



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.LP

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

Actividad antifúngica de
Terminalia australis Cambessedes
Exo-endomorfología de sus órganos aéreos.

Tesis para optar al título de
Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas

STELLA MARIS CARPANO

DIRECTORES DE TESIS

Dra. María Teresa Paineira

Dra. Etilé Dolores Spegazzini

2007

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral está dedicada con profundo afecto y gratitud...

A la Prof. Dra. Etilé Dolores Spegazzini por la constante bondad y generosidad desde los comienzos y a lo largo de toda una vida de sincera amistad. Sin su tenacidad y su cariño jamás podría haber logrado concluir este trabajo.

A la memoria del Prof. Dr. Manuel Gaspar Escalante por su bondad y sabiduría, por haberme dedicado tiempo y paciencia al iniciarme en el hermoso camino de la investigación.

A la Prof. Marta Teresa Nájera por sus invaluable consejos como docente e investigadora.

A la Prof. Dra. María Teresa Paineira por su generosidad y apoyo en la realización de este trabajo.

Al Prof. Dr. Néstor Oscar Caffini por su tiempo, por sus palabras de aliento y sobretodo por sus desinteresados consejos que valoro muchísimo.

A lo docentes y no docentes de la Cátedra de Farmacobotánica que me apoyaron durante todos estos años para continuar con mis estudios.

A la Prof. Dra. Silvia Debenedetti por alentarme continuamente con sus palabras cariñosas y sus consejos oportunos.

A mi colaboradora y amiga Tamara Simonazzi por su afecto y su ayuda incondicional.

A mi esposo **Raúl**, a mis hijos **Silvana** y **Horacio** por su amor, por alentarme y acompañarme.

A mis padres **Yolanda** y **Oscar** por todo lo que me han dado, por los valores que me enseñaron, por el inmenso amor que me prodigaron y por haberme dedicado sus vidas.

A LA MEMORIA DE MI MADRE

ÍNDICE GENERAL

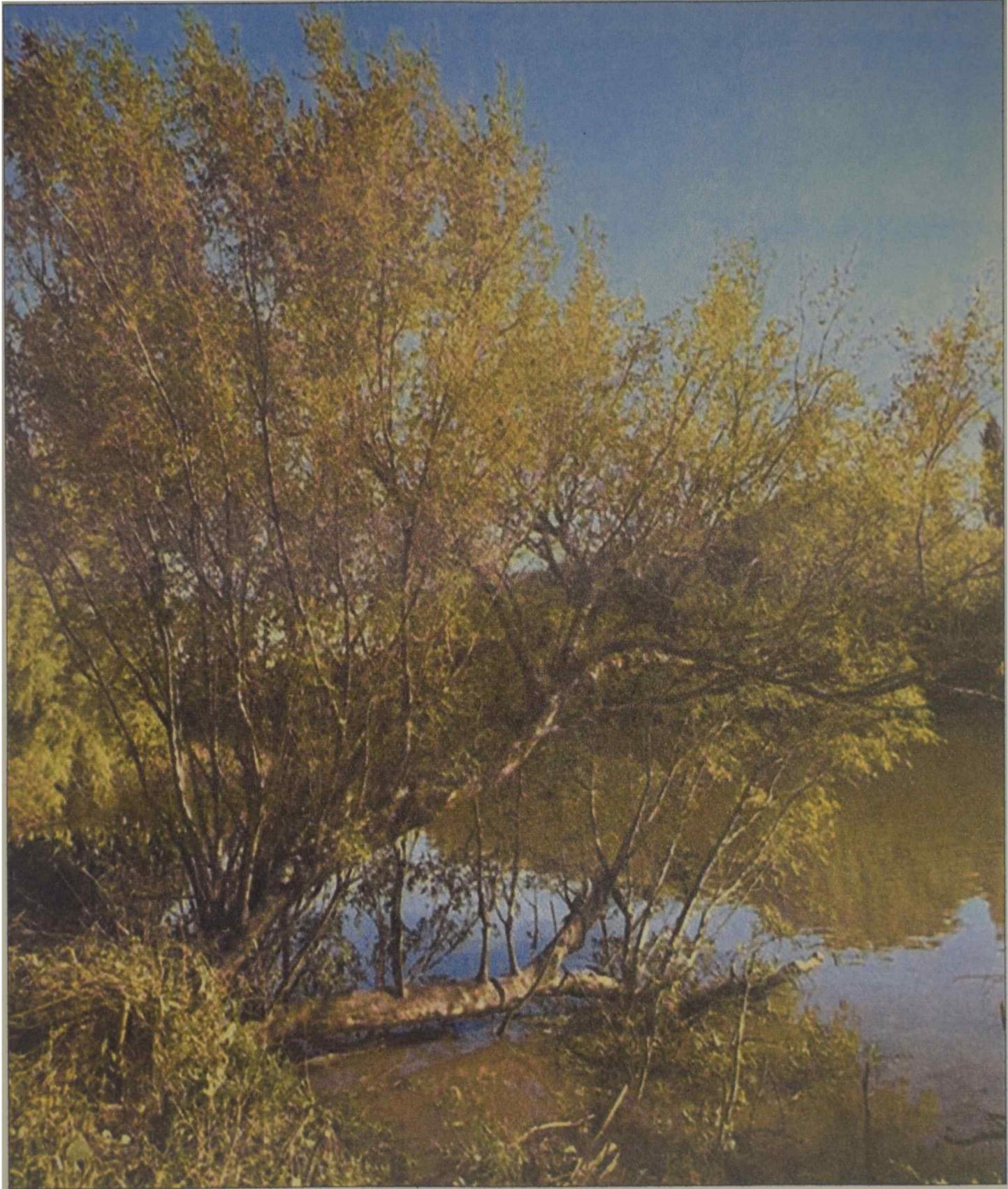
| | |
|--|-----------|
| 1.Consideraciones Generales..... | 1 |
| 1.1.Introducción..... | 3 |
| 1.2.Antecedentes botánicos..... | 11 |
| 1.2.1.Orden Myrtales | 11 |
| 1.2.2.Familia Combretaceae..... | 11 |
| 1.2.3.Género <i>Terminalia</i> | 12 |
| 1.2.4. <i>Terminalia australis</i> | 12 |
| 1.3.Antecedentes antimicrobianos..... | 14 |
| 1.3.1.Familia Combretaceae..... | 14 |
| 1.3.2.Género <i>Terminalia</i> | 17 |
| 1.3.3. <i>Terminalia australis</i> | 21 |
| 2.Objetivos..... | 22 |
| 3.Materiales y Métodos..... | 25 |
| 3.1.Exo-endomorfología de órganos aéreos..... | 26 |
| 3.1.1.Material vegetal..... | 26 |
| 3.1.1.1.Procedencia..... | 26 |
| 3.1.1.2.Procesamiento..... | 27 |
| 3.1.1.2.1.Anatomía de órganos vegetativos y reproductivos..... | 27 |
| 3.1.1.2.1.1.Hoja..... | 28 |
| 3.1.1.2.1.2.Tallo primario, flor, antera, fruto y semilla..... | 29 |
| 3.1.1.2.1.3.Tallo secundario y corteza..... | 30 |
| 3.2.Selección del Material Vegetal..... | 32 |
| 3.2.1.Material vegetal..... | 32 |
| 3.2.1.1.Procedencia | 32 |
| 3.2.1.2.Procesamiento..... | 34 |
| 3.3.Ensayos biológicos | 34 |
| 3.3.1.Material Fúngico..... | 34 |
| 3.3.1.1. Procedencia..... | 34 |
| 3.3.1.2. Ubicación taxonómica de las cepas fúngicas..... | 35 |
| 3.3.1.3. <i>Candida</i> spp. | 35 |
| 3.3.1.3.1.Características de <i>Candida albicans</i> | 36 |
| 3.3.1.3.2.Características de <i>Candida krusei</i> | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.1.4. <i>Aspergillus</i> spp. | 41 |
| 3.3.1.4.1. Características de <i>Aspergillus fumigatus</i> | 42 |
| 3.3.1.4.2. Características de <i>Aspergillus niger</i> | 43 |
| 3.3.1.4.3. Características de <i>Aspergillus flavus</i> | 45 |
| 3.3.1.5. Mantenimiento de las cepas fúngicas..... | 46 |
| 3.3.1.5.1. Cultivos stock..... | 46 |
| 3.3.1.5.2. Cultivos semistock. | 46 |
| 3.3.1.5.3. Cultivos de trabajo diario..... | 48 |
| 3.3.2. Ensayo de susceptibilidad <i>in vitro</i> | 48 |
| 3.3.2.1. Método de difusión en medio sólido..... | 48 |
| 3.3.2.1.1. Preparación de los extractos..... | 49 |
| 3.3.2.1.2. Preparación de las placas..... | 49 |
| 3.3.2.1.3. Preparación de los inóculos..... | 49 |
| 3.3.2.1.4. Siembra..... | 50 |
| 3.3.2.1.5. Metodología..... | 51 |
| 3.3.2.1.6. Controles..... | 51 |
| 3.3.2.1.7. Interpretación de los resultados..... | 52 |
| 3.3.2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)..... | 52 |
| 3.3.2.2.1. Metodología..... | 52 |
| 3.3.2.3. Conservación y controles de calidad de los medios de cultivo..... | 53 |
| 3.3.2.3.1. Medios de cultivo deshidratados..... | 53 |
| 3.3.2.3.2. Medios de cultivo preparados..... | 54 |
| 3.3.3. Enraizamiento de estacas | 54 |
| 3.3.3.1. Procedencia..... | 54 |
| 3.3.3.2. Procesamiento..... | 54 |
| 4. Resultados y Discusión..... | 56 |
| 4.1. Estudio Botánico..... | 58 |
| 4.1.1 Descripción de la especie..... | 58 |
| 4.1.2. Fenología... .. | 63 |
| 4.1.3. Observaciones ecológicas..... | 63 |
| 4.1.4. Herboristería..... | 63 |
| 4.1.5. Especie afín..... | 63 |
| 4.1.6. Distribución geográfica..... | 64 |
| 4.1.7. Exo-endomorfología de órganos aéreos..... | 66 |
| 4.1.7.1. Análisis estructural de la hoja..... | 66 |
| 4.1.7.1.1. Epidermis..... | 66 |
| 4.1.7.1.2. Caracteres anatómicos del corte transversal de hoja..... | 69 |

