

Análisis Micrográfico de Dos Hemiparásitas Argentinas Usadas en Medicina Popular y su Aplicación en el Control de Calidad

Beatriz G. VARELA * y Alberto A. GURNI

Cátedra de Farmacobotánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica (U.B.A),
Junín 956, 4º Piso, 1113 Buenos Aires, Argentina

RESUMEN. *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. y *Psittacanthus cordatus* (Hoff. ex Schult.) Blume son dos especies de *Loranthaceae* que crecen en la República Argentina. Las hojas se utilizan en medicina popular como potenciales hipotensores. *L. cuneifolia*, de la cual se reportan estudios químicos y farmacológicos, es la más comercializada. Las hojas enteras de *P. cordatus* difieren de las de *L. cuneifolia* pero la identificación se dificulta pues se expenden muy trozadas. El objetivo es establecer parámetros micrográficos que diferencien las especies mediante técnicas sencillas. Los elementos relevantes son esclereidas irregulares, ramificadas, cristalíferas, en *L. cuneifolia* y esclereidas regulares, isodiamétricas, cristalíferas y drusas de oxalato de calcio en *P. cordatus*. Se proponen también metodologías alternativas para el control de calidad de muestras comerciales.

SUMMARY. "Micrographic analysis of two Argentine hemiparasitic plants employed in folk medicine: its use in quality control". *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. and *Psittacanthus cordatus* (Hoff. ex Schult.) Blume are two Argentine Loranthaceae species growing in Argentina. Their leaves are employed in folk medicine as putative high blood pressure reducers. *L. cuneifolia*, of which chemical and pharmacological studies have been reported, is the most commercialized species. *P. cordatus* entire leaves are different from those of *L. cuneifolia*, but commercial samples are generally very fragmented, turning identification enough difficult. The aim of this work is to establish micrographic features which could be used in species characterization using simple methods. The main differential characters are branched crystalliferous sclereids in *L. cuneifolia* and isodiametric crystalliferous sclereids and calcium oxalate druses in *P. cordatus*. Alternative methods for quality control of commercial samples are also established.

INTRODUCCIÓN

En la República Argentina crecen diferentes especies de *Loranthaceae*¹, cuyos órganos vegetativos –hojas y tallos– se utilizan en medicina popular en forma de infusión, solas o en mezclas. Se caracterizan por ser plantas hemiparásitas leñosas o semileñosas que desarrollan sobre árboles o arbustos. Están estrechamente relacionadas por su hábito hemiparásito con el "muérdago europeo" (*Viscum album* L. --*Viscaceae*–), de reconocidas propiedades hipotensoras e inmunomoduladoras. El uso de estas plantas como potenciales hipotensores, se atribuye a las semejanzas morfológicas con la especie europea².

En nuestro medio, se reconoce como sustituto natural del muérdago europeo a *Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh.³, de la cual se han realizado diversos estudios acerca de su composición química y de sus propiedades farmacológicas sobre la hipertensión e inmunológicas^{4,5}. Se toma como especie de referencia y es la más comercializada en la Argentina. Según la región, recibe diversos nombres vulgares como "muérdago criollo", "liga" o "liguilla". Crece con preferencia sobre *Fabaceae* leñosas y también sobre especies de otras familias de arbustos o árboles nativos. También parasita árboles frutales. Se extiende desde el NO al NE, centro y precordi-

PALABRAS CLAVE: Anatomía foliar y caulinar; hipotensores, *Liga*, *Ligaria cuneifolia*, *Loranthaceae*, Medicina popular, Muérdago criollo, *Psittacanthus cordatus*.

KEY WORDS: Argentine mistletoe, Blood pressure decreasing, Folk medicine, Leaf and stem anatomy, *Liga*, *Ligaria cuneifolia*, *Loranthaceae*, *Psittacanthus cordatus*.

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. E-mail: bgvarela@huemul.ffyb.uba.ar

llera de Argentina, abarcando una gran cantidad de provincias ⁶.

En el mercado popular medicinal y con el mismo fin se expenden otras especies de *Loranthaceae*. Cuando las plantas se encuentran en estado vegetativo, sobre todo cuando son muy jóvenes, las partes utilizadas de estas especies -tallos y hojas- presentan semejanzas morfológicas.

En esta oportunidad se compara con *L. cuneifolia* la especie *Psittacanthus cordatus* (Hoff. ex Schult.) Blume, conocida como "injerto". Crece sobre diversos hospedantes en la provincia de Formosa ⁶ y la información sobre sus propiedades terapéuticas es escasa. No se descarta su uso en medicina popular, por cuanto los pobladores indican que se emplea la "planta de flores rojas". Ambas especies poseen este carácter en común y la forma y tamaño de las flores son muy similares, lo cual puede llevar a la mezcla de una especie con la otra, con la posible aparición de efectos adversos.

Si bien las hojas enteras de *P. cordatus* difieren en tamaño y forma de las de *L. cuneifolia*, en el comercio se expenden usualmente muy trituradas. La identificación se torna dificultosa y es indispensable recurrir a la microscopía como método de análisis.

