción acuosa de los extractos metanólicos obtenidos de las flores masculinas. Una de las fracciones cromatográficas purificadas resultó ser una mezcla 3:2 de ácidos 3,5- y 4,5-di-

cafeoilquínicos según señales de RMN de 600 MHz y comparación con bibliografía (Pauli y col., 1998; Wan y col., 2017), observando el desplazamiento a campos más bajos que presenta el protón de la posición esterificada del ácido quínico, debido a la acilación. Varias señales aparecieron parcialmente superpuestas en las mismas regiones, pero el hecho de presentarse ambos compuestos en una mezcla aproximadamente 3:2 favoreció la identificación de las señales.

En otra fracción se identificó quercetina 3-*O*- α -arabinopiranosido (guaijaverina) según sus espectros ^1H - y ^{13}C -RMN de 600 MHz. Las constantes de acoplamiento observadas, los experimentos de correlación 2D y la comparación con los datos bibliográficos de otros glicósidos con pentosas, tanto en forma piranósica como furanósica, indicaron la unidad arabinopiranosídica. Otras fracciones, que aún no lograron purificarse, se investigaron por HPLC-DAD. En ellas se observa que entre los polifenoles de *B. punctulata* también se encuentra ácido clorogénico (ácido 3-*O*-cafeoilquínico, comparado con estándar) junto a otros picos de igual espectro UV que podrían asignarse inicialmente a otros ácidos monocafooilquínicos, todos a pequeños tiempos de retención en el sistema cromatográfico. A tiempos de retención grandes, además de los 3,5- y 4,5- disustituídos identificados, se detectan otros ácidos dicafooilquínicos, reconocidos tentativamente por su espectro UV. Continúa también en estudio la identificación de otros 3-*O*-glicósidos de quercetina presentes en el cromatograma a tiempos de retención intermedios, detectados por su espectro UV característico.

Quercetina-3-*O*-arabinopiranosido (1). UV: 258 nm, 296 nm (sh), 350 nm. ^1H -RMN, 600 MHz (acetona- d_6): 7,88 (d, J:2Hz, 1H, H-2''); 7,69 (dd, J: 7 y 2Hz, 1H, H-6'); 6,97 (d, J:2Hz, 1H, H-6); 6,89 (d, J:2Hz, 1H, H-8); 6,53 (d, J:7Hz, 1H, H-5'); 5,29 (d, J:6Hz, 1H, H-1''); 3,96 (dd, J=6 y 5,8 Hz, H-2''); 3,86 (m, J=3,5, 3 y 2 Hz, H-4''); 3,81 (dd, J= 3,5 y 12 Hz, H-5''e); 3,74 (dd, J= 3 y 5,8 Hz, H-3''); 3,46 (dd, J= 2 y 12 Hz, H-5''a). Asignaciones corroboradas por experimentos NOESY y HMBC .

Ácido 3,5-dicafooilquínico (2): UV: 245 nm, 298nm (sh), 327 nm, ^1H -RMN, 600 MHz (acetona- d_6): 2,14-2,35 (m, 2H, H-2 ax y H-2ec), 5,13 (da, 1H, H-3), 4,01 (d,1H, H-4), 5,43 (ddd, 1H, H-5), 2,14-2,35

(m, 2H, H-6 ax y H-6 ec), 7,18 (2 sa, 2H- H 2' y 2''), 6,8 (2 d J=8Hz, 2H, H 5' y 5''), 7,02 (2 d J=8Hz, 2H, H 6' y 6''), 7,62/7,58 (2 d, J=16 Hz, 2H, H-7' y 7''), 6,34/6,27 (2 d, J=16 Hz, 2H, H-8' y 8'')

Ácido 4,5-dicafeoilquínico (3): UV: 245 nm, 298nm (sh), 327 nm, $^1\text{H-RMN}$, 600 MHz (acetona- d_6): 2,16-2,32 (m, 2H, H-2 ax y H-2ec), 4,44 (da, 1H, H-3), 5,18 (d, 1H, H-4), 5,72 (ddd, 1H, H-5), 2,14-2,35 (m, 2H, H-6 ax y H-6 ec), 7,12 (2 sa, 2H- H 2' y 2''), 6,8 (2 d J=8Hz, 2H, H 5' y 5''), 7,0 (2 d J=8Hz, 2H, H 6' y 6''), 7,57/7,52 (2 d, J=16 Hz, 2H, H-7' y 7''), 6,28/6,21 (2 d, J=16 Hz, 2H, H-8' y 8'')

Se comparó la composición del aceite esencial obtenido de las hojas de *B. punctulata* y *B. dracunculifolia* cosechadas en marzo de 2017 cuando las plantas estaban en flor y la de hojas de *B. punctulata* cosechadas en septiembre de 2017 (sin floración). Los resultados aparecen en la tabla 1. Los compuestos presentes en el aceite esencial de los materiales cosechados en otoño corresponden aproximadamente a los compuestos publicados por otros autores (Schosler y col., 2009). Pero la composición del aceite esencial de las hojas de *B. punctulata* cosechadas en septiembre presentó una composición diferente. Ésta, en comparación, no presenta prácticamente monoterpenos y tiene un 45 % de un compuesto no identificado (M^+ 216 (63,5%) y m/e 201(PB); IR 1562 cm^{-1}), posiblemente un sesquiterpeno monooxygenado ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}$), muy poco polar con señal en IR para un grupo furano, este compuesto se encuentra en estudio. En hojas de la misma planta en época de floración (otoño), el 24 % de los componentes son monoterpenos, un 46 % aldehídos y cetonas bencénicas y un 28 % corresponde a sesquiterpenos. Para hoja de *B. dracunculifolia* cosechada en floración, el porcentaje de monoterpenos es 7 % y el de sesquiterpenos, un 90 % (Tabla 1).

Discusión y Conclusiones

B. punctulata es una especie nativa aún no estudiada y por ello, resulta interesante investigar sus metabolitos secundarios y las potenciales actividades de sus extractos, compuestos y aceites esenciales.

El ácido clorogénico y los ácidos 3,4- y 4,5-dicafeoilquínicos se informan en *B. punctulata*

por primera vez, pero fueron encontrados en otras especies del género (Aboy y col., 2012). Otros cafeoil-derivados del ácido quínico de *B. punctulata* se siguen analizando para su completa caracterización.

Este trabajo es el primer reporte de quercetina 3-*O*-arabinopiranosido (guaijaverina) en *B. punctulata* y en el género *Baccharis*, al igual que respecto a otros 3-*O*-pentósidos de quercetina que, según los tiempos de retención y espectros UV por medio de HPLC-DAD, se estiman existen en el extracto estudiado. Guaijaverina ha sido aislada de "guayaba" (*Psidium guajava* L. - Myrtaceae -) y se ha descrito que posee actividad contra *Streptococcus mutans* y los biofilms que producen la placa dental (Prabu y col., 2006). De acuerdo con la bibliografía, el aceite esencial de *B. dracunculifolia* presenta actividad antimicrobiana, en especial, contra los microorganismos responsables de la placa dental (Pereira y col., 2016) y, además, coexiste en el mismo ambiente natural que *B. punctulata*.

El perfil de la composición de los aceites esenciales de ambas especies en época de floración (otoño) es diferente (Tabla 1); nerodiol es el compuesto más abundante en *B. dracunculifolia* mientras que compuestos como acetofenona y metil benzaldehído son los más abundantes en las hojas de *B. punctulata*. Se ha analizado también la composición del aceite esencial de las hojas de *B. punctulata* en estado vegetativo (primavera) donde se advierte un predominio de compuestos sesquiterpénicos y, en particular, de una estructura sesquiterpénica con el 45 % de abundancia, con un espectro de masas particular (M^+ 216 abundante y m/z 201, PB), muy insaturada ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}$) y muy poco polar, con una señal en 1562 cm^{-1} en su espectro IR. Las propiedades mencionadas sugieren una estructura furano, como se presenta, por ejemplo, en el verboccidentafurano (Mr 216), furo-cadinano componente del aceite esencial de *Baccharis salicina* Torr. & A.Gray (ex *B. salicifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.) (Jakupovic y col., 1990; Loayza y col., 1995). Las variaciones estacionales de la composición de aceite esencial son un fenómeno adaptativo y por ello resulta aún más interesante continuar el análisis de las diferentes composiciones y de las posibles actividades farmacológicas.

Tabla1.- Composición porcentual de los aceites esenciales obtenidos de *Baccaris dracunculifolia* y *B. punctulata*

IR (fase 5% fenil)	Compuestos	<i>B. dracunculifolia</i>		<i>B. punctulata</i>	
		Hoja otoño	Hoja otoño	Hoja otoño	Hoja primavera
928	alfa-pineno	1,43	2,35		nd
972	beta-pineno	4,89	1,85		nd
991	mirceno	0,28	2,71		nd
1029	limoneno	0,88	7,56		0,15
1060	acetofenona	nd	18,71		nd
1063	2-metilbenzaldehído	nd	21,43		nd
1075	3-metilbenzaldehído	nd	6,18		nd
1217	trans-carveol	nd	0,79		nd
1241	carvona	nd	1,55		nd
1338	delta-elemeno	4,52	nd		11,85
1393	beta-elemeno	1,25	nd		4,07
1421	(E)-cariofileno	4,57	nd		1,20
1434	germacreno B	nd	nd		1,22
1457	beta-farneseno	nd	nd		1,82
1483	germacreno D	8,57	1,11		8,14
1498	biciclogermacreno	6,33	0,51		0,86
1501	beta-bisaboleno	nd	nd		3,22
1524	delta-cadineno	nd	nd		1,32
1534	muuroleno	nd	nd		1,13
1560	sesquiterpeno	nd	nd		1,03
1565	nerolidol	20,36	1,10		nd
1569	espatulenol	8,49	4,32		nd
1574	cariofileno oxido	nd	6,50		nd
1595	sesquiterp. oxig.	2,80	nd		nd
1601	6-metil-alfa ionona	nd	nd		2,79
1632	sesquiterp. oxig	nd	3,30		nd
1636	alfa-terpinoleno	nd	nd		4,53
1637	cis-cadin-4-en-7-ol	nd	nd		nd
1646	delta-cadinol	nd	nd		3,50
1654	alfa-cadinol	nd	nd		1,05
1667	sesquiterp oxig.	nd	nd		45,13
1686	alfa-bisabolol	1,72	1,53		1,71
1700	valerenal	nd	nd		3,11
1721	sesquiterp. oxig.	11,04	2,75		nd
1964	sesquiterp. oxig.	7,44	3,04		nd
2077	sesquiterp. oxig.	nd	1,03		nd
2140	sesquiterp. oxig.	2,93	nd		nd
2148	sesquiterp. oxig.	3,30	nd		nd
	TOTAL	90,80	88,30		97,85