| | |
|---|----|
| 4.1.7.1.2.1.Lámina..... | 69 |
| 4.1.7.1.2.2.Sistema vascular de la nervadura principal..... | 69 |
| 4.1.7.1.2.3. Pecíolo..... | 69 |
| 4.1.7.1.2.4.Reacciones histoquímicas | 71 |
| 4.1.7.2.Análisis estructural del tallo..... | 71 |
| 4.1.7.2.1.Tallo primario..... | 71 |
| 4.1.7.2.1.1.Epidermis..... | 71 |
| 4.1.7.2.1.2.Tejidos vasculares..... | 71 |
| 4.1.7.2.1.3.Médula..... | 72 |
| 4.1.7.2.1.4.Reacciones histoquímicas..... | 75 |
| 4.1.7.3. Análisis estructural de la flor..... | 75 |
| 4.1.7.3.1.Hipanto..... | 75 |
| 4.1.7.3.2.Disco glandular..... | 76 |
| 4.1.7.3.3.Sépalos..... | 76 |
| 4.1.7.3.4.Gineceo..... | 76 |
| 4.1.7.3.5.Estambres..... | 76 |
| 4.1.7.3.5.1.Filamento..... | 76 |
| 4.1.7.3.5.2.Antera..... | 77 |
| 4.1.7.3.5.3.Polen..... | 77 |
| 4.1.7.3.6.Reacciones histoquímicas..... | 77 |
| 4.1.7.4.Análisis estructural del fruto..... | 80 |
| 4.1.7.4.1.Pericarpio..... | 80 |
| 4.1.7.4.1.1.Epicarpio..... | 80 |
| 4.1.7.4.1.2.Mesocarpio | 80 |
| 4.1.7.4.1.3. Endocarpio..... | 80 |
| 4.1.7.4.2.Pedúnculo..... | 81 |
| 4.1.7.4.3. Reacciones histoquímicas..... | 81 |
| 4.1.7.5.Análisis estructural de la semilla | 84 |
| 4.1.7.5.1.Reacciones histoquímicas..... | 84 |
| 4.1.7.6. Análisis estructural del tallo secundario y corteza..... | 87 |
| 4.1.7.6.1. Corteza..... | 87 |
| 4.1.7.6.2. Leño..... | 87 |
| 4.1.7.6.3.Reacciones histoquímicas..... | 90 |
| 4.2.Ensayos Biológicos..... | 98 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.1. Ensayo de susceptibilidad <i>in vitro</i> | 99 |
| 4.2.1.1. Método de difusión en medio sólido..... | 99 |
| 4.2.1.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). | 109 |
| 4.3. Enraizamiento de estacas..... | 111 |
| 5. Conclusiones..... | 113 |
| 6. Referencias Bibliográficas..... | 126 |

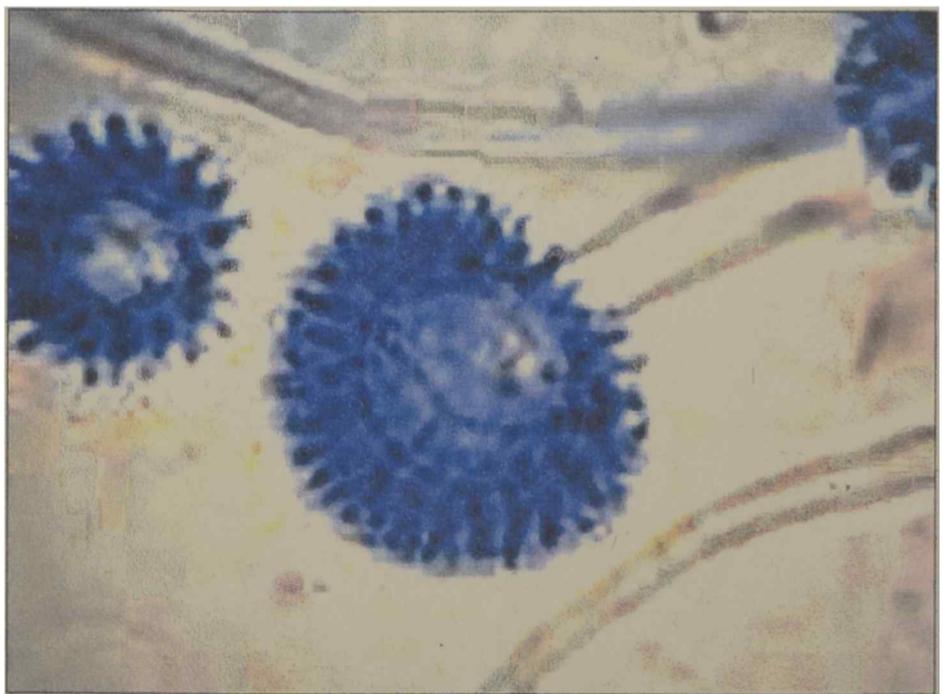
Indice





CONSIDERACIONES

GENERALES



1.1. INTRODUCCION

El empleo de las plantas o parte de ellas con fines terapéuticos es una práctica utilizada por los animales y el propio hombre desde la Prehistoria. De hecho, la mayor parte de los fármacos han estado basados en los principios activos de las plantas (Hieronymus, 1882).

Nuestros antepasados acudieron a ellas probablemente tras observar las costumbres de los animales y decidir imitarlos para aliviar sus dolencias. A partir de la época en que el hombre comenzó a vivir en comunidades, el conocimiento y el manejo de las plantas usadas para determinadas enfermedades pasó a manos de los hechiceros o brujos. En ese entonces se asociaba la presunta actividad curativa de una planta a la similitud de ésta en su aspecto y forma con respecto al órgano sobre el que se pretendía actuar.

Una de las plantas tradicionalmente utilizadas en la antigüedad fue la *Mandragora officinarum* L., Solanaceae (Fig. 1) de notable influencia en Europa durante el medioevo. Antiguos documentos describen a la mandrágora como una planta que "adormece el primer día y vuelve loco el segundo". Los campesinos de aquellos tiempos le tenían terror porque creían que poseía ciertas características humanas. En los textos de magia se habla de ella con verdadero culto, contribuyeron mucho a la celebridad de esta planta los charlatanes que vendían su raíz en altísimos precios gracias a las cualidades que le atribuían y a las que el vulgo daba completo crédito (Brau, 1973).