En este trabajo se realizan estudios anatómicos comparativos de las especies con el fin de establecer su correcta caracterización. Se podrán aplicar a muestras de tallos y hojas que se presenten enteras o relativamente trozadas.

En la Figura 1 está representada el área de distribución de las especies estudiadas, en tanto que en la Tabla 1 se resume la morfología externa de ambas plantas basada en descripciones

preexistentes ⁶, que se corroboró al realizar la determinación de los ejemplares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales examinados

Se analizaron hojas y tallos de ejemplares que crecen sobre diferentes hospedantes. Algu-

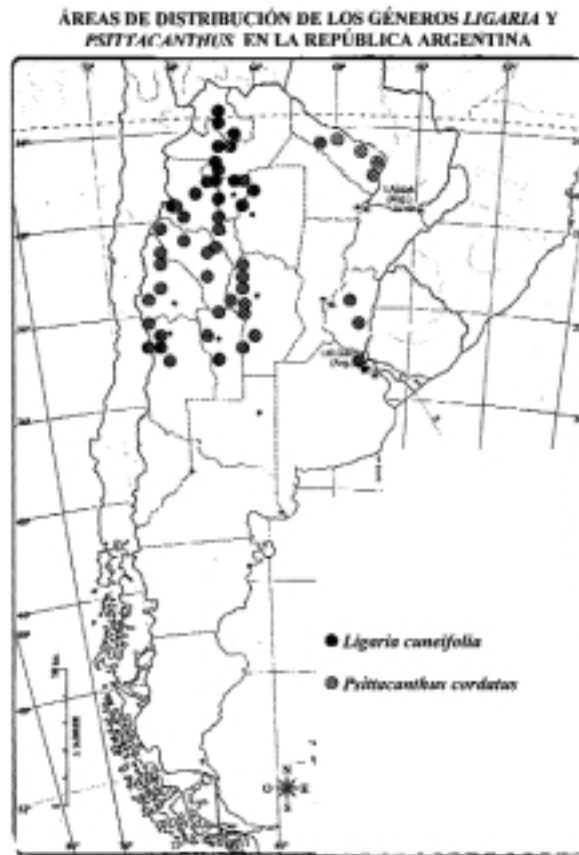


Figura 1. Área de distribución de las especies estudiadas.

Órgano	<i>Ligaria cuneifolia</i>	<i>Psittacanthus cordatus</i>
Tallos	Ramas adultas cilíndricas y jóvenes subcomprimidas, rugoso-estriadas. Nudos inconspicuos.	Ramas cilíndricas, opuestas oseudocotómicas, con entrenudos articulados.
Hojas	Subopuestas a alternas, subsésiles, de 1,5-6,5 cm de longitud x 4-15 mm de ancho. Carnosas o coriáceas, sin nervios visibles o 3-nervadas.	Opuestas, de 6-10 cm de largo x 1,8-4,5 cm de ancho, de base cordada, abrazadora. Coriáceas, con nervaduras prominentes, muy reticuladas.
Flores	Hermafroditas, 6-meras, de 3,5-5,5 cm de largo, rojas, anaranjadas o amarillas.	Hermafroditas, 6-meras, de 4,5-6,0 cm de largo, rojas.
Inflorescencias	Racimos axilares unifloros. (a veces 2-flores).	Racimos axilares de tríades pediceladas.
Fruto	Baya globosa o aovada, negruzca, coronada por el cálculo tubuloso.	Baya aovada, coronada por el cálculo tubuloso.

Tabla 1. Cuadro comparativo de la morfología externa de las especies estudiadas.

nos fueron recolectados en viajes de estudio por distintas regiones del país y otros provienen de muestras desecadas de herbario y muestras comerciales. Se determinaron mediante el uso de claves sistemáticas adecuadas ^{6,7}, catálogos ⁸ y comparación con material de referencia (BAF, SI). Los ejemplares estudiados se describen a continuación.

***Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh. var. *cuneifolia* (R. & P.) Blume**

CATAMARCA: - Camino a El Rodeo, Leg. A.A. Gurni y G. Bassols s.n., (IX-1995), sobre *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. (Anacardiaceae). JUJUY: - Camino a Peña Blanca, Leg. A.A. Gurni y M. Wagner s.n., (10/III/1992), sobre *Schinus polygama* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae); - Tilcara, Leg. N.D. Vignale y S. Domenech N°809, (26/IV/1996), sobre *Acacia caven* (Mol.) Molina (Fabaceae). SALTA: - Universidad Nacional, Leg. A.A. Gurni y M. Wagner s.n., (19/IX/1985), sobre hospedante sin especificar; - Faldeo Cerro San Bernardo, Leg. A.A. Gurni y M. Wagner s.n., (20/IX/1985), sobre hospedante sin especificar; - Coronel Moldes, Leg. H.A. Bartlett N°19638 (SI 44542), (12/II/1943), sobre *Prosopis nigra* (Gris.) Hieron. (Fabaceae). TUCUMÁN: - Departamento Trancas, Leg. G. Ponessa s.n., (II/2001), sobre *Acacia furcatispina* Burkart (Fabaceae); - Cerca de Siambón, Leg. G. Ponessa s.n., (8/V/2001), sobre hospedante sin especificar; - Tafí, camino a Raco, Leg. G. Ponessa s.n., (22/VIII/2001), sobre hospedante sin especificar.