Referencias bibliográficas

- Aboy, A.L.; Apel, M.A.; Debenedetti, S.; Francescato, L.; Rosella, M.A.; Henriques, A.T. (2012). "Assay of caffeoylquinic acids in *Baccharis trimera* by reversed-phase liquid chromatography". *J Chromatogr A*. 1219 (6): 147-53.
- Babushok, V.I.; Linstrom, P.J.; Zenkevich, I.G. (2011). "Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils" *J. Phys. Chem. Ref. Data* 40 (4): 043101/47.
- Giuliano D.A. (2001). "Clasificación Infragenérica de las Especies Argentinas *Baccharis* (Asteraceae, Astereae)". *Darwiniana* 39(1-2): 131-54
- Jakupovic, J.; Schuster, A.; Ganzer, U.; Bohlmann, F.; Boldt, P. E. (1990). "Sesqui- and Diterpenes from *Baccharis* Species". *Phytochemistry* 29 (7): 2217-2222.
- Johann, S.; Oliveira, F.B.; Siqueira, E.P.; Cisalpino, P.S.; Rosa, C.A.; Alves, T.M.; Zani, C.L.; Cota B.B. (2012). "Activity of compounds isolated from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) against *Paracoccidioides brasiliensis*". *Med Mycol.* 50(8): 843-51.
- Loayza, I.; Abujder, D.; Aranda, R.; Jakupovic, J.; Collin, G.; Deslauriers, H.; Jean F. (1995). "Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*". *Phytochemistry* 38 (2): 381-385.
- Pauli, G.F.; Poetsch, F.; Nahrstedt, A. (1998). "Structure Assignment of Natural Quinic Acid Derivatives using Proton Nuclear Magnetic Resonance Techniques", *Phytochem. Analysis* 9: 177-185.
- Pereira, C.A.; Pereira Costa, A.C.B.; Liporoni, P.C.S.; Rego, M.A.; Jorge, A.O.C. (2016). "Antibacterial activity of *Baccharis dracunculifolia* in planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus mutans*". *J. of Infection and Pub.Health* 9 (3): 324-330.
- Prabu, G.; Gnanamani, A.; Sayeed, S. (2006). "Guajaverin - A plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*". *J. of Applied Microb* 101:487-495.
- Rahalison, L.; Benathan, M.; Monod, M.; Frenk, E.; Gupta, M.P.; Solis, P.N.; Fuzzati, N.; Hostettmann, K. (1995). "Antifungal principles of *Baccharis pedunculata*". *Planta Medica* 61(4): 360-362.
- Schossler, P.; Schneider, G.L.; Wunsch, D.; Gonçalves Soares, G. L.; Alcaraz Zini, C. (2009). "Volatile Compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using Solid Phase Microextraction and Hydrodistillation". *J. Braz. Chem. Soc.* 20(2): 277-287.
- Valarezo, E.; Rosillo, M.; Cartuche, L.; Morocho, V.; Malagon, O.; Meneses, M.A. (2013). "Chemical composition, antifungal and antibacterial activity of the essential oil from *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae) from Loja, Ecuador" *J. of Ess.Oil Res.* 25(3): 233-238.
- Wan, C.; Shanshan, L.; Liu, L.; Chen, C.; Fan, S. (2017). "Caffeoylquinic acids from the aerial parts of *Chrysanthemum coronarium*". *Plants* 2017, 6: 10-15.
- Zdero, C.; Bohlmann, F.; King, R.M.; Robinson, H. (1986). "Diterpene glycosides and other constituents from Argentinian *Baccharis* species" *Phytochemistry* 25(12): 2841-2855
- Zhu, Y.; Liu, Y.; Zhan, Y.; Liu, L.; Xu, Y.; Xu, T.; Liu, T. (2013). "Preparative Isolation and Purification of Five Flavonoid Glycosides and One Benzophenone Galloyl Glycoside from *Psidium guajava* by High-Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC)". *Molecules*, 2013, 18: 15648-15661.

Compuestos antifúngicos en *Prosopis ruscifolia*: identificación y análisis de su utilidad en el control de especies toxigénicas de *Aspergillus*

Analía de los Ángeles Gómez^{1*}, Diego Alejandro Sampietro¹, Tsvetelina Mandova²,
Raphael Grougnet², Marina Kritsanida², Marta Vattuone¹

¹LABIFITO. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.

²Laboratoire de Pharmacognosie, UMR/CNRS 8638 COMETE, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie de Paris. France.

*Autor a quien dirigir la correspondencia: analiagomez_3@hotmail.com

Resumen

Se requieren nuevos agentes antifúngicos capaces de controlar a los hongos del género *Aspergillus* que provocan pudriciones en maíz especialmente en los granos almacenados, contaminándolos con aflatoxinas (Ni). La ingestión de estas micotoxinas puede ocasionar intoxicaciones en humanos y animales. El control químico de especies de *Aspergillus* se restringe al uso de preservantes de grado alimenticio, los cuales son fungistáticos, pueden alterar las características organolépticas del grano y en dosis subinhibitorias del crecimiento micelial pueden estimular la producción de aflatoxinas. Plantas autóctonas del Noroeste de Argentina (NOA) conocidas popularmente por sus propiedades antisépticas podrían proveer metabolitos secundarios capaces de detener el progreso de estos hongos. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica de extractos de "vinal" (*Prosopis ruscifolia*) sobre especies de *Aspergillus* e identificar los metabolitos responsables. Partes aéreas de *P. ruscifolia* se extrajeron secuencialmente con hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol. La actividad antifúngica de estos extractos se ensayó sobre seis cepas de *Aspergillus* por bioautografía de siembra puntual y por microdilución, lo que permitió determinar que solo el extracto metanólico (fMeOH) presentó actividad antifúngica sobre las especies de *Aspergillus* ensayadas. Las dosis mínimas inhibitorias del crecimiento fúngico (DIM) fueron de 50-200 µg/ml y las concentraciones inhibitorias del 50 % y 100 % del crecimiento fúngico (CI₅₀ y CIM) fueron 60-297 µg/ml y 50-1500 µg/ml respectivamente. Los constituyentes del fMeOH se separaron mediante cromatografía en columna de sílica gel y por cromatografía preparativa en capa fina. Las moléculas antifúngicas se estudiaron mediante revelados específicos en cromatografía en capa fina y por espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), identificándose los compuestos como alcaloides (juliflorina y juliprosineno), un ciclitol (pinitol) y una saponina triterpénica. El fMeOH de parte aéreas de *P. ruscifolia* no manifestó toxicidad sobre *Artemia salina* (CL₅₀ > 1000 ppm), lo cual indica que el extracto no presenta citotoxicidad en eucariontes.

Antifungal Compounds in *Prosopis ruscifolia*: Analysis and Identification of its Use to Control Toxigenic Species of *Aspergillus*

Summary

New antifungals are needed to control *Aspergillus* which contaminates stored maize grains with aflatoxins toxic for humans and animals. Food additives are applied against the *Aspergillus* species. Nevertheless, they

Palabras clave: *Prosopis ruscifolia* - *Aspergillus* - antifúngicos.

Keywords: *Prosopis ruscifolia* - *Aspergillus* - antifungics.

are fungistatic, can change grain organoleptic properties and can stimulate aflatoxin production at sub-inhibitory levels. Native plants used in popular medicine as antiseptics could provide antimicrobials useful in the control of *Aspergillus*. The aim of this work was to determine the antifungal activity of extracts from “vinal” (*Prosopis ruscifolia*) against *Aspergillus* species and to identify its antifungal metabolites. Aerial parts of *P. ruscifolia* were sequentially extracted with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol. Antifungal activity of these extracts was tested against six strains of *Aspergillus* by dot blot bioautography and the microdilution method. These data were used to calculate the minimum inhibitory dose of fungal growth (MID) and the concentrations required to inhibit 50 % (IC_{50}) and 100 % (MIC) of the fungal growth. Constituents of the bioactive extract was separated by column chromatography and preparative thin layer chromatography (PTLC) in silica gel. Antifungal molecules were preliminarily identified by TLC and subsequently by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Only the methanolic extract showed antifungal activity against *Aspergillus* strains (IC_{50} of 60-297 $\mu\text{g/ml}$; MIC 50-1500 $\mu\text{g/ml}$). **Antifungal components were identified as alkaloids (juliflorine and prosopiflorine), cyclitol (pinitol) and triterpene saponins.**

Introducción

La Argentina es el segundo exportador mundial de maíz. Para la campaña 2016/2017 se estima una cosecha record de este cereal de 31,5 millones de toneladas con un área sembrada de 4,2 millones de hectáreas (USDA, 2016; Fandos y col, 2017).

Uno de los principales factores que afectan a la producción maicera es la pudrición de granos generada por especies del género *Aspergillus* de las secciones *fumigatis* (*A. fumigatus*), *nigri* (*A. niger*) y *flavi* (*A. nomius*, *A. flavus* y *A. parasiticus*) (Figura 1) (Anderson y col., 1975).

Estos organismos provocan usualmente el mayor daño en postcosecha, reduciendo el rendimiento en

grano y contaminándolo con aflatoxinas (Mitchell y col., 2016). La ingestión de estas sustancias por encima de determinadas dosis provoca toxicidad aguda con manifestación de nefritis, necrosis hepática y congestión pulmonar, o toxicidad crónica que desencadena respuestas cancerígenas, mutagénicas y teratogénicas en humanos y animales (Astoreca y col., 2011; Zain, 2011).

El control químico es una de las estrategias posibles destinadas a combatir estos hongos durante el almacenamiento de los granos, para ello se emplea sales de ácidos grasos de cadena corta (por ejemplo, sorbatos y propionatos). Estas sustancias provocan

Figura 1.- Efectos de *Aspergillus* en la producción de maíz



a: Mazorca infectada con *Aspergillus flavus*; **b:** Granos infectados con *Aspergillus niger*.

frecuentemente alteraciones organolépticas del maíz, son fungistáticas y en dosis subinhibitorias son capaces de incrementar la acumulación de aflatoxinas (Rusul y Marth, 1988).

Por lo tanto, se necesita la incorporación al mercado de nuevos agentes antifúngicos que permitan superar estos problemas. Existen plantas autóctonas del Noroeste Argentino (NOA) cuyos usos en medicina popular sugieren que las plantas contienen metabolitos antimicrobianos que podrían ser útiles en el control de *Aspergillus*. Entre ellas se destaca el “vinal” (*Prosopis ruscifolia* Griseb., Leguminosae), una planta de porte arbóreo (Figura 2) que ocupa grandes extensiones de territorio pudiendo formar bosques o vinales y es característica de la provincia fitogeográfica Chaqueña (Cabrera, 1971; Cabrera y Willink, 1980). Su madera se utiliza principalmente en la fabricación de postes, mientras que sus vainas y semillas se emplean como forrajes dado su alto valor nutricional (Freyre y col., 2003). Esta planta se utiliza en medicina popular como antiséptico, desinflamante, para el tratamiento de la conjuntivitis y en el control de la diabetes (Hurrel y col., 2011; Rondina y col., 2008; Scarpa, 2004).

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica de los extractos de *Prosopis ruscifolia* sobre especies toxigénicas de *Aspergillus* e identificar los compuestos responsables de dicha actividad.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se colectaron las partes aéreas (tallos y hojas) de *Prosopis ruscifolia* en la localidad de Icaño, departamento de Avellaneda, provincia de Santiago del Estero, en el mes de febrero de 2014. Parte del material recolectado fue herborizado y depositado en el Herbario del Instituto “Miguel Lillo”, Tucumán, Argentina, donde fue identificado y clasificado taxonómicamente por Nora Muruaga (LIL:615833)

Obtención de los extractos vegetales

El material vegetal se secó a 50 °C en estufa, se trituró con un molinillo de aspas y se almacenó al abrigo de la luz y el calor. Posteriormente, 10 g del material molido seco se extrajo secuencialmente a temperatura ambiente con hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol. Se utilizaron 100 ml de cada uno de estos solventes por cada extracción y el tiempo de inmersión del material vegetal en cada una fue de 48 horas, efectuándose agitaciones periódicas durante ese intervalo de tiempo. Cada extracto obtenido se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 4. El material vegetal se dejó secar a 50 °C durante 24 horas entre extracciones sucesivas con solventes orgánicos. El solvente se evaporó de

Figura 2.- *Prosopis ruscifolia* Griseb (Leguminosae)



a: Rama con hojas y espinas; **b:** Planta entera.

los filtrados con un evaporador rotatorio al vacío. Los extractos secos se pesaron y se calculó el rendimiento de la extracción.

Microorganismos

Se utilizaron cepas de *Aspergillus* sección *flavi* (*A. nomius*VSC23, *A. nomius*13137, *A. parasiticus* NRRL2999, *A. flavus*), sección *nigri* (*A. niger*) y sección *fumigatis* (*A. fumigatus*). Las mismas pertenecen a la micoteca del Laboratorio de Biología de Agentes Bioactivos y Fitopatógenos (LABIFITO – FBQF – UNT). Se conservaron a 4 °C y se activaron a 30 °C antes de cada ensayo. El medio de cultivo utilizado para su activación fue malta-peptona agar (MPA 1,5 % p/v de extracto de malta, 0,5 % de peptona y 1,8 % de agar para medio sólido y 0,6 % de agar para medio semisólido).

Determinación de actividad antifúngica

Bioautografía por siembra puntual (Quiroga y col, 2001)

Se sembraron puntualmente en cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ de 4 cm x 6 cm x 0,2 mm, cantidades conocidas (200-2.000 µg) de cada extracto ensayado. El control negativo consistió en la siembra del mayor volumen de solvente utilizado en las siembras anteriormente mencionadas. Como control positivo se utilizó ketoconazol (20 µg). Los cromatofolios sembrados posteriormente se cubrieron con 3 ml de medio maltosa -peptona- agar (MPA) semisólido conteniendo una suspensión de esporas (1 x 10⁴ esporas/ml). Las bioautografías se incubaron a 30 °C durante 48 horas. Luego, se aplicó sobre las bioautografías el 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio (MTT).

La ausencia de crecimiento fúngico se manifestó por la aparición de halos de color amarillo sobre un fondo azul. La superficie de estos últimos se cuantificó utilizando el programa Fiji win 32.