En suma, el saber popular sobre las propiedades curativas de las plantas forma parte indudablemente de la cultura de los pueblos. A partir de todos estos conocimientos acumulados, la ciencia comenzaría a investigar las virtudes curativas o terapéuticamente aprovechables reales de las plantas, como así también a averiguar su composición química y tratar de aislar sus principios activos. La Fitoterapia es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar o para curar un estado patológico. En el caso de la

búsqueda de plantas con actividad antimicrobiana los investigadores dedicados a ella han indicado como muy llamativo que las numerosas especies que han sido empleadas en la medicina popular para el tratamiento de diversas infecciones microbianas sean aquellas que generalmente no se encuentran infectadas por agentes patógenos (bacterias y hongos), mientras que otras especies en el mismo hábitat se ven atacadas por diversas plagas. Se podría tratar de un verdadero sistema de defensa frente al ataque de microorganismos del ambiente que pululan en el aire, suelo, agua y los transportados por el hombre. Esto sugiere que dentro de algunos vegetales existen principios activos con actividad antimicrobiana que actuarían frente a agentes fitopatógenos y que por lo tanto podrían desarrollar igual acción frente a los infectantes del hombre (Ratera y Ratera, 1980).

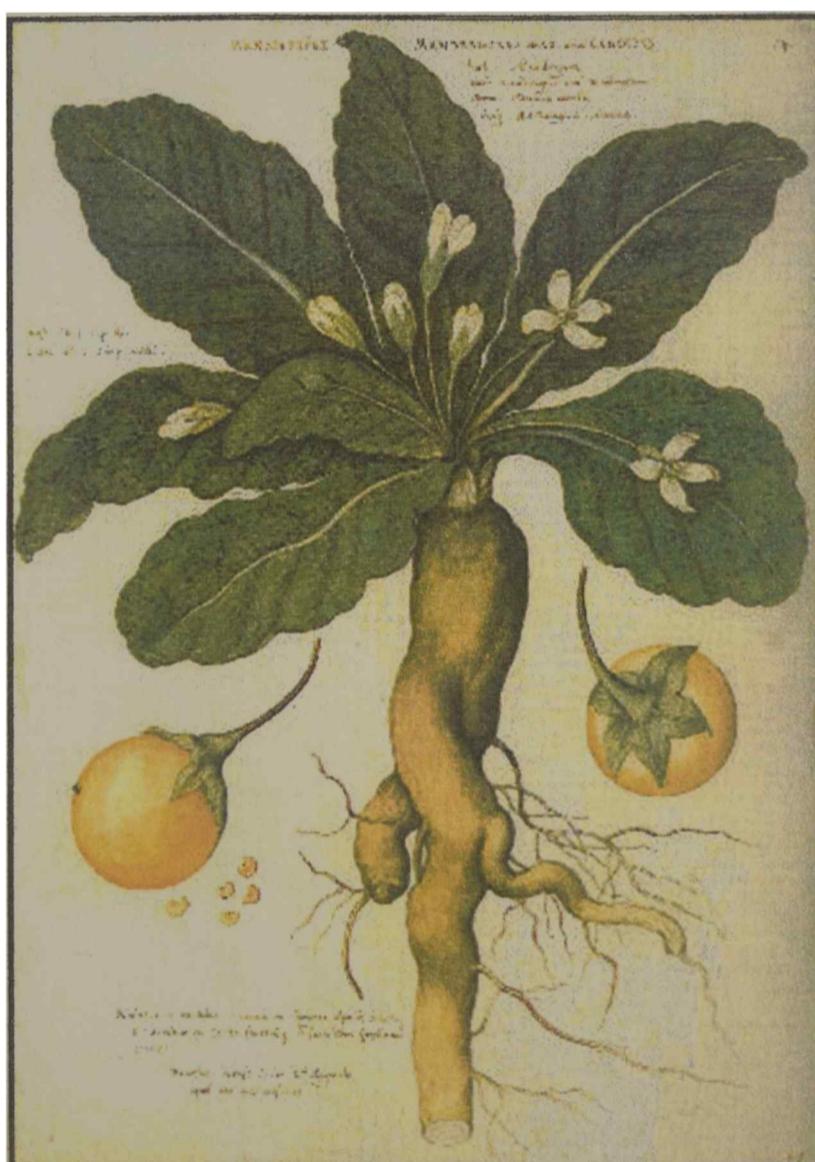


Figura 1. Raíz de *Mandragora officinarum* L..

El aislamiento de principios activos con potencial acción farmacológica ha visto decrecer su auge como consecuencia del progresivo desarrollo de las sustancias sintéticas con actividad antibiótica producida por los laboratorios farmacéuticos. De todos modos, en la mayoría de los casos éstos generalmente parten de los principios activos vegetales a los que han modificado para aumentar su actividad (Mitscher, 1972,a,b,c).

Actualmente, y como consecuencia del mal uso y abuso de los antimicrobianos de síntesis, de sus efectos adversos, de las contraindicaciones e interacciones con otros medicamentos y de los mecanismos de resistencia producidos por los agentes patógenos, se opta cada vez más por una medicina que utiliza los agentes naturales como terapia ..

La población mundial emplea en un alto porcentaje plantas medicinales como una alternativa terapéutica y es así que en nuestros días se ha vuelto con mucho entusiasmo y con interesantes resultados al estudio de la búsqueda de plantas superiores con principios activos que presenten diversas actividades farmacológicas (Alonso, 1998).

El primer trabajo de investigación que se conoce sobre plantas con actividad antibiótica se remonta al año 1890, cuando Roux demuestra que una maceración de semillas de cebada, *Hordeum vulgare* L. (Gramineae) (Fig. 2) inhiben totalmente el crecimiento del *Vibrio cholerae*.



Figura 2. Semillas de *Hordeum vulgare* L..

En 1898 Dombray y Vlaicovitch (citado Vincent,1948) dan a conocer los efectos inhibitorios del bulbo *Allium sativum* L.(Liliaceae) (Fig. 3) sobre las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*, *Salmonella paratiphy* y *Shigella dysenteriae*.



Figura 3. Bulbos de *Allium sativum* L..

Algunos años más tarde Jordanoff (1927) publica su trabajo sobre *Capsicum annum* L. (Solanaceae)(Fig. 4), dando cuenta de su actividad frente a *Salmonella tiphy*.



Figura 4. Frutos de *Capsicum annum* L..

En la misma época Stoll (1928) demuestra la actividad de *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae) (Fig. 5) frente a *Staphylococcus aureus*.



Figura 5. *Chelidonium majus* L..

Todas estas investigaciones han sido coetáneas con los estudios realizados por Alexander Fleming, quien al descubrir la penicilina, sustancia extraída del hongo *Penicillium notatum* con una gran actividad bactericida, cambia la terapéutica empleada hasta ese momento. En septiembre de 1928 Fleming (Fig. 6) descubre la penicilina durante un estudio sobre las mutaciones de colonias de estafilococos al observar que uno de los cultivos había sido accidentalmente contaminado, comprobó que alrededor de la zona inicial de contaminación el desarrollo del *Staphylococcus aureus* se había inhibido, fenómeno que interpretó era el efecto de una sustancia antibacteriana originada por el desarrollo de un hongo (Fleming A.1929). Así, a fines de la segunda guerra mundial comienza la búsqueda incesante de nuevos antibióticos producido por otros organismos con acciones análogas a la penicilina.

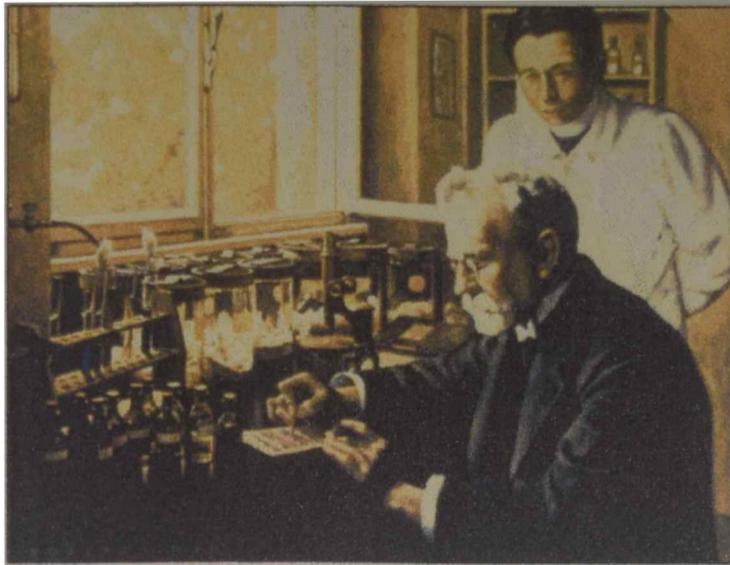


Figura 6. Alexander Fleming en su Laboratorio.