***Psittacanthus cordatus* (Hoff. ex Schult.) Blume**

FORMOSA: - Formosa, Leg. Villa s.n., (BAF), (I/1902), sobre hospedante sin especificar; - Montes ribereños, Leg. T. Rojas N°107996, (SI), (3/IV/1944), sobre hospedante sin especificar; - Laguna Oca, Leg. T. Rojas, (SI 44546), (3/IX/1944), sobre hospedante sin especificar; - Laguna Blanca, Leg. A.A. Gurni s.n., (28/V/2000), sobre *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae).

Métodos

Se seleccionaron hojas adultas y tallos de tamaño homogéneo en las dos especies. Los métodos se aplicaron tanto sobre ejemplares fijados en F.A.A (formalina aceto-alcohólica) como sobre material desecado proveniente de herbario o de muestras comerciales. Se realizaron las técnicas histológicas y métodos de análisis que se indican a continuación.

Disociación leve. Para las hojas y tallos, con hidróxido de sodio 5%, 10 minutos a ebullición, lavado con agua destilada y conservación en alcohol etílico 70° ^{9,10}.

Disociación fuerte de Boodle. Para los tallos, con hidróxido de potasio 10%, 10 minutos a ebullición y ácido crómico 25%, 20 minutos a temperatura ambiente, lavado con agua destilada y conservación en alcohol etílico 70° ^{9,10}.

Transcortes. Los materiales se incluyeron en parafina y se cortaron utilizando un micrótom rotatorio. También se realizaron cortes a mano alzada o con micrótomos manuales ^{10,11}. El material fijado en F.A.A fue procesado directamente mientras que los materiales desecados se hidrataron previamente en agua a ebullición durante 5 minutos.

Coloración. Doble diferencial con Safrana-Fast Green ^{11,12}.

Caracterización de cristales. Ácido clorhídrico 2N, ácido nítrico 60% y observación con luz polarizada. (LP).

Determinación del índice de estomas. El material a observar se preparó según la técnica de "peeling" de Ghouse y Yunus ¹³ modificada; la modificación consiste en omitir la coloración y hacer el montaje en gelatina glicerina. El índice de estomas se determinó para ambas epidermis según la técnica de Wallis ¹⁴ realizando para cada ejemplar 10 determinaciones en ambas epidermis y calculando el promedio. Se estudiaron hojas de 30-55 mm de longitud para *L. cuneifolia* y de 50-55 mm para *P. cordatus*. Se utilizó para la observación un ocular de dibujo de 8x Carl Zeiss.

Fotografías. Los preparados obtenidos de las disociaciones y los transcortes se fotografiaron con un fotomicroscopio Carl Zeiss Axiolab MC 80 DX.

Esquemas. Los dibujos de los transcortes se realizaron con la ayuda de un ocular de dibujo de 8x Carl Zeiss adosado a un microscopio Axiolab MC 80 DX.

RESULTADOS

***Ligaria cuneifolia* (R. & P.) Tiegh.**

Anatomía foliar (Figura 2)

Las hojas presentan una cutícula estriada sobre ambas epidermis. La epidermis adaxial presenta células cuadrangulares de paredes radiales rectas. Los estomas son de tipo paracítico. El índice estomático (I.E) promedio para esta epidermis es de 13,9. La epidermis abaxial presenta también células de tipo cuadrangular con paredes radiales rectas y estomas paracíticos. El índice estomático promedio es de 12,9.