Mediante este ensayo se determinó la dosis de extracto requerida para inhibir el 100 % del crecimiento fúngico (DIM).

Ensayo de microdilución en medio semilíquido

Los extractos que mostraron actividad antifúngica en el ensayo de siembra puntual precedentemente descrito, se sometieron a ensayos de microdilución

siguiendo un protocolo sugerido por el Comité Nacional para Estándares Clínicos de Laboratorio NCCLS (por sus siglas en inglés, National Committee for Clinical Laboratory Standards) modificado. Se emplearon microplacas estériles de 96 pocillos con fondo plano y medio YES semilíquido (Medina y col, 2012). La solución *stock* de cada extracto se preparó en DMSO y se utilizó para preparar la máxima concentración a ensayar. El inóculo fúngico consistió en una suspensión de esporas en medio de extracto de levadura-sacarosa (YES) semilíquido de concentración 1 x 10⁵ esporas/ml. Se obtuvo una concentración final de 2 % de DMSO por pocillo, ensayándose cada extracto en un rango de concentraciones de 3000-87,5 µg/ml. Se incluyeron un control de crecimiento consistente en medio YES (composición en g/l: extracto de levadura 20; sacarosa 150; MgSO₄ 0,5; agar 1,3) con DMSO al 2 % y controles de esterilidad de los extractos y del medio de cultivo. Como control positivo se usó ketoconazol. Las microplacas se incubaron durante 72 horas a 30 °C. Posteriormente se registró la absorbancia a 630 nm con un lector de microplacas Biotek Elx800.

Las lecturas se corrigieron utilizando las de los correspondientes controles. Cada ensayo se hizo por triplicado. La concentración de extracto requerida para inhibir el 50 % (CI₅₀) y el 100 % (CIM) del crecimiento fúngico se determinó por el método Probit usando el programa XLSTAT 2009.

Aislamiento de constituyentes antifúngicos de *P. ruscifolia*

Cromatografía en columna de sílica gel

El extracto bioactivo se secó bajo presión reducida en un evaporador rotatorio. El residuo seco se disolvió en una mezcla cloroformo-metanol (8:2 v/v) y se sembró en una columna empaquetada con sílica gel la cual se eluyó con un gradiente de cloroformo: metanol (8,0:2,7:3,6:4,1:1,0; v/v). Las fracciones recuperadas se analizaron mediante cromatografía en capa fina (CCF) en sílica gel, utilizando acetato de etilo/ácido fórmico/agua (65:15:10, v/v/v) como fase móvil. Los cromatogramas se visualizaron bajo luz UV (254 nm y 365 nm), y se revelaron con *p*-anisaldehído. Las fracciones se combinaron en grupos teniendo en cuenta los patrones de bandas observados en los cromatogramas. Se evaluó la actividad antifúngica de los cromatogramas por

bioautografía de siembra puntual sobre *A. flavus* y *A. niger* (Choma y Grzelak, 2011).

Cromatografía preparativa en capa fina (CPCF)

La fracción antifúngica obtenida por cromatografía en columna de sílica gel se sometió a cromatografía preparativa en capa fina (CPCF) utilizando como fase fija sílica gel 60 F₂₅₄ de 2 mm de espesor. Las restantes condiciones cromatográficas fueron similares a las descritas precedentemente para CCF. Las bandas correspondientes a los componentes de diferente relación de frente (Rf) obtenidas se rasparon del cromatograma y el polvo obtenido de cada una se colocó en tubos con metanol, se homogenizó con vórtex y se dejó reposar 24 horas. Luego se centrifugó y se rescató el sobrenadante. Este último se filtró a través de 280 mg de sílica gel empaquetados en una pipeta Pasteur.

Identificación de los constituyentes antifúngicos de *P. ruscifolia*

Se determinó la naturaleza química de los constituyentes aislados mediante CCF luego de revelarlos con los siguientes reactivos cromogénicos: vainillin/ac.sulfúrico (terpenos–derivados fenilpropanoides), Dragendorff (alcaloides), *p*-anisaldehído (compuestos triterpénicos y esteroidales) AgNO₃/NaOH (azúcares y ciclitoles).

La estructura de algunos de los compuestos obtenidos fueron identificados por experimentos de espectrometría de resonancia magnética nuclear monodimensionales (1H RMN,) y bidimensionales (1H-1H COSY, 1H-13C HSQC) y experimentos de espectrometría de masa (MS).

Toxicidad sobre *Artemia salina*

Se determinó la concentración letal media (CL₅₀) del extracto bioactivo de *P. ruscifolia* sobre *Artemia salina*. Se colocaron quistes de *A. salina* en una cuba con agua de mar (con 3,8 % de NaCl). La mitad de la cuba se expuso a la luz provista por una lámpara de 60 watts. Se incubó durante 48 horas a 27 °C para la eclosión de los quistes. El residuo seco del extracto metanólico se disolvió en agua de mar ensayándose un rango de concentraciones de 3000-87,5 µg/ml. Se incluyeron un control positivo de K₂Cr₂O₇, un control de solvente y un control de viabilidad en agua de mar. Se colocaron 10 larvas en cada una de los pocillos de la microplaca con las diferentes concentraciones a ensayar y se incubó durante 18 horas a 27 °C.

El recuento de nauplis sobrevivientes se hizo bajo una lupa con un aumento de 3x, calculándose los correspondientes porcentajes de inhibición, los cuales se utilizaron para calcular CL₅₀ mediante probit. El ensayo se realizó por triplicado.

Resultados

Rendimientos obtenidos para los extractos vegetales

Se obtuvieron 4 extractos a partir del material vegetal de *P. ruscifolia*. Los rendimientos obtenidos se informan en tabla 1. La mayor recuperación de materia seca se registró para el fMeOH de *P. ruscifolia* (11,33 ± 0,05).

Tabla 1.- Rendimientos obtenidos para los extractos de las especies investigadas

Solvente	Índice de Polaridad	Rendimiento % (p/p)
n-hexano (H)	0,1	8,0
Diclorometano (dCM)	3,1	4,1
Acetato de etilo (AE)	4,4	6,4
Metanol (MOH)	5,1	11,33

Se indica en la segunda columna desde la izquierda de la tabla la polaridad de los solventes usados en la extracción de los materiales vegetales.

Tabla 2.- Actividad antifúngica del extracto metanólico de las partes aéreas de *Prosopis ruscifolia* sobre diferentes cepas de *Aspergillus*

Microorganismo	Extracto metanólico de <i>P. ruscifolia</i>			
	DIM (μg)	Halo (mm)	CI ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	CIM ($\mu\text{g/ml}$)
<i>niger</i>	200	2,13 \pm 0,004	297,7 \pm 1	> 2000
<i>nomius</i> VSC23	200	2,28 \pm 0,004	58,7 \pm 0,4	750 \pm 0,7
<i>nomius</i> 13137	200	3,23 \pm 0,004	89 \pm 1,2	1500 \pm 1,1
<i>flavus</i>	50	1,69 \pm 0,004	63 \pm 0,4	750 \pm 1,1
<i>parasiticus</i>	200	3,03 \pm 0,004	101,1 \pm 0,6	1500 \pm 0,6
<i>fumigatus</i>	200	2,13 \pm 0,004	69 \pm 0,3	1500 \pm 0,8

Se indican las dosis inhibitorias mínimas (DIM) y sus correspondientes halos, la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) y la concentración inhibitoria mínima (CIM). Control positivo: ketoconazol.

Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos vegetales

El fMeOH de *P. ruscifolia* fue el único de los 4 extractos investigados que generó halos de inhibición en bioautografías de siembra puntual en todas las cepas de *Aspergillus* ensayadas, con diámetros comprendidos entre 1,69 y 3,23 mm. Las DIM asociadas a esos halos se ubicaron en el intervalo de 50-200 μg . En el rango de concentraciones ensayado, el fMeOH inhibió el 50 % del crecimiento de todas las cepas de *Aspergillus* (CI₅₀ = 58,7.-2,97 $\mu\text{g/ml}$) y suprimió totalmente el crecimiento de 5 de las cepas (CIM 750-1500 $\mu\text{g/ml}$). Los valores de DIM, CI₅₀ y CIM registrados en los ensayos de microdilución se presentan en la tabla 2.

Aislamiento e identificación de los constituyentes antifúngicos de *P. ruscifolia*

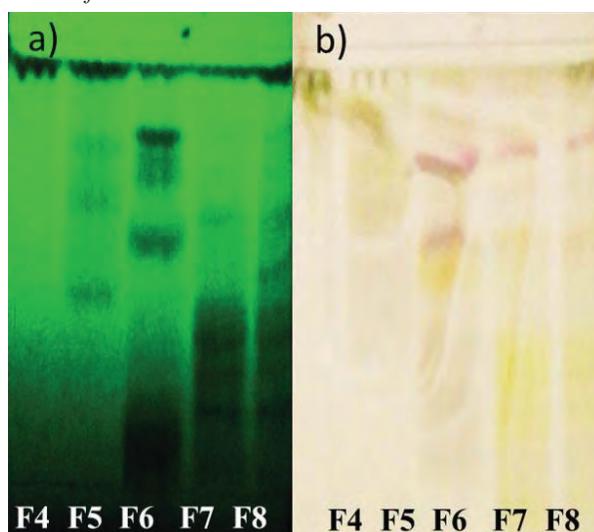
Las fracciones obtenidas por cromatografía en columna, se combinaron en 8 grupos, F1-F8 (Figura 3). F6 y F7 resultaron con actividad antifúngica mostrando F6 halos de mayor diámetro (6,2 mm para *A. flavus* y 6,1 mm para *A. niger*) que F7 (5,3 mm para *A. flavus* y 5,0 mm para *A. niger*) (Figura 4). El rendimiento de F6 fue de 7,48 \pm 0,03 % (p/p). La CCF de dicha fracción antifúngica, puso en evidencia la presencia de 5 bandas de diferentes Rfs (B1-B5) que fueron separados por cromatografía preparativa en capa fina. Los Rfs e identidad química de las bandas se muestran en la figura 5. El análisis por RMN permitió identificar la estructura de los

alcaloides como juliflorina (B2) y juliprosineno (B4) y el ciclitol (B5) como pinitol (Figura 6).

Toxicidad sobre *Artemia salina*

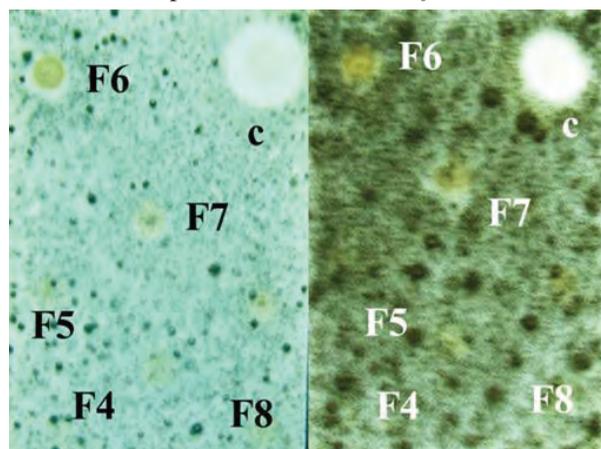
La CL₅₀ del fMeOH de *P. ruscifolia* sobre *A. salina* fue de 1829,26 $\mu\text{g/ml}$. La CI₅₀ fMeOH de *P. ruscifolia* es superior a la obtenida por preservantes alimenticios de uso comercial, lo cual significa una menor citotoxicidad que los preservantes (Tabla 3).

Figura 3.- Cromatografía en capa fina (CCF) de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de sílica gel del extracto metanólico de las partes aéreas de *P. ruscifolia*



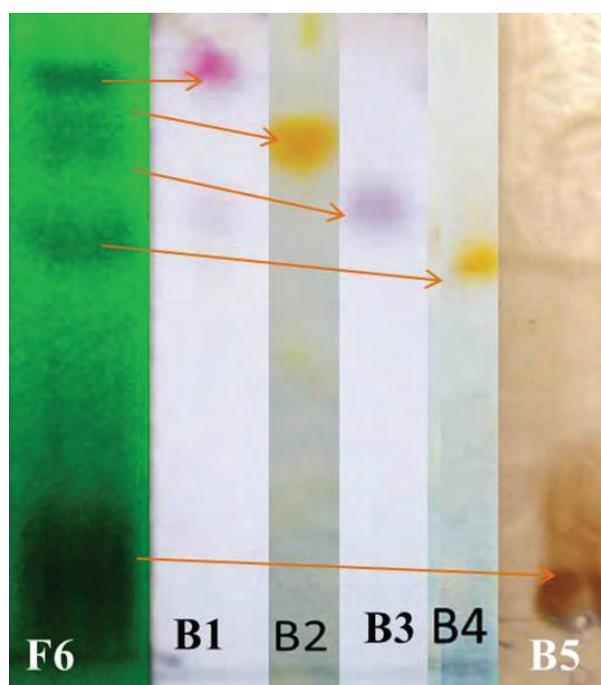
a: Observación bajo lámpara UV de 254 nm; **b:** Revelado con *p*-anisaldehído.