En los años 1944, 1947 y 1949 Hollande, publica sus investigaciones realizadas para un Laboratorio de origen francés descubriendo la primera sustancia con actividad antimicrobiana proveniente de un hongo superior: la Clitocybina, extraída de especies del género *Clitocybe*, eficaz contra el bacilo de la tuberculosis.

En nuestro país el primer trabajo sobre actividad antimicrobiana es el publicado por Cercós (1951), quien estudió la actividad del "vinal", *Prosopis ruscifolia* Griseb. (Leguminosae) (Fig. 7). Esta investigación tuvo su origen en las observaciones efectuadas sobre la acción terapéutica de la infusión de las hojas de este vegetal sobre ciertas enfermedades oculares y la comprobación de que en el manto orgánico de esta Leguminosa crecen pocas especies, suponiéndose que podría deberse a la presencia de sustancias inhibitorias de la germinación de otros vegetales. Se realizó la extracción de los principios activos antimicrobianos partiendo de hojas secas mediante el empleo de distintos solventes orgánicos y soluciones salinas. La actividad del "vinal" demostró poseer sustancias inhibitorias del desarrollo de bacterias Gram (+), Gram (-), ácido alcohólicas resistentes y algunas especies de hongos.



Figura 7. *Prosopis ruscifolia* Griseb..

Posteriormente Cercós y Rodríguez Berreta (1953) analizaron 249 especies argentinas en su mayoría indígena. Utilizaron hojas frescas enfrentándolas a *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, demostrando la acción antibacteriana de varias de ellas. Se destacaron por su gran actividad las especies pertenecientes a las familias Leguminosas y Compuestas.

Gautier y Gerber en 1958 realizaron el estudio de 52 plantas de Córdoba, los extractivos se obtuvieron a partir de las partes aéreas utilizando como solventes ácido sulfúrico diluído (pH 4), solución buffer de pH 9, solución de cloruro de sodio al 0,9% y éter. Las bacterias empleadas para las pruebas fueron *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

En 1977 Escalante y Carpano enfrentaron hojas frescas y extractos acuosos del mismo material pulverizado de 27 especies pertenecientes a 20 familias de plantas superiores, de las cuales 14 mostraron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*. *Terminalia australis* Cambess. (Combretaceae) (Fig.8), resultó ser la especie de mayor actividad, motivo por el cual se la ha seleccionado para la realización del presente estudio.

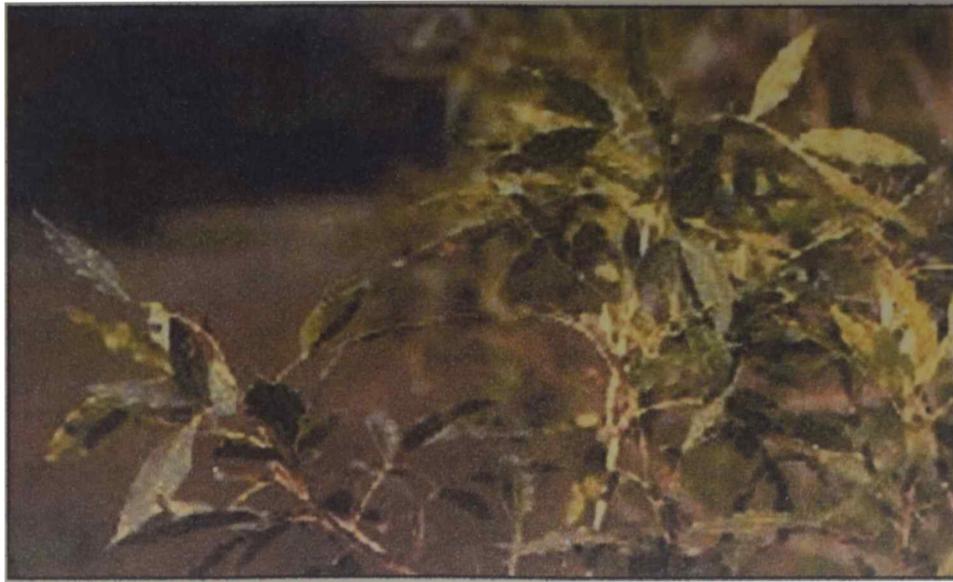


Figura 8. *Terminalia australis* Cambess..

Tanto las candidiasis como las aspergilosis son las micosis más habituales en humanos y animales y son varios los motivos que han promovido este aumento progresivo de las mismas: individuos inmunológicamente deprimidos, abuso en el empleo de los antibacterianos, uso indiscriminado de corticoides, pacientes con neoplasias y trasplantes de órganos, entre otros. (Miller y Murray, 1998).

Las cepas fúngicas actualmente aisladas con mayor frecuencia en diversas lesiones humanas y animales corresponden a *Candida albicans*, *C. Krusei*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* y *A. flavus*, razón por la que estas especies fueron seleccionadas para los ensayos en el presente trabajo.

1.2. ANTECEDENTES BOTÁNICOS

1.2.1. ORDEN MYRTALES Reichenbach

Sinonimia: Combretales Baskerville, Lythrales Caruel, Melastomatales Oliver, Oenotherales Bromhead, Onagrales Reichenbach, Penaeales Lindley, Vochysiales Dumorthier –Myrtanae Takhtajan – Myrtopsida Baring, Oenotheropsida Brongniart.

El orden Myrtales está constituido por 14 familias y más de 9.000 especies, la mayoría de ellas agrupadas en sólo seis familias: Melastomataceae (4.000 spp.), Myrtaceae (3.000 spp.), Onagraceae, Combretaceae, Lythraceae y Thymelaeaceae, que poseen entre 400 y 600 especies cada una. El resto de las familias tienen solamente 60 especies en total y 6 de ellas son monogénicas. Las relaciones taxonómicas dentro del orden Myrtales han sido extensamente estudiadas por Conti et al. (1996, 1998, 1999, 2002) Schönenberger y Conti (2001, 2003, Oliniaceae) y Wilson et al. (2004, Myrtaceae).

1.2.2. FAMILIA COMBRETACEAE R. Brown

Sinonimia: Bucidaceae Sprengel, Myrobalanaceae Martynov, Sheadendraceae G. Bertolini, Terminaliaceae Jaume Saint-Hilaire.

Metcalfe y Chalk (1957) describieron la exo-endomorfología de los órganos vegetativos de las Combretaceae. Posteriormente Stăce (1965) estudió la epidermis foliar y los tricomas de 18 géneros de Combretaceae, entre los cuales investigó 29 especies de *Terminalia* L., aunque no la especie en cuestión, y puntualizó su importancia diagnóstica a nivel genérico y específico.

Los caracteres carpológicos han sido considerados de valor diagnóstico a nivel genérico (Exell, 1954) y específico y específico (Griffiths, 1959; Guaglianone; 1998, 1999a, 1999b). La anatomía de los frutos de las Combretaceae no ha sido

prácticamente estudiada, excepto los de *Quisqualis indica* L. y *Quisqualis madagascariensis* Boj.. Se describen a los estambres de esta familia como obdiplostémono (Maheu y Weitz, 1935). Las semillas a nivel de la familia fueron caracterizadas por Niembro Rocas (1989) y la estructura de las cubiertas seminales por Corner.(1976).

Las características del leño de las Combretaceae fue descrito sucesivamente por Record (1936), Metcalfe y Chalk (1957), Rao (1972), Van Vliet (1979), y Alfonso y Richter (1991).

Las puntuaciones ornadas de la familia constituyen un ejemplo clásico, mencionado por distintos autores, entre ellos Record (1936), y fueron estudiadas con microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (MEB) por Van Vliet (1978).

1.2.3. GÉNERO *TERMINALIA* Cambess

Han sido descritas 150 especies del género *Terminalia*, que están distribuidas geográficamente en los cinco continentes.