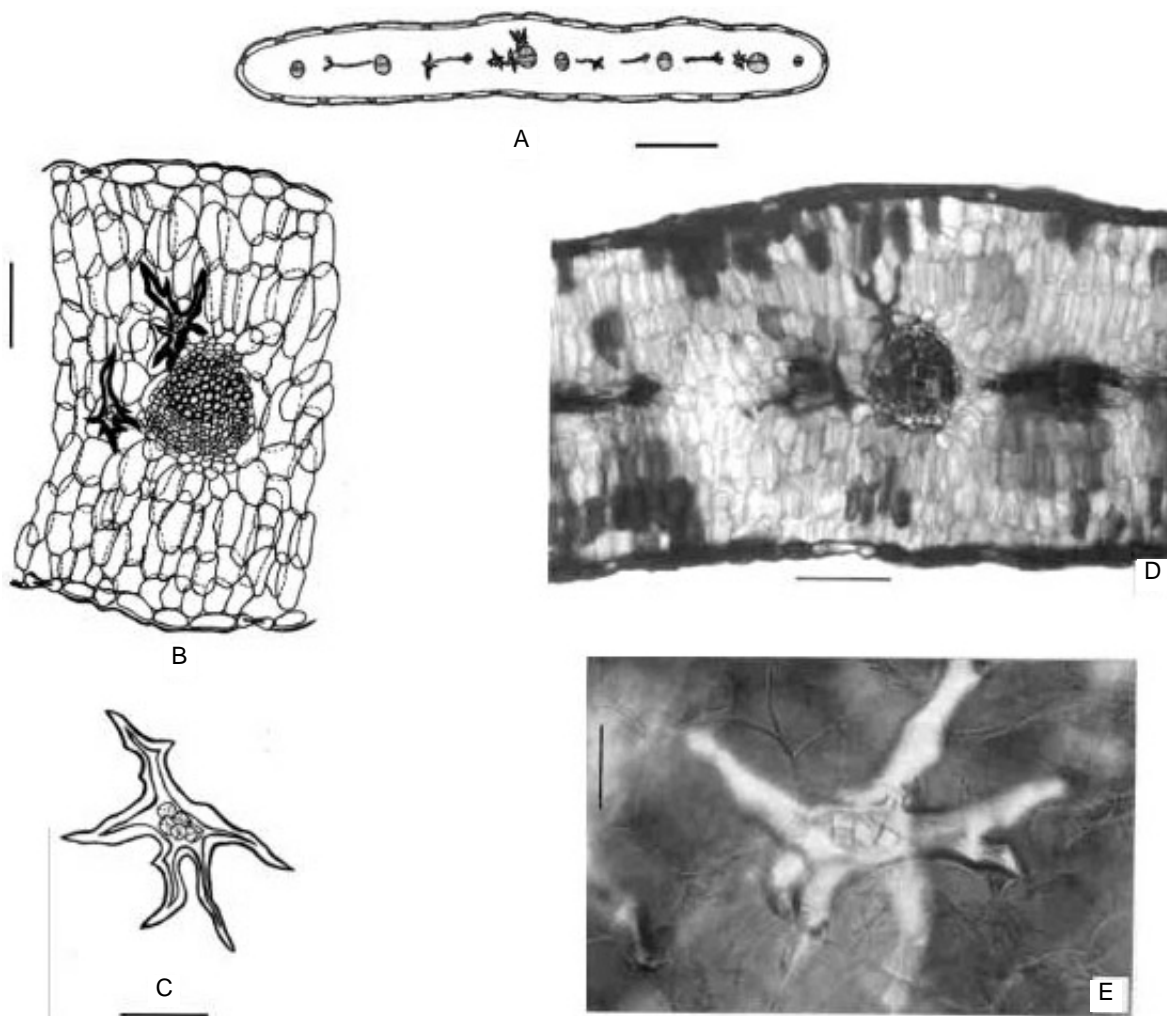


Figura 2. Aspectos anatómicos foliares de *L. cuneifolia*: **A:** Esquema del transcorte de la hoja; **B:** Detalle de un sector; **C:** Detalle esclereida cristalífera; **D:** Fotomicrografía del transcorte de hoja; **E:** Esclereida cristalífera observada con LP. **Escala:** **A:** 800 μm ; **B:** 150 μm ; **C:** 65 μm ; **D:** 200 μm ; **E:** 50 μm .

El mesófilo es isobilateral con dos capas de células en empalizada sobre ambas epidermis y células más cortas en el centro. En el clorénquima central se observan esclereidas solitarias, de forma irregular, ramificadas que contienen cristales prismáticos.

El tejido conductor está constituido por un haz vascular central grande y varios haces menores a cada lado. Están acompañados por arcos de fibras. El disociado leve del material permite distinguir, además de los elementos ya descritos, fibras de contorno sinuoso y tráqueas de tipo punteado y reticulado.

Anatomía caulinar (Figura 3)

Los tallos en transcorte presentan sección circular. Poseen una cutícula gruesa, papilosa. Las células epidérmicas son papilosas en su pared tangen-

cial externa. Los estomas son de tipo paracítico.

El parénquima cortical es heterogéneo con dos clases de células: las 3-4 primeras capas, alargadas radialmente y luego tangencialmente. En el parénquima cortical se observan esclereidas solitarias, de forma irregular, ramificadas y cristalíferas.

El tejido conductor está formado por haces vasculares colaterales abiertos. Sobre el floema se observan casquetes de fibras. El xilema forma un anillo más o menos continuo con numerosos grupos de fibras lignificadas. Los radios medulares están formados por 2-4 hileras de células parenquimáticas alargadas radialmente.

La médula está constituida por células isodimétricas y algunas esclereidas ramificadas y cristalíferas. La región perimedular está constituida por células con puntuaciones simples.