Figura 4.- Inhibición de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de sílica gel del extracto metanólico de las partes aéreas de *P. ruscifolia*



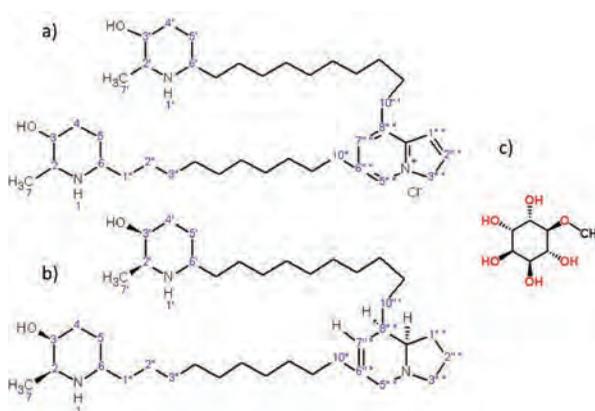
a: *Aspergillus flavus*; **b:** *Aspergillus niger*. Control (C) = ketoconazol.

Figura 5.- Cromatografía en capa fina (CCF) de los componentes obtenidos por cromatografía en CCFP de la fracción F6



F6: UV 254 nm. Revelado con *p*-anisaldehído (**B1**; Rf = 0,76) y (**B3**; Rf = 0,62). Revelado con Dragendorf (**B2**; Rf = 0,53) y (**B4**; Rf = 0,40). Revelado con AgNO₃/NaOH (**B5**; Rf = 0,20).

Figura 6.- Estructura de metabolitos los metabolitos obtenidos de la fracción F6



a: Juliflorina; **b:** Juliprosineno; **c:** Pinitol

Tabla 3.- Concentración letal 50 (CL₅₀) de los nauplii de *Artemia salina* para el extracto metanólico de *Prosopis ruscifolia* (preservantes alimenticios de uso comercial)

Muestra	CL ₅₀ (µg/ml)
Extracto metanólico de <i>P.ruscifolia</i>	1829,260 ± 0,2
Sorbato de Potasio	19,96 ± 0,3
Benzoato de sodio	< 50 ± 0,3
K ₂ Cr ₂ O ₇	25,884 ± 0,4

Se incluyeron como controles positivos benzoato de sodio, sorbato de potasio y K₂Cr₂O₇.

Discusión y Conclusiones

Si bien se conoce la actividad antibacteriana en los extractos de *P. ruscifolia*, (Salvat y col. 2004) no existen antecedentes sobre su actividad antifúngica. En nuestro trabajo se determinó que el fMeOH de *P. ruscifolia* presenta actividad antifúngica sobre todas las especies de *Aspergillus* ensayadas (DIM y CI50 50-200 µg/ml, 58,7-2,97 µg/ml, respectivamente), y suprimió totalmente el crecimiento de 5 de las cepas (CIM = 750-1500 µg/ml).

Se identificaron como posibles compuestos antifúngicos de *P. ruscifolia* dos alcaloides (juliflorina y juliprosineno), un ciclitol (pinitol) y una saponina triterpénica en la fracción bioactiva (F6) del fMeOH de *P. ruscifolia*. Juliflorina y juliprosineno fueron identificados por primera vez en *P. juliflora* y son

eficaces inhibidores de la acetilcolinesterasa en el tratamiento del Alzheimer (Choudhary y col., 2005). Existen reportes que indican su actividad antifúngica contra hongos de los géneros *Fusarium*, *Drechslera* y *Alternaria* (Raghavendra y col., 2009). Anteriormente se registró el uso efectivo del pinitol en el tratamiento de la diabetes (Sripathi y col., 2011), como larvicida (Chaubal y col., 2005) y también como antifúngico contra los hongos del género *Sphaerotheca* (Chen y Dai, 2014). No se encontraron antecedentes previos a este trabajo de actividad antifúngica frente a *Aspergillus* para ninguno de los componentes identificados.

La CL₅₀ determinada para el fMeOH de *P. ruscifolia* sobre *A. salina* fue superior a 1000 µg/ml, por lo que esta fracción carecería de citotoxicidad (Logarto Parra y col., 2001; Fernández Caliente y col., 2009).

El sorbato de potasio y el benzoato de sodio generaron valores de CL₅₀ entre 10 y 100 µg/ml, lo cual indica que ambos son más tóxicos que el fMeOH. Se está investigando la toxicidad de las sustancias identificadas y el efecto de estas sobre etapas del desarrollo fúngico que son críticas en el control de *Aspergillus*.

Los resultados sugieren que el fMeOH de *P. ruscifolia* y los metabolitos secundarios aislados de la fracción deben investigarse en mayor profundidad en cuanto a su utilidad en el control de las especies de *Aspergillus*.

Referencias bibliográficas

- Anderson, E.; Nehring, E.; Wichser, R. (1975). "Aflatoxin contamination of corn in the field". *Agric Food Chem* 23: 775-782.
- Astoreca, A.L., Dalcero, A.M., Fernández Pinto, V., Vaamonde, G. (2011). "A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section Flavi in poultry feeds". *International Journal of Food Microbiology* 146: 38-43.
- Cabrera, A. (1971). "Fitogeografía de la República Argentina". *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* XIV (1,2): 16.
- Cabrera, A.L.; Willink, A. (1980). *Biogeografía de América Latina*. 2ª edición corregida. Monografía 13. Serie de Biología. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington DC. EEUU: 120.
- Chaubal, R.; Pawar, P.V.; Hebbalkar, G.D.; Tungikar, V.B.; Puranik, V.G.; Deshpande, V.H.; Deshpande, N.R. (2005). "Larvicidal activity of Acacia nilotica extracts and isolation of D-pinitol - A bioactive carbohydrate". *Chemistry and Biodiversity* 2(5): 684-688.
- Chen, J.; Dai, G.H. (2014). "Effect of D-pinitol isolated and identified from Robinia pseudoacacia against cucumber powdery mildew". *Scientia Horticulturae* 176: 38-44.
- Choma, I.; Grzelak, E.M. (2011). "Bioautography detection in thin-layer chromatography". *Journal of Chromatography A* 1218: 2684-2691.
- Choudhary, M.I.; Nawaz, S.A.; Zaheer-Ul-Haq Azim, M.K.; Ghayur, M.N.; Lodhi, M.A.; Ahmad, V.U. (2005). "Juliflorine: A potent natural peripheral anionic-site-binding inhibitor of acetylcholinesterase with calcium-channel blocking potential, a leading candidate for Alzheimer's disease therapy". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332(4): 1171-1179.
- Fandos, C.; Carreras Baldrés, J.; Scandagliaris, P.; Soria, F.; Devani, M.; Gamboa D. (2017). "Campaña de soja y maíz 2016/2017 en Tucumán: superficie cultivada y comparación con campañas precedentes". *Reporte Agroindustrial* 136: 3-12.
- Fernández-Calientes, A.; Mendiola Martínez, J.; Monzote Fidalgo, L.; García Parra, M.; Sariego Ramos, I.; Acuña Rodríguez, D.; y col. (2009). "Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L.". *Rev. Cubana Med. Trop.* 61:254-258.
- Freyre, M.; Astrada, E.; Blasco C.; Baigorria, C.; Rozycki, V.; Bernardi C. (2003). "Valores nutricionales de frutos de vinal (*Prosopis ruscifolia*): Consumo humano y animal". *Cienc. Tecnol. Aliment.* 4(1): 41-46.
- Hurrell, A.J.; Ulibarri, E.A.; Puentes, J.P.; Buet Costantino, F.; Arenas, P.M.; Pochettino, M.L. (2011). "Leguminosas medicinales y alimenticias utilizadas en la conurbación Buenos Aires-La Plata, Argentina". *Blacpma* 10(5): 443-455.
- Logarto Parra, A.; Silva Yhebra, R.; Guerra Sardiñas, I.; Iglesias Buena, L. (2001). "Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts". *Phytomedicine* 8(5): 395-400.

- Medina, A., Lambert, R. J. W., & Magan, N. (2012). "Rapid through put analysis of filamentous fungal growth using turbidimetric measurements with the Bioscreen C: A tool for screening antifungal compounds". *Fungal Biology* 116(1): 161–169.
- Mitchell, N.J.; Bowers, E.; Hurburgh, C; Wu, F. (2016). "Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination". *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 33(3): 540-550.
- Raghavendra, M.P.; Satish, S.; Raveesha, K.A. (2009). "Alkaloid extracts of *Prosopis juliflora* (Sw .) DC . (Mimosaceae) against *Alternaria alternata*". *Journal of Biopesticide* 2(1): 56-59.
- Rusul, G.; Marth, E.H. (1988). "Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a medium at different pH values and with or without pimaricin". *Z. Lebensm Unters Forsch.* 187(5): 436-439.
- USDA Grain report: 2016 Grain and feed annual Argentina. (2016). https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Grain%20and%20Feed%20Annual_Buenos%20Aires_Argentina_4-1-2016.pdf
- Quiroga, E.N.; Sampietro, A.R.; Vattuone, M. A. (2001). "Screening antifungal activities of selected medicinal plants". *Journal of Ethnopharmacology* 74(1): 89-96.
- Rondina, R.V.D.; Bandoni, A.L.; Coussio J.D. (2008). "Especies medicinales argentinas con potencial actividad analgésica" *Dominguezia* 24(1): 47-69.
- Salvat, A.; Antonacci, L.; Fortunato, R.H.; Suarez, E.Y.; Godoy, H.M. (2004). "Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina". *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 11(2–3): 230-234.
- Scarpa, G.F. (2004). "Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco". *Journal of Ethnopharmacology* 91(1): 115-135.
- Sripathi, S.K.; Poongothai, G.; Lalitha, P. (2011). "Anti diabetic agent Pinitol from the leaves of *Pisonia grandis* (R. Br.)". *Journal of Natural Remedies*, 11(1): 39-43.
- Zain, M.E. (2011). "Impact of mycotoxins on humans and animals". *J Saudi Chem Soc.* 15: 129-144.

Perspectiva del uso de aceites esenciales del género *Citrus* para el manejo de isópodos plaga en siembra directa

Lilian R. Descamps, Carolina Sánchez Chopa*

Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, San Andrés 800 Altos Palihue, Bahía Blanca (8000) Buenos Aires, República Argentina.

*Autor a quien dirigir la correspondencia: cschopa@uns.edu.ar

Resumen

La problemática ambiental asociada a los plaguicidas sintéticos utilizados en la agricultura condujo a la intensificación de los esfuerzos para encontrar alternativas seguras y viables. En este contexto los aceites esenciales derivados de plantas son una opción interesante. *Armadillidium vulgare* es una plaga emergente de la siembra directa que produce daños durante la implantación de los cultivos. Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar los efectos de los aceites esenciales de *Citrus x aurantium*, *Citrus limon* y *Citrus bergamia* sobre la fisiología nutricional de *Armadillidium vulgare* y determinar el efecto fagodisuasivo de estos aceites. Para evaluar el efecto sobre la fisiología nutricional, durante 72 horas se les ofreció a los crustáceos cebos formulados con semillas de *Glycine max* y aceite esencial. Las concentraciones utilizadas fueron 0,5; 1,0 y 2,0 mg de aceite por g de cebo. Como control se utilizó cebos sin tratar. Se pesaron los cebos y los crustáceos, antes y después del ensayo. Se calcularon la: tasa de crecimiento relativa (TCR); tasa relativa de consumo (TRC); eficiencia de conversión del alimento ingerido (ECAI %) y el índice antialimentario (IA). Para evaluar el efecto fagodisuasivo durante 24 horas y en forma simultánea, se les ofreció a los crustáceos cebos tratados con los aceites esenciales y cebos sin tratar. La concentración utilizada fue de 0,5 mg de aceite/g de cebo. Se pesó cada cebo antes y después del ensayo. Se calculó el índice fagodisuasivo (IF). Los resultados se analizaron mediante ANOVA y test de diferencias mínimas significativas (DMS, $p < 0,05$). Todos los aceites evaluados generaron una disminución significativa de la TCR, de la TRC y de la ECAI % (DMS, $p < 0,05$). Al evaluar la actividad fagodisuasiva en los ensayos con posibilidad de elección, se observó que los aceites esenciales de *C. aurantium* y de *C. limon* generaron un efecto fagodisuasivo muy alto (DMS, $p < 0,05$). Por otra parte, el aceite esencial de *C. bergamia* produjo un efecto fagoestimulante en adultos de *A. vulgare* (DMS, $p < 0,05$). Estos resultados indicarían que estos aceites esenciales podrían considerarse como una alternativa para la protección de plántulas de soja en lotes con *A. vulgare*.