Chattaway (1955) estudió con MO la ocurrencia de cristales leñosos en 1.000 géneros de 160 familias. En relación a *Terminalia* cita 12 especies que presentan drusas en células abultadas (idioblastos) y 4 con cristales elongados, todas en el parénquima axial. Posteriormente Chattaway (1956) y Corner (1976) hacen descripciones del género *Terminalia* y de 4 especies, ilustrando *T. arjuna* W. et Arn. y *T. parviflora* Thw., cuyo nombre válido según Philcox (1995) es *T. zeylanica* van Heurck et Muell. Más recientemente Werker (1997) presenta una descripción muy breve y esquemática de las cubiertas de *T. parviflora* Thw.

1.2.4. *TERMINALIA AUSTRALIS* Cambess.

Devoto y Rothkugel (1942) establecieron el diámetro máximo observado y la altura máxima de *Terminalia australis* y consideraron que es una especie

poco abundante. Esta especie ha sido descrita en varios trabajos florísticos de Argentina (Exell, 1939; Cabrera y Dawson, 1944; Fabris, 1965; Leonardis, 1976; Lahitte y Hurrell, 1997 b; Guaglianone, 1998, 1999 a , b), Brasil (Exell y Reitz, 1967) y Uruguay (Lombardo, 1964; Muñoz *et al.*, 1993).

Tortorelli (1956) realizó un estudio macroscópico y microscópico de la madera de *T. australis*. Por su parte Tuset y Durán (1970), en un estudio macroscópico de las maderas comerciales de Uruguay, describieron brevemente la madera de la citada especie y la separaron, por medio de una clave, del resto de las coníferas y latifoliadas estudiadas.

Los granos de polen han sido descritos con MO por Barth y Silva (1965) y por Markgraf y D'Antoni (1978). Más recientemente Klucking (1991) determina el patrón de nerviación de las hojas de la especie.

1.3. ANTECEDENTES ANTIMICROBIANOS

1.3.1. FAMILIA COMBRETACEAE

En el año 1995 Bassene *et al.* comunican los resultados obtenidos al estudiar la actividad antimicrobiana de tres especies de Combretaceae: *Terminalia avicennioides* (Fig. 9), *Combretum mincranthum* y *Guiera senegalensis* (Fig. 10), las cuales son empleadas en la medicina tradicional del sur de Senegal para el tratamiento de la diarrea infantil, bronquitis y enfermedades venéreas. Se trabajó con raíces y frutos, obteniendo extractos acuosos por maceración y decocción (como son empleadas popularmente) que se ensayaron frente a diferentes especies bacterianas (*Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) y también frente a *Candida albicans*. Todos los extractos presentaron actividad antimicrobiana.

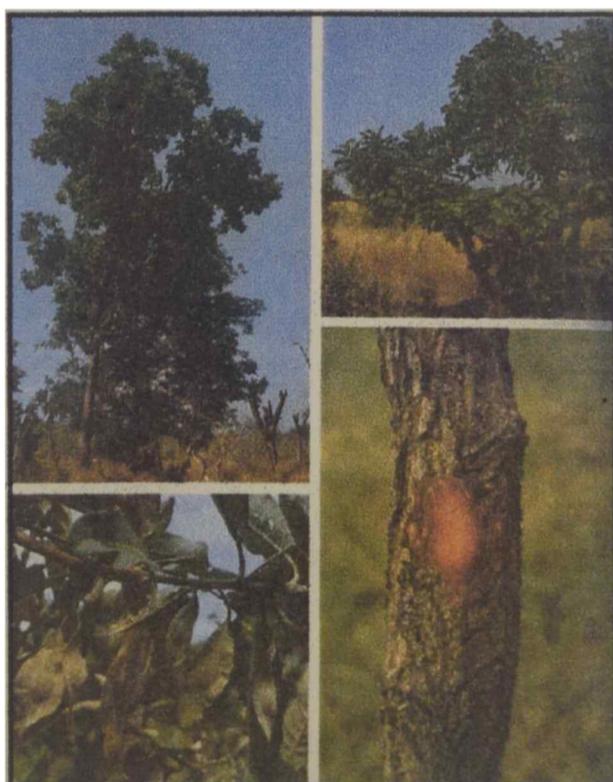


Figura 9. *Terminalia avicennioides* Gil..



Figura 10. *Guiera senegalensis* J.F. Gmel..

Dos años más tarde Martini *et al.* (1998) comprueban la actividad inhibitoria de hojas de *Combretum erithrophyllum* frente *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Más recientemente Elegami *et al* (2002) publican un trabajo sobre la actividad de 48 extractos obtenidos a partir de cuatro especies pertenecientes a la familia Combretaceae, que mostraron actividad inhibitoria sobre el desarrollo de microorganismos de colección y de otros aislados de lesiones humanas (bacterias y hongos); dado que las especies estudiadas son muy ricas en taninos, los autores atribuyen a estos compuestos las propiedades antimicrobianas. Simultáneamente Masika *et al.* (2002) determinaron que los extractos de *Combretum caffrum* Eckl. Zehy (Fig. 11) poseen importante actividad frente a bacterias Gram (+) y a algunas especies de hongos.



Figura 11. *Combretum caffrum* Eckl. Zehy.

En el año 2005 en Sudáfrica Bessong *et al.* ensayaron la actividad de extractos metanólicos y acuosos de nueve plantas medicinales originarias de esa región, demostrando las propiedades inhibitorias de los mismos frente a virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, destacándose dentro de dichos extractos el realizado a partir de la raíz de *Combretum molle* R. Br. (Fig.12), que exhibió importante actividad inhibitoria. Finalmente Batawila *et al.* (2005) demuestran la actividad antifúngica de cinco especies de Combretaceae, en un ensayo realizado frente a 20 hongos patógenos (10 levaduras y 10 hongos filamentosos). Los extractos hidroalcohólicos fueron los que demostraron mayor actividad, confirmando el uso tradicional de las plantas en la medicina popular.



Figura 12. *Combretum molle* R. Br.

1.3.2. GÉNERO *TERMINALIA*

El primer trabajo sobre actividad antimicrobiana de especies del género data de 1950, cuando Bushnell *et al.* Informan acerca de la actividad antibacteriana de plantas de Hawaii, entre ellas *Terminalia catappa* L. (Fig.13).

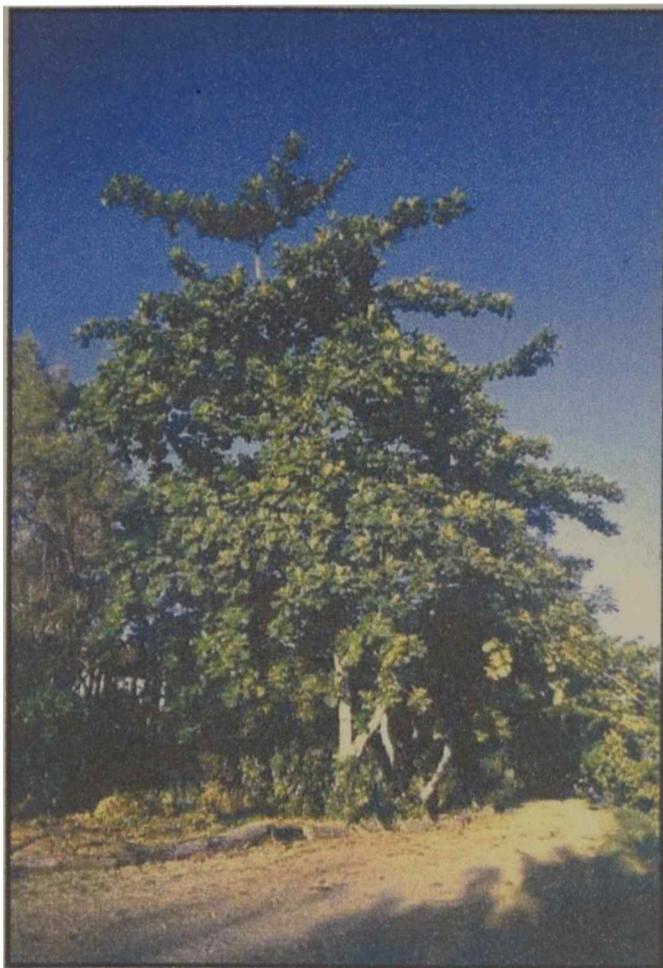


Figura 13. *Terminalia catappa* L.