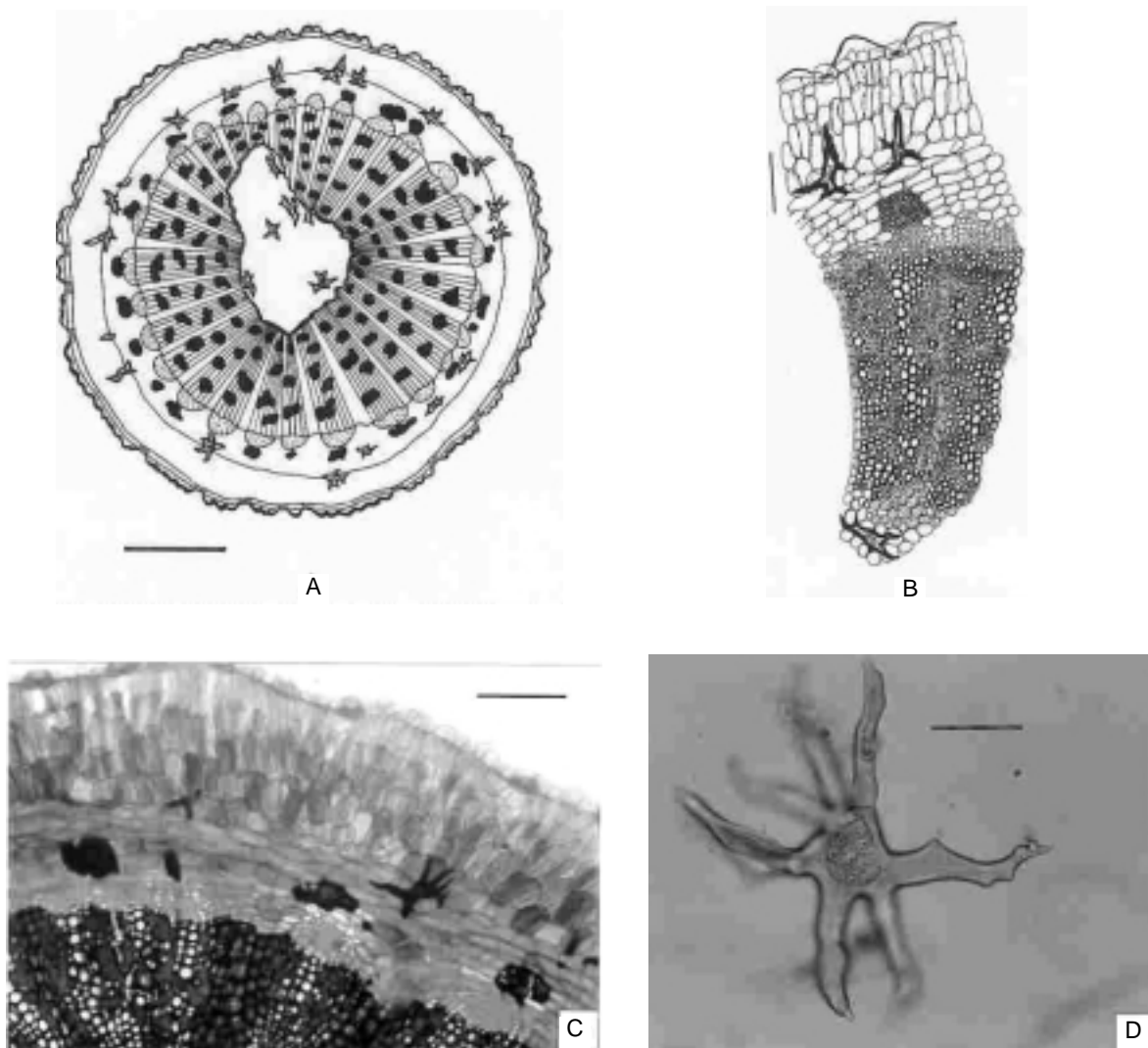


Figura 3. Aspectos anatómicos caulinares de *L. cuneifolia*: **A:** Esquema del transcorte de tallo; **B:** Detalle de un sector; **C:** Fotomicrografía del transcorte de tallo; **D:** Esclereida cristalífera en el disociado. **Escala:** **A:** 800 μ m; **B:** 150 μ m; **C:** 200 μ m; **D:** 50 μ m.

***Psittacanthus cordatus* (Hoff. ex Schult.)**

Blume

Anatomía foliar (Figura 4)

Las hojas presentan cutícula más gruesa que *L. cuneifolia*. La epidermis adaxial está formada por células poligonales de paredes radiales rectas. Los estomas son de tipo paracítico. El índice estomático promedio es de 11,7. La epidermis abaxial está formada por células poligonales con paredes radiales rectas y estomas de tipo paracítico. El índice estomático promedio es de 12,2.

El mesófilo es isobilateral con dos capas de células en empalizada en relación con ambas epidermis y en el centro células más cortas. En el clorénquima central, algunas de las células contienen drusas de oxalato de calcio. El agre-

gado de ácido clorhídrico 2N provoca su disolución.

Los haces vasculares presentan casquetes de fibras sobre el xilema y por debajo del floema; algunas de estas fibras contienen cristales cúbicos o prismáticos de oxalato de calcio. Se observan esclereidas isodiamétricas, cristalíferas entre los haces vasculares y en los extremos foliares.