Potential of *Citrus* Essential Oils for Isopods Pest Control under No-tillage Systems

Summary

Environmental problems associated with synthetic pesticides used in agriculture led to the intensification of efforts to find safe and viable alternatives. In this context plants' essential oils are an interesting option. *Armadillidium vulgare* is an emergent pest of no-tillage systems that causes damage to plants immediately

Palabras clave: bicho bolita - cebos - aceites esenciales.

Keywords: pillbug - baits - essential oils.

after germination. The aim of this paper was to evaluate the feeding deterrent activity and the alterations in the nutritional physiology produced by the essential oils of *Citrus x aurantium*, *Citrus limon* and *Citrus bergamia* on *A. vulgare* adults. To evaluate the alteration in the nutritional physiology in adults, for 72 h baits formulated with soybean seeds and essential oils were offered to crustaceans. The concentrations evaluated were 0.5, 1 y 2 mg/g of bait. A control group with non-treated baits was prepared. Baits and crustaceans were weighed at the beginning of the test and after 72h. The nutritional indices were calculated: relative growth rate (RGR); relative consumption rate (RCR); efficiency of conversion of ingested food (ECI) (%) and the antifeeding effect (AE). To evaluate the antifeeding activity baits with and without essential oils were simultaneously offered to crustaceans for 24 h. The concentration evaluated was 0.5 mg/g of bait. Baits were weighed before and after the test ends and the deterrent index was calculated. Data were analyzed by ANOVA and Fisher's PLSD test. All essential oils evaluated modified the nutritional indices. RGR, RCR and ECI decreased in all the concentrations and significant differences were observed ($p \leq 0.05$). In choice test, essential oils of *C. aurantium* and *C. limon* produced a strong fagodisuasive effect ($p \leq 0.05$). On the other hand, essential oil of *C. bergamia* was highly feeding stimulant for *A. vulgare* adults ($p \leq 0.05$). These results showed that the essential oils could be used as an alternative tool for soybean seedlings protection in fields with *A. vulgare*.

Introducción

Con el fin de lograr una agricultura sustentable y evitar la degradación de los recursos naturales ocasionados por el proceso de "agroindustrialización" en la región pampeana se adoptó, como sistema conservacionista, la siembra directa (Villarino y col., 2012; Faberi y col., 2014). Este sistema tiene como finalidad asegurar una cobertura permanente del suelo y mejorar las condiciones del mismo. Como contrapartida a estos beneficios, la no remoción de los rastrojos favorece el desarrollo de plagas (Bravo y col., 2004; Ferreras y col., 2007; Gizzi y col., 2009).

El bicho bolita, *Armadillidium vulgare* Latreille (Armadillidiidae) es una plaga emergente de la siembra directa que produce daños durante la implantación de los cultivos (Villarino y col., 2012). Es una especie muy susceptible a la sequía que posee escasa capacidad para penetrar en el suelo, por lo que este sistema de siembra le ha proporcionado un ambiente ideal para su desarrollo y reproducción (Faber y col., 2011). Este crustáceo se alimenta del endosperma de las semillas, del ápice vegetativo y de los cotiledones, reduciendo el número inicial de plántulas de los cultivos estivales (Faber y col., 2014; Preciado y Martínez, 2014).

Los pesticidas sintéticos son una de las herramientas más difundidas para el control de esta plaga en cultivos extensivos (Salvio y col., 2016). Este

control se basa en el uso de cebos tóxicos (Salvio y col., 2014) que pueden producir diferentes impactos ambientales como la muerte de insectos benéficos, de organismos predadores de artrópodos, de anfibios, de reptiles, de aves y de mamíferos.

La problemática ambiental asociada a los plaguicidas sintéticos utilizados en la agricultura, conduce a la intensificación de los esfuerzos para encontrar alternativas seguras y viables. En este contexto los aceites esenciales derivados de plantas son una opción interesante.

Citrus x aurantium L., *Citrus limon* (L.) Osbeck y *Citrus bergamia* Rossi son árboles frutales pertenecientes a la familia Rutaceae. Sus aceites esenciales son empleados en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Minero y Díaz, 2017; Oruño Sánchez, 2006). Poseen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, antidepresivas, antiespasmódicas, antisépticas, carminativas, diuréticas, sedantes, bactericidas y tónicas, entre otras (Arias y Ramón Laca, 2005; Singh y col., 2010; Suryawanshi, 2011; Guzmán Gutiérrez y col., 2009; Aleman Gaínza y col., 2015).

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar los efectos de los aceites esenciales de *C. aurantium*, *C. limon* y *C. bergamia* sobre la fisiología nutricional de *Armadillidium vulgare* y determinar el efecto fagodisuasivo de estos aceites.

Materiales y métodos

Crustáceos

Los crustáceos provinieron de una colonia mantenida en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa ($25 \pm 1^\circ \text{C}$, 60-70 % HR) y un fotoperíodo 12:12 (L:O) en el laboratorio de Zootología Agrícola, Dpto. de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (UNS). Se utilizó como alimento para la cría semillas y plántulas de soja.

Bioensayos

Todos los bioensayos se realizaron con adultos de ambos sexos de *Armadillidium vulgare*. Los ensayos se efectuaron en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa ($25 \pm 1^\circ \text{C}$, 60-70 % HR) y fotoperíodo 12:12 (L:O). Se evaluaron aceites comerciales de *C. aurantium*, *C. limon* y *C. bergamia* Swiss-Just Lomas del Mirador, República Argentina; realizados bajo la supervisión y el control de Ulrich-Jüstrich AG Walzenhausen, Suiza.

Efectos sobre la fisiología nutricional

Para evaluar posibles efectos sobre la fisiología nutricional de los adultos de *A. vulgare* se utilizaron cebos formulados en base a semillas de *Glycine max* L. (Fabaceae) y un principio activo. Como principio activo se utilizaron los aceites esenciales a las concentraciones del 0,5; 1,0 y 2,0 mg de aceite por g de cebo. Además, se preparó un grupo control con cebos sin principio activo. En recipientes adecuados se colocaron 10 crustáceos, el cebo y agua durante 72 horas. Se realizaron tres réplicas. Se determinó el peso del cebo y el de los crustáceos antes y después del ensayo y se registró la mortalidad. Se calcularon los siguientes índices nutricionales: (a) Tasa de Crecimiento Relativa (TCR) = $(A-B) / (B \times \text{día})$, donde A = peso de los crustáceos vivos al tercer día / n° de crustáceos vivos al tercer día y B = peso original de los crustáceos / n° total de crustáceos; (b) Tasa Relativa de Consumo (TRC) = $D / (B \times \text{día})$, donde D = biomasa ingerida (mg) / n° de crustáceos vivos al tercer día; (c) Eficiencia de Conversión del Alimento Ingerido (ECAI)(%) = $(TCR/TRC) \times 100$. Además, se calculó el Índice Fagodisuasivo (IF) (%) = $[(C-T) / (C+T)] \times 100$, donde C = consumo de los cebos sin principio activo (mg) y T = consumo de los

cebos con principio activo (mg). Por otra parte, para determinar la disminución o el aumento en el peso de los cebos debido a la evaporación del principio activo y/o a la pérdida de humedad, los cebos se colocaron en frascos con las mismas condiciones del ensayo pero sin crustáceos. El peso de los cebos en el ensayo se corrigió con el peso obtenido de los cebos en los frascos sin crustáceos. Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba de varianza ANOVA y las medias fueron separadas mediante el test de diferencias mínimas (DMS, $p \geq 0,05$).

Evaluación de la actividad fagodisuasiva

Durante 24 horas, y en forma simultánea, se les ofreció a los adultos de *A. vulgare* cebos formulados con los aceites esenciales y cebos sin aceites esenciales. La concentración utilizada fue de 0,5 mg de aceite/g de cebo. Se utilizó una arena experimental formada por dos envases de plástico de 120 ml cada uno, cuyas paredes plásticas constaban de un orificio conectado a un tubo de plástico de 9,0 x 1,1 cm de diámetro. En uno de los envases se colocó un cebo formulado con los aceites y en el otro, un cebo sin aceite esencial. En cada arena se colocaron 10 crustáceos y agua para mantener la humedad. Se determinó el peso de cada cebo antes y después de cada experimento. Luego se calculó el Índice Fagodisuasivo (IF = $[(C-T) / (C+T)] \times 100$; donde C = consumo de los cebos no tratados (tratados con el solvente solo) y T = consumo de los cebos tratados). Este índice abarca valores desde -100 a 100 correspondiendo el valor de 0 a una sustancia que no produce efectos sobre el comportamiento de los crustáceos; los valores mayores que 0, a una sustancia fagodisuasiva y los menores que 0, a una sustancia fagoestimulante. Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba de varianza ANOVA y las medias fueron separadas mediante el test de diferencias mínimas (DMS, $p \geq 0,05$).

Resultados

En la tabla 1 se muestran las alteraciones en los índices nutricionales de los adultos de *A. vulgare* ocasionadas por los aceites esenciales evaluados. Los aceites de *Citrus x aurantium* y de *Citrus limon* generaron una disminución significativa de la TCR y de la TRC (DMS, $p < 0,05$) que dependió de la

Tabla 1.- Índices nutricionales y actividad fagodisuasiva de los aceites esenciales de *Citrus x aurantium*, *Citrus limon* y *Citrus bergamia* en adultos de *A. vulgare*

Aceite esencial	Conc. (mg/g cebo)	TCR	TRC	ECAI%	IF%
<i>Citrus x aurantium</i>	0	0,44 ± 0,044 d	0,50 ± 0,047 c	86,76 ± 1,27 c	
	0,75	-0,08 ± 0,005 c	0,15 ± 0,015 b	-56,6 ± 10,8bc	62,78
	1,6	-0,30 ± 0,027 b	0,13 ± 0,004 ab	-144,6 ± 69,6 b	65,98
	2,4	-0,51 ± 0,048 a	0,06 ± 0,007 a	-380,8 ± 76,4a	81,65
<i>Citrus limon</i>	0	0,44 ± 0,044 c	0,50 ± 0,047 b	86,76 ± 1,27 c	
	0,75	-0,27 ± 0,061 b	0,17 ± 0,021 a	-155,6 ± 24,9 b	62,01
	1,6	-0,45 ± 0,035 a	0,15 ± 0,005 a	-287,9 ± 26,7 b	59,69
	2,4	-0,58 ± 0,034 a	0,08 ± 0,013 a	-728,6 ± 122,4 a	80,36
<i>Citrus bergamia</i>	0	0,44 ± 0,044 d	0,50 ± 0,047 c	86,76 ± 1,27 c	
	0,75	-0,20 ± 0,025 c	0,14 ± 0,003 a	-138,2 ± 19,4 b	67,57
	1,6	-0,42 ± 0,033 b	0,16 ± 0,008 b	-271,2 ± 6,35 a	60,88
	2,4	-0,73 ± 0,017 a	0,39 ± 0,037 b	-235,8 ± 20,5 a	14,22

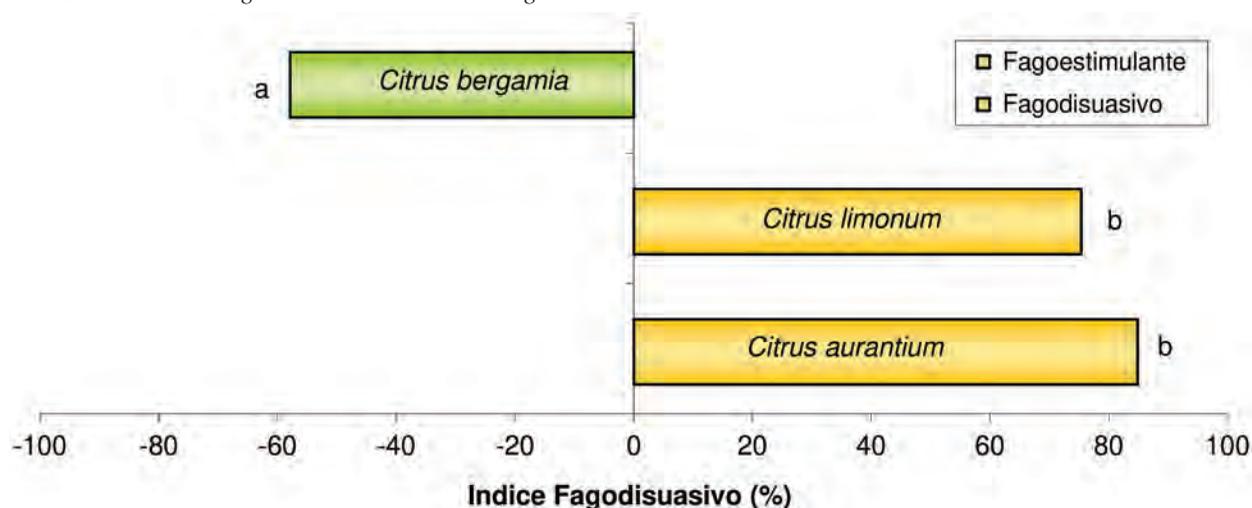
Referencias: Conc.: concentración; TCR: Tasa de Crecimiento Relativa; TRC: Tasa Relativa de Consumo; ECAI: Eficiencia de Conversión del Alimento Ingerido; IF: Índice Fagodisuasivo. Valores seguidos por la misma letra para cada aceite esencial y dentro de cada columna no difieren significativamente (DMS, $p > 0,05$).

concentración. Ambos aceites produjeron una disminución significativa (DMS, $p < 0,05$) de la eficiencia de conversión del alimento ingerido y altos valores del IF en todas las concentraciones evaluadas.