Muchos años más tarde Taylor *et al.* (1996) realizaron un screening de plantas medicinales de Nepal utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas, demostrando que *Terminalia alata* posee gran actividad frente a casos de diarreas producidas por *Shigella dysenteriae*. Por su parte la raíz de *Terminalia macroptera* (Fig. 14) es empleada popularmente en Guinea y en el este de Africa para el tratamiento de distintas infecciones; su actividad fue investigada por Silva

et al. (1997) y demostró poseer actividad inhibitoria en el desarrollo de cultivos de *Candida albicans*, presentando también actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* y *Vibrio cholerae*. Posteriormente Silva *et al* (2002) demostraron la actividad bactericida de las hojas de *Terminalia macroptera* Gill. et Perr. frente a *Neisseria gonorrhoeae*, siendo el extracto de éter etílico el que mayor actividad presentó, aunque todas las fracciones demostraron en mayor o menor grado poseer acción inhibitoria en el crecimiento de este microorganismo.



Figura 14. *Terminalia macroptera* Gill. et Perr.

El mismo año Khan *et al.* (2002) estudiaron la actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas, raíces y tallos de *Terminalia complanata* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Shiguella disenteriae*.

Arora *et al.* (2003), estudiando algunas plantas medicinales de la India, citan seis con actividad frente a varias especies de *Salmonella*, entre las que se encuentran dos especies del género: *Terminalia bellerica* (Gaertn.) Roxb. Bellerik (Fig. 15) y *T. chebula* Retz. (Fig. 16).

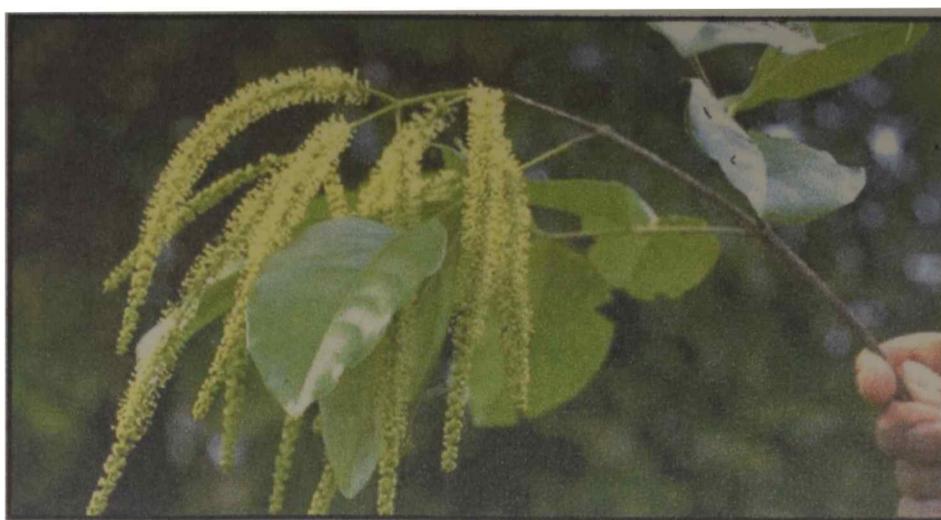


Figura 15. *Terminalia bellerica* (Gaertn.) Roxb. Bellerik



Figura 16. *Terminalia chebula* Retz

En nuestro país Martino *et al.* (2004) trabajaron con extractos acuosos

de hojas de *Terminalia triflora* (Fig. 17), encontrando que posee compuestos que inhiben el desarrollo del HIV.

Muy recientemente se han estudiado la actividad inhibitoria de *Terminalia sericea* Burch. ex DC (Fig. 18), especie empleada para el tratamiento de infecciones bacterianas, demostrándose que los extractos intermedios y polares de las raíces de esta planta exhibieron actividad frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis* y *Pseudomonas aeruginosa*; estos extractos también presentaron actividad inhibitoria frente a *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. (Moshi et al., 2005).



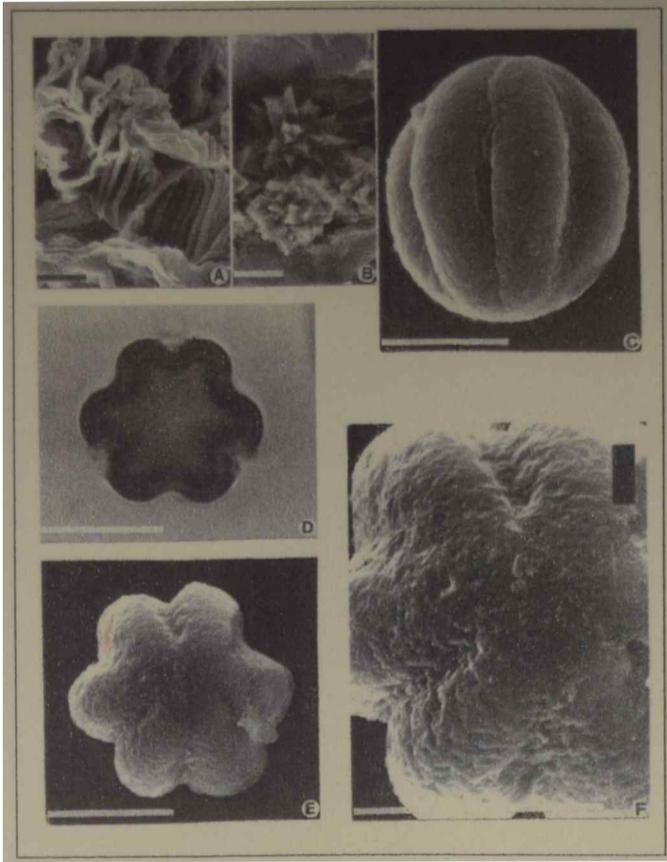
Figura 17. *Terminalia triflora* (Griseb.) Lillo



Figura 18. *Terminalia sericea* Burch. ex DC

1.3.3. TERMINALIA AUSTRALIS Cambess.

Hace ya algunos años, investigaciones preliminares efectuadas con extractivos acuosos de hojas frescas de *Terminalia australis* Cambess (Fig. 8) permitieron comprobar la actividad antibacteriana de esta especie frente a cultivos de *Staphylococcus aureus* (Escalante y Carpano, 1977). Más recientemente Carpano et al. (2004) comprobaron la actividad antifúngica de extractos acuosos y metanólicos de los órganos aéreos frente a cepas de *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Candida albicans* y *C. krusei*.



OBJETIVOS



- **Describir la exo-endomorfología de los órganos aéreos y establecer los parámetros micrográficos de *Terminalia australis* Cambess.**

El estudio de los órganos aéreos de esta especie tiene como finalidad precisar sus caracteres exo- y exoendomorfológicos los que junto a la determinación de sus parámetros micrográficos aportarán los elementos diagnósticos que permitan su precisa identificación. Esta información permitiría elaborar una monografía de la especie, con miras a su eventual inclusión en la Farmacopea Argentina.

- **Realizar ensayos que permitan determinar la posible actividad antifúngica de los extractos de la especie en estudio.**

Los extractos acuoso, metanólico y diclorometánico de órganos aéreos de *Terminalia australis* serán utilizados para la realización de antifungigramas, con el propósito de determinar la existencia de actividad antifúngica.