Anatomía caulinar (Figura 5)

Los tallos en transcorte tienen sección circular. Presentan peridermis con 3-4 estratos de células suberosas. El parénquima cortical es homogéneo con células isodiamétricas. Se observan esclereidas isodiamétricas con cristales, en grupos numerosos, ubicadas a distintos niveles del parénquima cortical. En esta misma zona

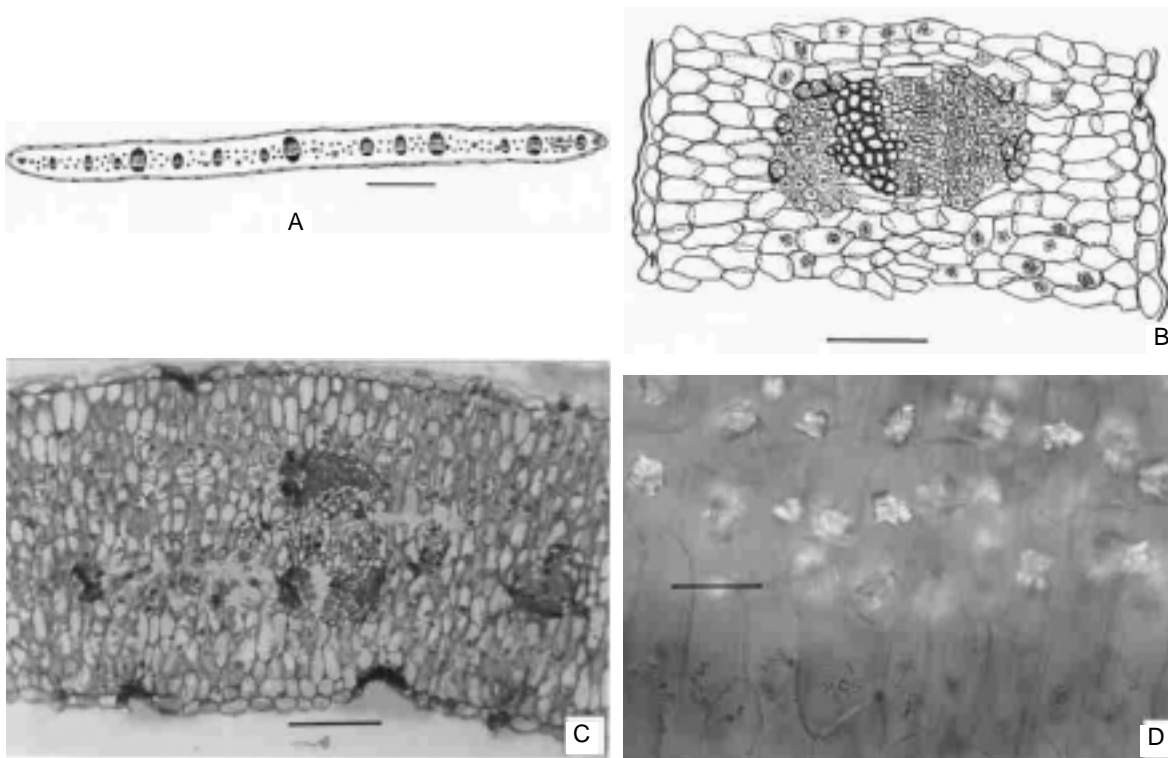


Figura 4. Aspectos anatómicos foliares de *P. cordatus*: **A:** Esquema del transcurso de la hoja; **B:** Detalle de un sector; **C:** Fotomicrografía del transcurso de hoja; **D:** Drusas observadas con LP. Escalas: **A:** 800 μm ; **B:** 150 μm ; **C:** 200 μm ; **D:** 50 μm .

aparecen células con drusas de oxalato de calcio. El agregado de ácido clorhídrico 2N provoca su disolución.

Los haces vasculares forman un anillo continuo y presentan casquetes de fibras sobre el floema. Los radios medulares están formados por tres hileras de células anchas.

La médula comprende células parenquimáticas isodiamétricas y numerosos grupos de esclereidas regulares, isodiamétricas, algunas cristalíferas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las especies analizadas presentan algunos caracteres comunes estables que comparten con otros representantes de *Loranthaceae* y *Viscaceae*: estomas de tipo paracítico, venas foliares terminadas en traqueidas dilatadas y paquetes de fibras próximos a los haces vasculares^{15,16}.

Existe una serie de elementos que se consideran importantes para diferenciar las especies. Estos elementos diferenciales se mantienen estables dentro de una misma especie, independientemente del lugar y del hospedante sobre el cual crecen.

Sobre la base de los estudios realizados y de trabajos anteriores^{17,18}, se establece un cuadro comparativo de los caracteres anatómicos diferenciales más importantes a los fines de caracterización de las especies (Tabla 2).