Al evaluar el aceite esencial de *Citrus bergamia* se observó una disminución significativa en los valores de TRC, TCR y ECAI % (DMS, $p < 0,05$). Sin embargo, a diferencia de la TCR y de la ECAI %, la disminución en el consumo fue inversamente proporcional al aumento de la concentración. Los valores de IF fueron decreciendo a medida que fue

aumentando la concentración del aceite en los cebos tratados (Tabla 1).

Al evaluar la actividad fagodisuasiva en los ensayos con posibilidad de elección, se observó que los aceites esenciales de *C. aurantium* y de *C. limonum* generaron un efecto fagodisuasivo muy alto (DMS, $p < 0,05$), siendo el aceite de *C. aurantium* el que mayor efecto produjo (IF: 84,8%). Por otra parte, el aceite esencial de *C. bergamia* produjo un efecto fagoestimulante en adultos de *A. vulgare* (DMS, $p < 0,05$) (Figura 1).

Figura 1.- Actividad fagodisuasiva de los aceites esenciales de *Citrus x aurantium* y *Citrus limon* y efecto fagoestimulante de *Citrus bergamia* en adultos de *A. vulgare*

Discusión y Conclusión

Las sustancias químicas derivadas de los vegetales pueden producir alteraciones en la fisiología nutricional de los insectos y/o actuar sobre su conducta alimentaria, comportándose como atractantes, repelentes, antialimentarios o inhibidores de la alimentación (Bekircan y col., 2014; Hamzavi y Moharrampour, 2017). Aunque varios autores han investigado este efecto en distintos insectos plagas (Ali y col., 2017; Reddy y col., 2016), pocos estudios se han realizado para determinar los efectos de los metabolitos secundarios de las plantas como antialimentarios de *A. vulgare*.

En este trabajo, todos los índices nutricionales fueron modificados por los aceites esenciales evaluados. Los aceites esenciales de *C. aurantium*, *C. limon* y *C. bergamia* generaron una disminución de los índices nutricionales pero el aceite esencial de *C. bergamia* produjo una reducción del consumo de alimento inversamente proporcional a la concentración. Esto indicaría que este aceite genera una estimulación de la alimentación en *A. vulgare*.

La eficiencia de conversión del alimento ingerido (ECAI %) es una medida general para evaluar la habilidad que tiene un insecto para utilizar el alimento ingerido en pro de su crecimiento; por lo que un descenso de este índice indica que la mayor parte del alimento se está metabolizando para generar energía y que la menor parte se está transformando en masa corporal (crecimiento). Los valores descendentes de la ECAI % indican que el alimento ingerido produce una posible toxicidad (Liu y col., 2002; Koul y col., 2003; Pavela y col., 2008). En base a lo anteriormente citado, los aceites esenciales evaluados generaron no sólo una posible toxicidad post-ingesta (disminución de la ECAI %), sino que también produjeron un efecto sobre el comportamiento de *A. vulgare* al ser fagodisuasivos.

Al evaluar la actividad fagodisuasiva en los ensayos de preferencia se observó que los aceites esenciales de *C. aurantium* y de *C. limonum* produjeron un efecto disuasivo de la alimentación mayor que el generado en el ensayo de no elección. Esto podría deberse a que cuando el crustáceo no tiene la oportunidad de elegir entre cebos tratados y controles, come pequeñas cantidades de los cebos tratados o grandes cantidades en los controles y esto genera un índice fagodisuasivo más bajo. Sin embargo, cuando los crustáceos tienen la oportunidad de elegir

comen directamente del control, lo que genera en última instancia un alto valor del IF. Por otra parte, se observó que el aceite esencial de *C. bergamia* produjo un efecto fagoestimulante muy alto. Esto sumado a su toxicidad post-ingesta podría ser útil en la formulación de cebos tóxicos para el control de *A. vulgare*.

Los aceites esenciales de *C. x aurantium*, *C. limon* y *C. bergamia* podrían considerarse como una alternativa para la protección de plántulas de soja en lotes con *A. vulgare*.

Referencias bibliográficas

- Aleman Gaínza, Y.; Ferreira Domingues, L.; Pino Perez, O.; Dias Rabelo, M.; López, E.R.; Souza Chagas, A.C. (2015). "Anthelmintic activity in vitro of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinque-neria* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*". *Journal Industrial Crops and Products* 76: 647-652.
- Ali, M.A.; Doaa, S.M.; El-Sayed, H.S.; Asmaa, M.E. (2017). "Antifeedant activity and some biochemical effects of garlic and lemon essential oils on *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae)". *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5(3): 1476-1482.
- Arias, B.A.; Ramón-Laca, L. (2005). "Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region". *Journal of Ethnopharmacology* 97(1): 89-95.
- Bekircan, Ç.; Cüce, M.; Sökmen, A. (2014). "Antifeedant Activity of the Essential Oils from Four Different Lamiaceae Species against *Agelastica alni* L.(Coleoptera: Chrysomelidae)". *Advances in Zoology and Botany* 2(4): 57-62.
- Bravo, C.; Lozano, Z.; Hernández, R.M.; Piñango, L.; Moreno, B. (2004). "Efecto de diferentes especies de coberturas sobre las propiedades físicas de un suelo de sabana con siembra directa de maíz" *Bioagro* 16(3): 163-172.
- Faberi, A.J.; López, A.N.; Clemente, N.L.; Manetti, P.L. 2011. "Importance of diet in the growth, survivorship and reproduction of the no-tillage pest *Armadillidium vulgare* (Crustacea: Isopoda)". *Revista Chilena de Historia Natural* 84: 407-417.
- Faberi, A.J.; Clemente, N.L.; Manetti, P.L.; López, A.N. (2014). "Nivel de daño económico de

- Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804) (Crustacea: Isopoda) en el cultivo de girasol”. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 40(2): 182-188.
- Ferreras, L.; Magra, G.; Besson, P.; Kovalevski, E.; García, F. (2007). “Physical quality indicators in soils from the northern Pampa region of Argentina under no till management”. *Ciencia del suelo* 25(2): 159-172.
- Gizzi, A.H.; Álvarez Castillo, H.A.; Manetti, P.; López, A.N.; Clemente, N.L.; Studdert, G.A. (2009). “Caracterización de la meso y macrofauna edáfica en sistemas de cultivo del Sudeste Bonaerense”. *Ciencia del suelo* 27(1): 1-9.
- Guzmán-Gutiérrez, S.L.; Balderas, J.S.; Aguilar, A.; Navarrete, A. (2009). “Sedative activity of some plants used in Mexico to treat insomnia”. *Revista Latinoamericana de Química* 37(3): 243-251.
- Hamzavi, F.; Moharramipour, S. (2017). “Chemical composition and antifeedant activity of essential oils from *Eucalyptus camaldulensis* and *Callistemon viminalis* on *Tribolium confusum*”. *International Journal of Agricultural Technology* 13(3): 413-424.
- Koul, O.; Daniewski, W.M.; Multani, J.S.; Gumulka, M.; Singh, G. (2003). “Antifeedant Effects of the Limonoids from *Entandrophragma candollei* (Meliaceae) on the Gram Pod Borer, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7271-7275.
- Liu, Z.L.; Xu, Y.J.; Wu, J.; Goh, S.H.; Ho, S.H. (2002). “Feeding Deterrents from *Dictamnus dasycarpus* Turcz Against Two Stored-Product Insects”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(6): 1447-1450.
- Minero, F.J.G.; Díaz, L.B. (2017). “Historia y actualidad de productos para la piel, cosméticos y fragancias. Especialmente los derivados de las plantas”. *Ars Pharmaceutica* 58(1): 5-12.
- Oroño Sánchez, M.F. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Aiyana ediciones, España: 276.
- Pavela, R.; Vrchotová, N.; Šerá, B. (2008). “Growth inhibitory effect of extracts from *Reynoutria sp.* plants against *Spodoptera littoralis* larvae”. *Agrociencia* 42: 573-584.
- Preciado, A.F.; Martínez, J.W. (2014). “Estudio de isópodos terrestres (Crustacea: Isopoda: Oniscidea) en tres localidades de Boyacá, Colombia”. *Revista de Ciencias Agrícolas* 31(2): 14-23.
- Reddy, S.E.; Kirti Dolma, S.; Koundal, R.; Singh, B. (2016). “Chemical composition and insecticidal activities of essential oils against diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae)”. *Natural Product Research* 30(16): 1834-1838.
- Salvio, C.; Manetti, P.L.; Clemente, N.L.; López, A.N. (2016). “Efectos de clorpirifos, cipermetrina y glifosato sobre *Milax gagates* (Mollusca: Pulmonata) y *Armadillidium vulgare* (Crustacea: Isopoda)”. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias* 26: 43-48.
- Salvio, C.; Manetti, P.L.; Clemente, N.L.; López, A.N. (2014). “Efectos de Carbaryl y Metaldehído sobre *Armadillidium vulgare* (Crustacea: Isopoda) y *Milax gagates* (Mollusca: Pulmonata) en soja bajo siembra directa”. *Revista Agrociencia Uruguay* 18(2): 82-89.
- Singh, P.; Shukla, R.; Prakash, B.; Kumar, A.; Singh, S.; Mishra, P.K.; Dubey, N.K. (2010). “Chemical profile, antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. And *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene”. *Food and Chemical Toxicology* 48(6): 1734-1740.
- Suryawanshi, J.A.S. (2011). “An overview of *Citrus aurantium* used in treatment of various diseases”. *African Journal of Plant Science* 5(7): 390-395.
- Villarino, S.V.; Manetti, P.L.; López, A.N.; Clemente, N.L.; Faberi, A.J. (2012). “Formulaciones con combinación de ingredientes activos para el control de *Armadillidium vulgare* (Crustacea: Isopoda), plaga en el cultivo de colza”. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 38(1): 91-96.

Influencia de reguladores de crecimiento sobre el establecimiento de cultivos *in vitro* de *Salvia hispanica* L. (“chía”) y sobre su contenido de ácidos grasos

Martín Bari¹, Marconi Patricia^{1,2}, López María Cristina³, Álvarez María Alejandra^{1,2*}

¹Laboratorio 603, Facultad de Ciencias de la Salud - CEBBAD, Universidad Maimónides, Hidalgo 775 (CABA).

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

³Laboratorio de Agroalimentos del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI).