- **Determinar la concentración mínima inhibitoria.**

En aquellos extractos que demuestren poseer actividad antifúngica se determinará la concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/ml}$) y se compararán los valores obtenidos con los correspondientes a antifúngicos de referencia, establecidos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

- **Determinar el período de mayor capacidad antifúngica de la especie en estudio.**

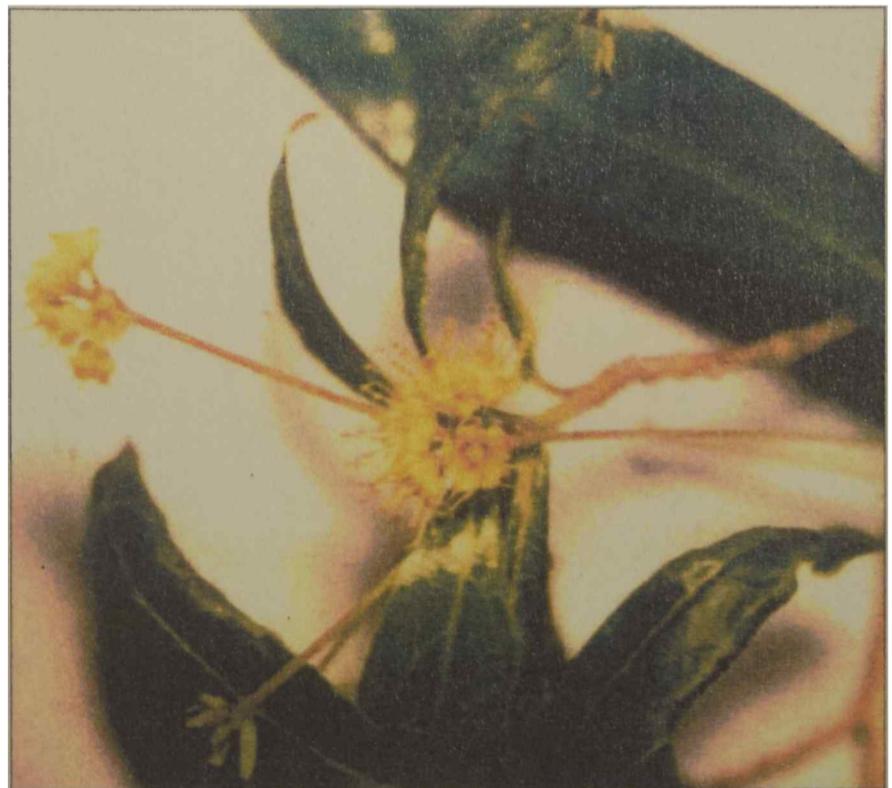
La realización de antifungigramas con los extractos obtenidos a partir de material vegetal recolectado en forma sistemática (utilizando el mismo ejemplar para la obtención de extractos durante 24 meses consecutivos) permitirá realizar un seguimiento de la actividad antifúngica durante los ciclos vegetativo y reproductivo. De esta manera se podría establecer el período óptimo de recolección del vegetal para obtener un mayor rendimiento de las sustancias responsables de dicha actividad.

- **Mejorar la propagación de la especie.**

Los ensayos de enraizamiento de estacas permitirán demostrar si es posible mejorar la propagación de la especie, con la expectativa de solucionar el grave inconveniente de la escasa disponibilidad de ejemplares de la misma en nuestra zona.



MATERIALES Y MÉTODOS



3.1. EXO-ENDOMORFOLOGÍA DE ÓRGANOS AÉREOS

3.1.1. MATERIAL VEGETAL

3.1.1.1. *Procedencia*

Se analizaron materiales frescos y secos. Los primeros fueron colectados en Punta Lara (Partido de Ensenada, Provincia de Buenos Aires, República Argentina), Arroyo Cuñapirú (Ruiz de Montoya, Provincia de Misiones, República Argentina) y Playa Ferrando (Real de San Carlos, Departamento de Colonia, República del Uruguay). Las correspondientes muestras herborizadas han sido incorporadas al Herbario del Museo de Botánica y Farmacognosia "Carlos Spegazzini" de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata (LPE).

Las exsiccatas provienen de los siguientes Herbarios: LP (Herbario del Museo de La Plata), LPA (Herbario de la Facultad de Agronomía, UNLP), MBM (Museo Botánico Municipal de Curitiba, Brasil), SI (Instituto Darwinion, San Isidro, Argentina) y UPCB (Herbario del Departamento de Botánica de la Universidad Federal de Paraná, Brasil).

ARGENTINA. Provincia de Buenos Aires: Partido de Ensenada: Punta Lara, Freire 11/3/79 (LPA), Reserva Natural de Punta Lara, camino a Villa Elisa a 50 m del camino costanero, Carpano 993 (LPE); Parador "El Tío", Carpano 1027 (LPE); a 70 m del arroyo Boca Cerrada, Carpano 1026 (LPE); entrada a la Reserva, Carpano 1025 (LPE); junto al galpón, Carpano 1030 (LPE). Partido La Plata: Arboretum Fac. Agronomía, Fabris 1882 (LP). Partido San Isidro: San Isidro, Parque Instituto Darwinion, N.M. Bacigalupo s/nro. (SI17462). Isla Martín García, J. Hurrell *et al.* 1118, 1327, 3855 (LP), Gamero 1003 (LP). Prov. Corrientes: Departamento. San Martín: cruce Ruta Nacional 129 sobre el arroyo Guavirarí, O. Boelcke, N. N. Correa, N. Bacigalupo, et S.C., M.N. Correa 5347 (SI) La Cruz, A. Burkart 7871 hoja a (SI) Departamento Santo Tomé

Krapovickas *et al.* 21083 (LP). Prov. Entre Ríos: Departamento Concepción del Uruguay: Concepción del Uruguay, Balneario Municipal Itape, N.M. Tur, R. Guaglianone *et C.N.* Skorupka 1908 (SI). Departamento Concordia: A. L. Cabrera *et Sagastegui* 19304 (LP); N. Berti *et Escalante* 272 (LP). Isla Cambacua, A.L. Cabrera 12330 (LP). Delta, Brazo largo A.C. Scala s/nro. (LP38366). Provincia Misiones: Departamento Cainguas: Reserva privada de la UNLP "Valle del Arroyo Cuñapirú", a la orilla del Arroyo Cuñapirú, Castro 231 (LPE), 20/3/01. Departamento Candelaria: Santa Ana, Rodríguez 602 hoja a (SI); Departamento Concepción, A. L. Cabrera *et al.* 28679 (SI). Departamento San Ignacio: Salto Tabay, O. Boelcke, N. Correa *et al.* 5382 hojas a y b (SI). Departamento Montecarlo: Puerto Piray, S. A. Renvoize 3193 (MBM). Departamento San Pedro: Río Pitay-Guazú, O. Boelcke *et al.* 5487 (SI).

BRASIL. Estado Paraná: Municipio Curitiba: Localidad Encas, G. Hatschbach 35171 (LP). Municipio Foz do Iguaçu: Itaipú, J. A. Cordoni s/nro. (UPCB 21954). Municipio Três Barras do Paraná: Rio Guaraní, S.M. Silva s/nro. (UPCB 20681), I. Isernhagen *et M.* Borgo 123 (UPCB). Municipio Vizinhos: Foz do Chopim, G. Hatschbach 20575 (LP, SI, UPCB 7993). Estado Santa Catarina: Municipio Itapiranga: 3-4 km oeste de Itapiranga, L. B. Smith *et Klein* 13169 (LP). Municipio Riqueza: Rio Iracema, L. B. Smith *et Klein* 13117 (LP, SI). Municipio São Miguel d'Oeste: Peperi, L. B. Smith *et Klein* 13246 (SI).

PARAGUAY. Departamento Itapúa: Alto Paraná, Encarnación, T. Rojas 10824 (SI). (SI).

URUGUAY. Departamento Colonia: Colonia del Sacramento, camino costanero al Real de San Carlos, Carpano 1023 (LPE); Real de San Carlos, frente al Camping Municipal, Carpano 1024 (LPE); Riachuelo, A.L. Cabrera 3905 (LP); Playa Ferrando, Carpano 1029 (LPE). Departamento Río Negro: Localidad San Javier G. Herter 11/27, ex-herb 82822 (SI).

3.1.1.2. Procesamiento

3.1.1.2.1. Anatomía de órganos vegetativos y reproductivos

Los estudios anatómicos fueron realizados tanto en material fresco como en material seco.

3.1.1.2.1.1. Hoja

Para las observaciones anatómicas de la epidermis foliar con Microscopio óptico (MO) se procedió a su diafanización y a la eliminación de la cutícula aplicando la técnica descrita por Carpano *et al.* (1994), que permitió visualizar las células y obtener el valor numérico proporcional correspondiente al **Índice de Estomas** (Salisbury, 1927) y el **Índice de Empalizada** (Zornig y Weiss, 1925).

Hojas pequeñas o trozos de 0,5 cm de lado se introdujeron en un vaso de precipitado con alcohol de 90° durante 15 minutos en un baño a 70°C y al cabo de ese tiempo se agregó igual cantidad de hidróxido de potasio al 10% y se mantuvo a baño María durante otros 15 minutos; el material vegetal se lavó con agua corriente hasta la eliminación del álcali y luego se trató con hipoclorito de sodio al 40% a baño María durante 20 minutos o durante 15 horas a temperatura ambiente, agitando periódicamente; finalmente se lavó con agua corriente hasta eliminación del hipoclorito de sodio. El material vegetal así tratado se mantuvo indistintamente en ácido láctico al 1%, en líquido conservador (alcohol-glicerina-formol c.s.p.) o en hidrato de cloral.