La presencia de esclereidas irregulares, ramificadas y cristalíferas en hojas y tallos resulta tener carácter diagnóstico para *Ligaria cuneifolia*. Las células con drusas de oxalato de calcio y las esclereidas isodiamétricas en hojas y tallos caracterizan a *Psittacanthus cordatus*. La naturaleza química de las drusas se determinó con el agregado de ácido clorhídrico 2N, observándose su disolución. Los cristales presentes dentro de las esclereidas no se disuelven con ácido clorhídrico pero sí con ácido nítrico al 60%.

Los caracteres anatómicos descriptos resultan adecuados cuando se trata de determinar sustituciones de una droga por otra, ya sea en muestras fragmentadas de una sola especie o bien en mezclas.

Es importante destacar que para la observación de estos caracteres diferenciales, se puede recurrir a técnicas sencillas como la disociación leve, método que conserva intactos los cristales de oxalato de calcio.

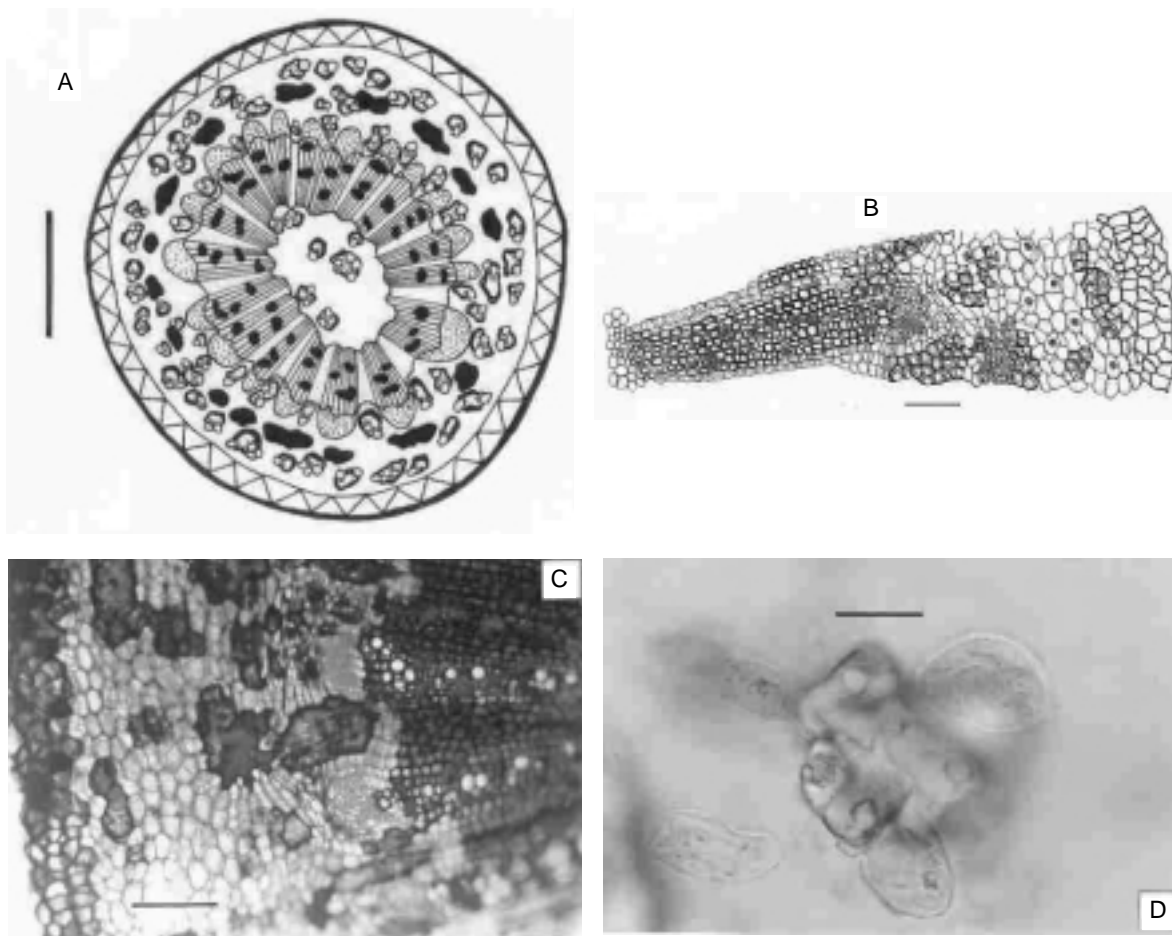


Figura 5. Aspectos anatómicos caulinares de *P. cordatus*: **A:** Esquema del transcorte de tallo; **B:** Detalle de un sector; **C:** Fotomicrografía del transcorte de tallo; **D:** Esclereidas cristalíferas en el disociado. **Escala:** **A:** 800 µm; **B:** 150 µm; **C:** 200 µm; **D:** 50 µm.