*Autor a quien dirigir la correspondencia: alvarez.mariaalejandra@maimonides.edu

Resumen

Salvia hispanica L. (Labiatae), comúnmente conocida como “chía”, es una especie herbácea anual cuyo cultivo está ampliamente extendido por América del Sur. Es utilizada como cultivo industrial y para la elaboración de alimentos funcionales por su contenido en proteínas, antioxidantes, fibras y lípidos esenciales. El aceite de sus semillas contiene la mayor proporción (68 %) de omega-3 que cualquier fuente vegetal conocida. El objetivo de este trabajo fue establecer cultivos *in vitro* de “chía” y analizar la influencia de diferentes reguladores de crecimiento sobre la inducción de callos, sobre el crecimiento de estos y sobre su contenido de ácidos grasos. Se iniciaron cultivos de callos *in vitro* a partir de explantos de tallos sin nudos y de hojas de plántulas axénicas de 20 días de edad, utilizando 3 tratamientos de reguladores de crecimiento diferentes. El medio Murashige & Skoog modificado (MSRT) con el agregado de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a una concentración de 2,25 μ M y un fotoperíodo de 16 horas fueron las condiciones óptimas para la inducción de callos. Para el mantenimiento de los callos el tratamiento más adecuado resultó ser bencilaminopurina (BAP) a una concentración de 1 μ M. La cinética de crecimiento se caracterizó por un período de latencia hasta el día 20 de cultivo, seguido de un período de crecimiento exponencial entre los días 20 y 54. El tratamiento con 2,4-D (2,25 μ M) mostró la más alta velocidad específica de crecimiento ($0,22 \pm 0,01$ /día), el tiempo de duplicación más bajo ($31,51 \pm 1,00$ día) y la mayor biomasa máxima ($1,46 \pm 0,01$ g PF). El contenido de ácidos grasos en los callos de “chía” fue 0,83 % en promedio de todos los tratamientos después de 6 meses en cultivo y no mostró variaciones significativas (0,2 % - 0,3 %) entre los tratamientos aplicados ($p < 0,05$).

Influence of Plant Growth Regulators on the Establishment of *in vitro* Cultures of *Salvia Hispanica* L. (“Chía”) and on its Fatty Acid Content

Summary

Salvia hispanica L. (Labiatae), whose vulgar name is chia, is an annual herb cultured in South America. Recently, their content of proteins, antioxidants, fibers and essential lipids has promoted its exploitation as an industrial culture and to produce functional food. The seed oils contain the highest proportion (68 %) of omega-3 in the plant kingdom. The aim of this work was to establish *in vitro* cultures of chia and to analyze

Palabras clave: “chía” - cultivo *in vitro* - *Salvia hispanica* - reguladores de crecimiento vegetal.

Key words: “chía” - *in vitro* culture - *Salvia hispanica* - plant growth regulators.

the influence of different plant growth regulators on the establishment of calli, their growth, and their fatty acids content. *In vitro* cultures were initiated from 20 days-old plantlets with different plant growth regulators relationship. The media Murashige & Skoog (MSRT) modified added by 2,4-dichlore phenoxyacetic acid (2,4-D) at 2.25 μM , and a photoperiod of 16 h were the optimal conditions for starting the cultures. For their maintenance the optimal conditions were with the addition of the plant growth regulator benzylaminopurine (BAP) at 1.00 μM . The kinetic of growth presented a lag period of 20 days followed by an exponential period of 34 days. The treatment with 2,4-D (2.25 μM) produced the highest specific growth rate ($0.22 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$), the lowest duplication time ($31.51 \pm 1.00 \text{ d}$) and the highest maximal biomass ($1.46 \pm 0.01 \text{ g}$). The mean fatty acid content was 0.83 % for all the conditions after 6 months in culture without significant differences (0.2 % - 0.3 %) among the different treatments ($p < 0.05$).

Introducción

Salvia hispanica L. (Labiatae), comúnmente conocida como “chía”, es una especie herbácea anual nativa del sur de México y norte de Guatemala que fue, en tiempos precolombinos, parte de la dieta básica así como fuente de aceite y medicinas para los mesoamericanos. Hoy en día es utilizada para la producción de bebidas y alimentos por su contenido nutricional de lípidos esenciales, proteínas, antioxidantes y fibras. Sus semillas tienen aproximadamente entre 25 % y 39 % de aceite respecto de su peso y éste contiene la mayor proporción (68 %) de ácido omega-3-linolénico (omega-3, un ácido graso poli insaturado esencial) que cualquier fuente vegetal conocida. Además, las semillas de “chía” contienen niveles más altos de proteína (19 - 23 %) que los de cereales tradicionales como el “trigo” (*Triticum aestivum* L. -Poaceae-), “maíz” (*Zea mays* L. -Poaceae-), “arroz” (*Oryza sativa* L. -Poaceae-) y “avena” (*Avena sativa* L. -Poaceae-) (Marconi y col., 2013).

La importancia nutricional y sanitaria del omega-3 reside en los siguientes efectos beneficiosos para la salud: 1) posee una actividad antioxidante comparable a la de la vitamina E; 2) inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis en algunos modelos de tumores murinos; y 3) previene la enfermedad cardiovascular, una de las enfermedades crónicas con mayor prevalencia en las culturas occidentales (Yuriko y Darshan, 2010).

Estudios de investigación celular y molecular indican que los efectos cardioprotectores de los ácidos grasos omega-3 son el resultado de una sinergia entre múltiples mecanismos complejos que involucran: la reducción de los triglicéridos, efectos

antiinflamatorios, efectos antitrombóticos y efectos antiarrítmicos. Estos efectos están relacionados con la modulación tanto de la síntesis de mediadores para la disolución de lípidos como de los canales iónicos cardíacos. Ésta última es el resultado de la interacción del omega-3 con microdominios de membrana y la consecuente influencia en las vías de señalización que estos desencadenan. Ejemplos de ello son: a) la inhibición de la actividad del factor nuclear κB , involucrado en las vías de señalización inflamatorias; b) la regulación de la expresión de genes de síntesis de esteroides y de la proteína C; y c) la regulación de la expresión de genes implicados en la oxidación de los ácidos grasos, como la activación del receptor α que promueve la proliferación de peroxisomas (Yuriko y Darshan, 2010).

Simopoulos (2009) refiere que la relación omega-6 / omega-3 de la dieta debería tener valores cercanos a 1. En las dietas occidentales la relación es entre 15/1 y 16,7/1 debido a que son deficientes en omega-3 y tienen cantidades excesivas de omega-6. Estas dietas promueven la patogénesis de muchas enfermedades, incluyendo enfermedad cardiovascular, cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Simopoulos, 2009).

Actualmente, a nivel comercial, la “chía” se cultiva en la Argentina (donde gradualmente está reemplazando a la soja, uno de sus cultivos más extendidos y rentables) (Bueno y col., 2010), Bolivia, Ecuador, Guatemala, México y Australia. En el año 2008, Australia fue el principal productor del mundo de esta especie, con un área sembrada de 1700 ha, lo que representa dos tercios de su producción mundial (Ixtaina y col., 2010). En la Argentina el

rendimiento promedio de esta especie en plantaciones comerciales es de alrededor de 500 - 600 kg/ha, aunque se ha logrado obtener hasta 1260 kg/ha. En parcelas experimentales de la provincia de Salta, con la implementación de riego y fertilización nitrogenada, se han registrado rendimientos de 2500 kg/ha (Ixtaina y col., 2010). Debido a las características del cultivo agronómico y a la importancia sanitaria de la semilla de "chía" es que el desarrollo de cultivos *in vitro* de esta especie resulta de interés para la industria farmacéutica y alimentaria. La desaparición de las especies nativas por destrucción de sus hábitats naturales, así como las dificultades de domesticar especies salvajes de interés biotecnológico, reducen la biodisponibilidad de estas fuentes. La biotecnología aparece entonces como una herramienta capaz de salvar este tipo de obstáculos a través del cultivo *in vitro* de vegetales como una alternativa para la producción de biocompuestos. Las ventajas de producción a partir cultivos *in vitro* residen en que éstos permiten la producción sistemática y regulada de biomoléculas con calidad estandarizada (metabolitos primarios y secundarios), el cultivo en condiciones definidas, controladas y óptimas, que permiten independizarse de las condiciones de cultivo en campo y la consistencia de los resultados. Además, el cultivo *in vitro* puede ser utilizado para el análisis de la fisiología de una especie, el cultivo de una especie no domesticada aún, el mejoramiento genético de una especie para aumentar la producción de una molécula propia y la manipulación genética para que una especie produzca nuevas biomoléculas (organismo genéticamente modificado) (Álvarez, 2014).

Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos capaces de influir en procesos fisiológicos (crecimiento y diferenciación) a bajas concentraciones (Vega Aguilar, 2011; Álvarez y col., 2009; Grostin, 2008). No es posible generalizar los tipos y cantidades adecuadas de reguladores de crecimiento para el desarrollo de cultivos *in vitro*, razón por la cual se debe realizar un análisis caso por caso (Álvarez y col., 1993; Álvarez, 2014). Teniendo en cuenta el potencial económico de la "chía" en las industrias farmacéutica y alimentaria, el establecimiento de cultivos *in vitro* aparece como una alternativa para obtener una biomasa uniforme en relación al genotipo, el contenido proteico y el contenido porcentual de aceite (junto con su perfil de ácidos grasos). Los resultados obtenidos a partir de la evaluación del

comportamiento de los callos pueden, entonces, ser el puntapié inicial en el desarrollo de nuevos métodos de producción de omega-3 (Marconi y col., 2013).

El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de diferentes reguladores de crecimiento (6-bencil-amino-purina -BAP-; ácido 2,4-diclorofenoxiacético -2,4-D- y kinetina -KIN-) sobre el establecimiento de callos de *S. hispanica* y sobre su contenido de ácidos grasos; y determinar la influencia de la concentración de macro y micro nutrientes y de un regulador de crecimiento (AIA) sobre la micropropagación *in vitro* de plántulas *S. hispanica*.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las semillas fueron recolectadas en la localidad de La Merced, provincia de Salta (coordenadas geográficas: 25° S, 65° 5' O), Argentina, durante enero de 2011. Muestras del material de referencia se conservan en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Departamento de Investigaciones Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Maimónides.

Para su estratificación se las colocó en un vaso de precipitado conteniendo 50 mL de agua destilada el cual se conservó entre 2 y 8 °C durante 48 horas.

Desinfección de las semillas: se sumergieron las semillas durante 20 segundos en etanol 96°, luego se dejaron en remojo durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio con una concentración de cloro activo de 4 % y, por último, fueron sometidas a 3 enjuagues con agua destilada hasta la completa eliminación de los agentes esterilizantes.

Germinación: se trabajó en cabina de flujo laminar, se colocaron 40 semillas en 10 frascos conteniendo 50 mL de medio Murashige y Skoog modificado (MSRT) (Murashige & Skoog, 1962; Khanna y Staba, 1968). Estos frascos se mantuvieron en oscuridad a 24 ± 2 °C durante 10 días. Las plántulas germinadas se mantuvieron en la cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas (generado con lámparas fluorescentes de $1,8 \text{ wm}^{-2} \text{ seg}^{-1}$ de irradiancia: $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Micropropagación

Una vez establecido el cultivo axénico se comenzó con la etapa de multiplicación. Para ello se

seccionaron plántulas de 20 días de edad y 10 cm de altura y se hicieron cortes a nivel de sus entrenudos. Para determinar la influencia de la concentración de macro y micronutrientes del medio MSRT en el desarrollo de plántulas, 30 explantos fueron sembrados en dos medios de cultivo diferentes: 15 fueron sembrados en medio MSRT conteniendo ácido indol acético (AIA) a una concentración de $5,71\mu\text{M}$ y los otros 15 en el mismo medio de cultivo pero con los macro y micronutrientes reducidos a la mitad de su concentración original (MSRT/2). Los cultivos en etapa de propagación se mantuvieron en frascos de 330 mL con 50 mL de medio de cultivo y fueron cultivados en las mismas condiciones de luz y temperatura descritas más arriba.

Inducción de callos

Explantos de hojas y de tallos obtenidos de las plántulas establecidas como se indicó en el punto anterior se colocaron en frascos con medio MSRT suplementado con 3 % de sacarosa y con 3 tratamientos diferentes de reguladores de crecimiento: 2,4-D $2,25\mu\text{M}$; BAP $1,00\mu\text{M}$; o la combinación 2,4-D: KIN ($0,45\mu\text{M}$: $0,46\mu\text{M}$) y se mantuvieron en cámara de cultivo en las mismas condiciones de luz y temperatura descritas más arriba. Después de 30 - 45 días, los tejidos callosos en formación se separaron del explanto que los originó y se transfirieron a medio de cultivo fresco con la misma composición. Para su mantenimiento los callos se subcultivaron a medio fresco cada 30 días durante un período total de 10 meses.

Curva de crecimiento

Se elaboró una curva de crecimiento para los callos mantenidos en medio de cultivo MSRT con BAP [$1,00\mu\text{M}$], con 2,4-D [$2,25\mu\text{M}$] o con 2,4-D: KIN [$0,45\mu\text{M}$: $0,46\mu\text{M}$] a partir de la variación del área de los mismos con el tiempo. La determinación del área se realizó mediante el software "Image J".

Determinaciones analíticas

El peso fresco (PF) y el peso seco (PS) se determinaron el día inicial y el día final de cada ensayo. Para la determinación del PS, las muestras fueron secadas en estufa a $80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta peso constante (48 horas).

Análisis de ácidos grasos

El contenido de ácidos grasos en los callos se determinó por hidrólisis ácida de acuerdo con el Método Oficial 925.32 de la Asociación de Químicos Agrícolas Oficiales (AOAC por sus siglas en inglés) el cual incluye la extracción de los mismos.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se analizaron mediante ANOVA y los tratamientos se contrastaron mediante el test "post hoc" de Tuckey ($p < 0,05$). Los cálculos se realizaron con el software GraphPadPrism 5.

Resultados y discusión

Germinación de las semillas

Después de 8 días en oscuridad la tasa de germinación de las semillas de *S. hispanica* fue de 30 %, sin observarse contaminación.

Micropropagación

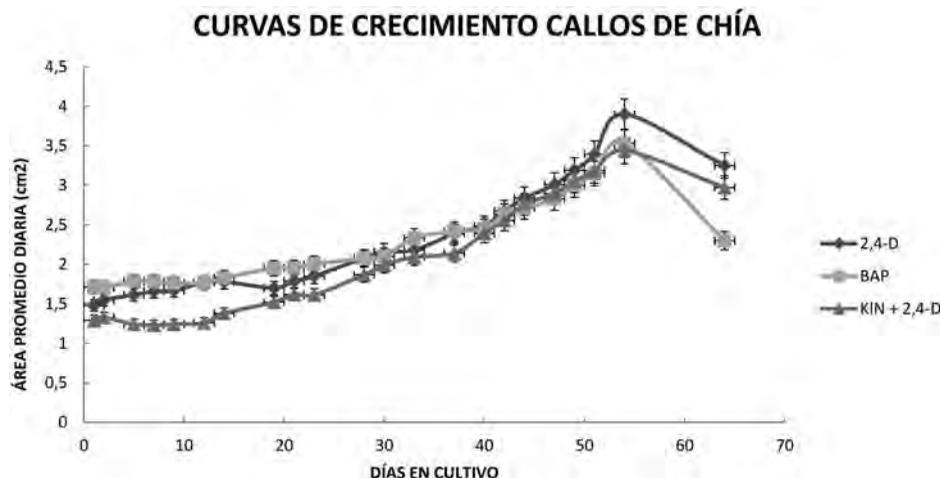
La tasa de multiplicación en medio MSRT fue mayor (75 %) que en medio MSRT/2 (32 %) resultando el crecimiento en altura menor en el medio MSRT/2 (Tabla 1). Las plántulas pudieron mantenerse *in vitro* por períodos de tiempo de hasta 4 meses sin subcultivos a medio fresco cuando se utiliza AIA ($5,71\mu\text{M}$) como regulador de crecimiento.

Inducción de callos

Los mejores resultados, callos verdes y friables, se obtuvieron utilizando BAP ($1,00\mu\text{M}$) como regulador

Tabla 1.- Influencia de la concentración de los macro y micro nutrientes del medio de cultivo sobre las características de las plántulas de chíá desarrolladas *in vitro* y sobre la tasa de multiplicación

Medio de cultivo	Color	Altura final	Tasa de multiplicación
MSRT	Verde intenso	8 cm	75%
MSRT/2	Verde claro	5 cm	32%

Figura 1.- Influencia de reguladores de crecimiento sobre el desarrollo de callos de *Salvia hispánica* L. (“chía”)

Los cultivos están mantenidos en cámara de cultivo a 24 °C y con un fotoperíodo de 16 horas (irradiancia 1,8 wm^{-2} seg^{-1}).

de crecimiento. Los callos tratados con 2,4-D (2,25 μM) o con la combinación 2,4-D: KIN (0,45 μM : 0,46 μM) resultaron rizogénicos, como ya fue observado para otras especies anteriormente (Álvarez y col., 1993; Álvarez, 2014). Los explantos provenientes de la hoja no resultaron eficientes para iniciar cultivos de callos *in vitro*. Estos resultados concuerdan con lo informado por Bueno y col. (2010).

Curva de crecimiento

Tal como se aprecia en la figura 1, el período latencia de estos cultivos se extiende hasta los 19 días, la fase de crecimiento exponencial se observa entre los 20 y los 54 días seguida por una fase estacionaria de 5 días ingresando luego en la fase de muerte del cultivo. Los valores de la velocidad específica de crecimiento máximo ($\mu_{\text{máx}}$), el tiempo de duplicación (td) y la biomasa máxima ($X_{\text{máx}}$) se observan en la tabla 2.

La biomasa máxima más alta, la mayor velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación más bajo

fueron obtenidos utilizando 2,4-D (2,25 μM) como regulador de crecimiento. El análisis de ANOVA y test de Tukey no muestran diferencias significativas entre los otros tratamientos ($P < 0,05$).

Análisis de ácidos grasos

Los valores de ácidos grasos determinados en las muestras de los diferentes tratamientos ($n = 11$) se pueden observar en la tabla 3. Como se puede ver en la tabla, los contenidos de ácidos grasos no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre callos que han sido cultivados con los diferentes reguladores de crecimiento. El presente estudio fue llevado a cabo en el laboratorio de agroalimentos del INTI.

Conclusiones

Se establecieron cultivos de *in vitro* de *S. hispánica* (“chía”) y se determinó que 2,4-D (2,25 μM) como regulador del crecimiento, una temperatura de

Tabla 2.- Parámetros de crecimiento obtenidos a partir del análisis de las curvas de crecimiento

Índice de crecimiento	BAP (1 μM)	2,4-D (2,25 μM)	2,4-D: kin (0,45; 0,46 μM)
$\mu_{\text{máx}}$ (días^{-1})	0,014 \pm 0,01	0,022 \pm 0,01	0,013 \pm 0,01
td (días)	49,51 \pm 1,00	31,51 \pm 1,00	53,32 \pm 1,00
$X_{\text{máx}}$ (g)	1,38 \pm 0,01	1,46 \pm 0,01	1,12 \pm 0,01

Tabla 3.- Efecto de reguladores de crecimiento en medio MSRT sobre el contenido de ácidos grasos en callos de “chía” (*Salvia hispanica* L.)

	Regulador de crecimiento (μM)		
	BAP [1]	2,4-D [2,25]	2,4-D: kin [0,45: 0,46]
Materia grasa (%)	0,8 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1

24 \pm 2 °C y un fotoperíodo de 16 horas, fueron las condiciones óptimas para la inducción de callos. Para el mantenimiento de los callos en condiciones friables resultó más adecuado BAP (1 μM), no obstante su menor velocidad de crecimiento. En cuanto al contenido de ácidos grasos (0,83 % en promedio) es significativamente más bajo que el de las semillas (56 % aproximadamente) después de 6 meses en cultivo.

Respecto del cultivo de plántulas este fue posible aun cuando los nutrientes de este medio se encuentran reducidos a la mitad de su concentración original. Para lograr diseñar un proceso productivo de omega-3 a partir de cultivos *in vitro* de “chía” en futuros trabajos se debería encarar el análisis del efecto de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento y otros componentes del medio de cultivo (fuentes de carbono y nitrógeno, entre otras) o sobreexpresar las enzimas clave para la biosíntesis de omega-ácidos mediante ingeniería genética.

Referencias bibliográficas

- Álvarez, M.A. (2014). “*In vitro* Plant Cultures as Biofactories” en *Plant Biotechnology for Health: From Secondary Metabolites to Molecular Farming* Cap. 4. Springer International Publishing Switzerland (1ª ed): 33-59.
- Álvarez, M.A.; Nigra, H.M.; Giulietti, A.M. (1993). “Solasodine production by *Solanum eleagnifolium* Cav. *in vitro* cultures: Influence of plant growth regulators, age and inoculum size. Large-scale production”. *Natural Product Letters* 2 (1): 9-19.
- Álvarez, M.A.; Fernandez Eraso, N.; Pitta Alvarez, S.I.; Marconi, P.L. (2009). “Two-stage culture for producing berberine by cell suspension and shoot cultures of *Berberis buxifolia* Lam.”, *Biotechnology Letters* 31: 457-463.
- Bueno, M.; Di Sapiro, O.; Barolo, M.; Villalonga, M.; Busilacchi, H.; Severin, C. (2010). “In vitro response of different *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae) explants”. *Molecular Medicinal Chemistry* 21: 125 -126.
- Grostein, I. (2008). “Effects of different plant hormones of *Salvia officinalis* cultivated in vitro”. *International Journal of Botany* 4 (4): 430-436.
- Ixtaina, V. (2010). “Caracterización de la semilla y el aceite de Chía obtenido mediante distintos procesos. Aplicación en tecnología de Alimentos”. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina [en línea: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2679>].
- Khanna, P.; Staba, J.E. (1968). “Antimicrobials from plant tissue cultures”. *Lloydia* 31 (2): 180-189.
- Journal of the Association of Official Agricultural Chemists (1975). “Método Oficial 925.32 AOAC”. 58, 314.
- Marconi, P.L.; López, M.C.; De Meester, J.; Bovjin, C.; Álvarez, M.A. (2013). “*In vitro* establishment of *Salvia hispanica* L. plants and callus”. *Biotechnology vegetal* 13 (4): 203-207.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Simopoulos, A. (2009). “The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases”. *Experimental Biology and Medicine Journal* 6: 674-688.
- Vega Aguilar, A. (2011). “Efecto del 2,4-D y de AIA en la callogénesis de zanahoria (*Daucus carota*)”, Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Yuriko, A.; Darshan, K. (2010). “Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega 3 polyunsaturated fatty acids”. *Journal of Nutritional Biochemistry* 21: 781-792.

Dominguezia

Índice acumulado

Dominguezia 33(1) 2017

XII Simposio Argentino de Farmacobotánica - I Jornadas de la Enseñanza de la Farmacobotánica

Dominguezia 33(2) 2017

Búsqueda de compuestos bioactivos en *Erythrina crista-galli* infectada con *Phomopsis* sp. (FLAVIA REDKO)

Las especies arbóreas de los jardines del Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan" (BEATRIZ G. VARELA, HERNÁN G. BACH, MARCELO L. WAGNER, PAULO CÁCERES GUIDO)

"Improntas" reveladora de caracteres micrográficos epidérmicos con aplicación en el control de calidad de plantas medicinales (CARLOS G. ALTAMIRANO, MARTA E. YAJÍA)

Etnobotánica histórica de las misiones franciscanas del este de Formosa. II: Identificación y análisis de datos inéditos y reelaboración integral de fuentes ya publicadas a partir de hallazgos documentales (GUSTAVO F. SCARPA, LEONARDO M. ANCONATANI)

Dominguezia 34(1) 2018

Un estudio transversal de *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) - Revisión (FRANCISCO JOSÉ GONZÁLEZ MINERO)

Análisis comparativo de las estructuras endomorfológicas de hojas verdes sin procesar y zapecadas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae). Modificaciones cito-histológicas (CARLOS G. ALTAMIRANO, MARTA E. YAJÍA)

Caracterización química y cuantificación de fenoles totales en aceite de semillas de *Cucurbita* spp. (GABRIELA M. VALENZUELA, MARÍA CECILIA GIMÉNEZ, ARIADNA S. SORO)

Composición fitoquímica y nutricional de *Momordica charantia* y actividad antioxidante (LORENA V. SEMENIUK, ALBERTO J. BELA, CARLOS A. VONKA, MARA C. ROMERO, MARÍA B. NUÑEZ)

Efecto diurético de *Cuphea glutinosa* Cham. et Schldl (Lythraceae), en ratas Wistar (ROMINA B. BALMACEDA, FRANCISCO J. CARDINALI, MARIO A. THEVENON, MARÍA ELENA DI SANTO)

Análisis de polifenoles e iniciación de cultivos *in vitro* de *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (Loranthaceae) de ejemplares provenientes de la localidad La Población, provincia de Córdoba, Argentina (MARÍA V. RICCO, MARTÍN L. BARI, RAFAEL A. RICCO, MARCELO L. WAGNER, MARÍA A. ÁLVAREZ)

Dominguezia 34(Suplemento) 2018

VI Jornadas Nacionales de Plantas aromáticas nativas y sus aceites esenciales - II Jornadas Nacionales de Plantas medicinales nativas Prof. Dr. Arnaldo Luis Bandoni