Órgano	<i>Ligaria cuneifolia</i>	<i>Psittacanthus cordatus</i>
Hoja	<p>Cutícula medianamente gruesa. Células epidérmicas cuadrangulares de paredes radiales rectas. IE/ES: 13,9; IE/EI: 12,9 Esclereidas irregulares, ramificadas, con cristales prismáticos, solitarias en el clorénquima central. Drusas ausentes.</p>	<p>Cutícula gruesa. Células epidérmicas poligonales con paredes radiales rectas. IE/ES: 11,7; IE/EI: 12,2 Esclereidas isodiamétricas, con cristales prismáticos, entre los haces vasculares y en los extremos foliares. Drusas de oxalato de calcio en las células clorénquimáticas centrales.</p>
Tallo	<p>Cutícula gruesa, papilosa. Parénquima cortical heterogéneo, con células alargadas radialmente y luego tangencialmente. Esclereidas irregulares, ramificadas, cristalíferas, solitarias ubicadas en el parénquima cortical. Drusas ausentes. Médula con esclereidas irregulares.</p>	<p>Súber con 3-4 estratos de células. Parénquima cortical homogéneo con células redondeadas. Esclereidas isodiamétricas, con cristales, en grupos numerosos, ubicadas a distintos niveles del parénquima cortical. Drusas de oxalato de calcio en células del parénquima cortical. Médula con esclereidas regulares, algunas cristalíferas.</p>

Tabla 2. Cuadro comparativo de los caracteres anatómicos diferenciales.

Los pasos a seguir en el control de calidad de las especies analizadas, se pueden resumir de la siguiente manera de acuerdo con el grado de dificultad encontrado:

Disociación leve de las hojas. Permite la visualización de los caracteres diferenciales más relevantes, constituidos por las esclereidas ramificadas de *L. cuneifolia* y las drusas de oxalato de calcio en *P. cordatus*.

Disociación fuerte de los tallos. Se visualizan las esclereidas, que son diferentes en cada especie.

Transcorte y coloración de hojas y tallos. Permite observar la disposición de los tejidos y ofrece la información completa acerca de los caracteres anatómicos de ambas especies.

Determinación de índice de estomas. Es un carácter diferenciador más. Requiere el empleo de un ocular de dibujo, de un tubo de dibujo o de una cámara clara. No todos los laboratorios encargados de control de calidad de plantas medicinales cuentan con estos elementos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Barlow, B.A. (1964) *Proc. Linn. Soc. N.S. Wales* **89**, Part 2: 268-72
2. Wagner, M.L. (1993) "*Estudios fitoquímicos comparativos de los flavonoides de Loranthaceae de la flora argentina. Relación con el muérdago europeo*". Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires, págs. 4-18.
3. Tieghem, M. P. van (1895) *Bull. Soc. Bot. Fr.* **42**: 178-9, 344-8.
4. Fernández, T., B.G. Varela, C. Taira, R.A. Ricco, A.A. Gurni, S.E. Hajos, E. Alvarez & M.L. Wagner (2000) "*Mistletoes from Argentina. Ligaria cuneifolia var. cuneifolia as a substitute for the European mistletoe (Viscum album)*", en "*Mistletoe. Genus Viscum and other Genera*". Harwood Academic Publishers, Amsterdam, págs. 61-74.
5. Varela, B.G., T. Fernández, C. Taira, P. Cerdá Zolezzi, R.A. Ricco, E. Caldas López, E. Alvarez, A.A. Gurni, S. Hajos & M.L. Wagner (2001) *Dominguezia* **17**: 31-50.
6. Abbiati, D. (1946) *Rev. Museo La Plata*, Tomo VII, Sección Botánica 18: 1-59.
7. Subils, R. (1984) *Bol. Soc. Arg. Bot.* **23**: 176
8. Zuloaga, F & O. Morrone (1999) "*Monographs in Systematic Botany*", Missouri Botanical Garden Press 74: 796-8.
9. D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986) "*Manual de técnicas en Histología Vegetal*". Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, págs 43-57.
10. Normas IRAM Números 37500 y 37501 (1993) Instituto Argentino de Racionalización de Materiales, Buenos Aires, Argentina.
11. Gattuso, M. y S. Gattuso (1983) "*Conocimientos básicos de Técnicas Histológicas en material vegetal*". Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Argentina, págs. 60-83.
12. Dizeo de Strittmatter, C. (1979) *Bol.Soc.Arg. Bot.* **18**: 121-2.
13. Ruzin, S.E. (1999) "*Plant Microtechnique and Microscopy*". Oxford University Press, pág. 133.
14. Wallis, T. E. (1965) "*Manual de Farmacognosia*". Ed. Continental, México, pág. 138.
15. Metcalfe, C. R. & L. Chalk (1957) "*Anatomy of the Dicotyledons*". Clarendon Press, Oxford, págs. 1188-94.
16. Escalante, M. G. & J. A. Liceaga (1956) *An. Farm. Bioquím. Buenos Aires* **22**, 2ª Serie: 101-12.
17. Varela, B.G. & A. A. Gurni (1995) *Acta Farm. Bonaerense* **14**: 21-9.
18. Varela, B G. & A.A. Gurni (1999) *Acta Farm. Bonaerense* **18**: 251-6.