Los cortes transversos de hojas se practicaron con micrótopo de Ranvier a partir de material fresco fijado en alcohol absoluto-ácido acético glacial (3:1) o seco e hidratado en caliente. Una parte del mismo se diafanizó con hidróxido de sodio al 10% y otra se coloreó con safranina-fast green. Los cortes se montaron en Bálsamo sintético Biopur, pasando a formar parte de la colección de cada especie.

Se practicaron reacciones histoquímicas de diagnóstico para evidenciar oxalato de calcio (ácido clorhídrico), taninos (cloruro férrico o iodato de potasio), alcaloides (Dragendorff), lignina (floroglucina y ácido clorhídrico) y lípidos (Sudan III).

Las observaciones se realizaron utilizando un microscopio óptico Olympus CH y los diseños originales se realizaron con el mismo, equipado con tubo

de dibujo Iroscope.

La simbología utilizada es la de Metcalfe & Chalk (1957). Las fotomicrografías se tomaron usando un microscopio Leitz y cámara Leica-Wild MP 532 con película color Kodak Gold, 100 ASA.

Para la observación de la epidermis foliar (con y sin cutícula) se empleó un microscopio electrónico de barrido (MEB). Para ello las hojas se hidrataron a temperatura ambiente durante 60 horas, luego se lavaron con agua destilada clorada y se fijaron en FAA (alcohol etílico 96°-agua destilada-formol-ácido acético glacial) durante 48 horas. Finalmente, utilizando un microscopio estereoscópico se seccionó una pequeña pieza de material, se secó entre papel de filtro y se montó sobre una platina de aluminio cubierta de cinta adhesiva, terminando el secado con una luz puntiforme. Las observaciones y fotomicrografías se efectuaron con un MEB Jeol JSM-T100 del Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del Museo de La Plata.

3.1.1.2.1.2. Tallo Primario, flor, antera, fruto y semilla

Se obtuvieron cortes (transversales, longitudinales radiales y tangenciales según correspondiere) de tallo primario, flor, fruto y semilla y maceraciones con hidróxido de sodio al 10 % y mezcla de Jeffrey (ácido nítrico al 10 %-ácido crómico al 10 %) de tallo primario y fruto, practicándose reacciones histoquímicas de diagnóstico para evidenciar oxalato de calcio (ácido clorhídrico), taninos (cloruro férrico, iodato de potasio), alcaloides (Dragendorff), aleurona (xilol, ácido pícrico), almidón (Lugol), lípidos (Sudán III) y lignina (floroglucina clorhídrica).

Para la observación de tallo primario, antera, fruto y semilla con MEB el material fresco se lavó con agua destilada clorada y se fijó en FAA durante 48 horas.

Los granos de polen, sin acetolizar, fueron lavados con alcohol absoluto. Posteriormente los materiales se montaron y secaron sobre una platina de aluminio. Las observaciones y fotomicrografías se efectuaron con un MEB Jeol JSM-T100 del Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del Museo de La Plata. La observación con MO se realizó en granos acetolizados según

Erdtman (1969), montados en glicerina-gelatina y sellados con parafina. Se hicieron preparados de granos de polen no procesados químicamente, empleando la técnica de Wodehouse (1935), para compararlos con los acetolizados. La forma se definió de acuerdo a la relación diámetro polar y diámetro ecuatorial (D_p/D_e), (Erdtman 1952) y en la medida de los poros se indica primero el eje polar y luego el ecuatorial. La terminología palinológica empleada se ajusta a Punt *et al.* (1994). Todos los valores obtenidos de cada parámetro se expresaron en rangos, promedio, moda (Mo) y desviación estándar (s).

Las observaciones se efectuaron con microscopio estereoscópico Iroscope YZ-6 y un MO Olympus CH y los diseños originales se realizaron con el mismo, equipado con tubo de dibujo Iroscope. La simbología utilizada en los diseños es la de Metcalfe & Chalk (1957).

3.1.1.2.1.3. Tallo secundario y corteza

Se estudió material de corteza y leño obtenido en forma de rodaja de 11 cm de diámetro a 65 cm de altura del suelo y también se obtuvo una muestra de corteza de un tronco de 28 cm de diámetro a 120 cm de altura del suelo.

Se obtuvieron cortes transversales y longitudinales de corteza con un micrótopo de mano Ranvier, que luego fueron decolorados con hipoclorito de sodio al 50 %, teñidos con safranina al 1% en alcohol 50°, deshidratados y montados en bálsamo sintético.

Los tacos del leño fueron hervidos en agua-detergente hasta su ablandamiento. Para la observación con MO se efectuaron cortes transversales y longitudinales (radiales y tangenciales) de 27 μm de espesor, con el xilótomo Jung Ag Heidelberg 15980 de la Cátedra de Dendrología de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. Los cortes fueron decolorados con hipoclorito de sodio al 50 %, lavados con agua, luego coloreados con safranina al 1 % en alcohol 50°, deshidratados y montados en bálsamo sintético. Las maceraciones de leño se hicieron con mezcla de Jeffrey.

Se practicaron reacciones histoquímicas de diagnóstico para evidenciar

oxalato de calcio (ácido clorhídrico), taninos (cloruro férrico, iodato de potasio), alcaloides (Dragendorff), almidón (Lugol), lignina (floroglucina clorhídrica), resinas (solución saturada de acetato de cobre) y gomas (ferricianuro potásico, ácido nítrico-ácido acético, ácido clorhídrico, alcohol etílico-metílico).

Los tests de quemado de astillas, Froth y fluorescencia son los aceptados por el Comité Internacional de Anatomistas de la madera (IAWA, 1989).

Las observaciones se efectuaron con microscopio estereoscópico Iroscope YZ-6 y un microscopio óptico Olympus CH y los diseños originales se realizaron con el mismo, equipado con tubo de dibujo Iroscope. Las fotomicrografías se tomaron usando un MO Iroscope y cámara Zenit con película color Kodak Gold, 100 ASA y un MO Nikon Labophot-2 y cámara Nikon HFX con película blanco y negro Ilford, 400 ASA.

Para la observación con MEB, la corteza fue fijada en FAA y el corte fue secado bajo una luz puntiforme y montado sobre una platina de aluminio. En cuanto al leño, los cortes y astillas de madera se deshidrataron en series crecientes de alcohol etílico y se adhirieron con goma adhesiva sobre una platina de aluminio. Las observaciones y fotomicrografías se efectuaron con un MEB Jeol JSM-T100 del Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del Museo de La Plata.

La terminología empleada para describir macroscópicamente la corteza es la de Junikka (1994), para caracterizar textura, grano y diseño se siguió el trabajo de Castiglioni (1958) y para definir microscópicamente el leño se adoptó el criterio del Comité Internacional de Anatomistas de la madera, IAWA (1989). Los colores de la corteza y el leño fueron determinados de acuerdo al atlas de colores de Villalobos y Villalobos (1947).

Los valores de altura de los radios floemáticos y xilemáticos, longitud de las fibras floemáticas y xilemáticas, espesor de la pared de las fibras xilemáticas, longitud de los elementos de vaso, diámetro tangencial de los vasos sin la pared, vasos/mm² e índice de agrupamiento de vasos se expresaron en rangos, promedio, moda (Mo) y desviación estándar (s). Las maceraciones de leño y meso-endocarpio del fruto se hicieron con mezcla de Jeffrey.

Las observaciones se efectuaron con un microscopio estereoscópico Iroscope YZ-6 y un MO Olympus CH y los diseños originales se realizaron con el mismo, equipado con tubo de dibujo Iroscope. Las fotomicrografías se tomaron usando un MO Leitz y cámara Leica Wild MP5 52 con película color Kodak Gold, 100 ASA y película blanco y negro Plus X Pan, Kodak, 100 ASA. La simbología utilizada en los diseños es la de Metcalfe e Chalk (1957).

3.2. SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

3.2.1. MATERIAL VEGETAL

3.2.1.1. *Procedencia*

En la selección se tuvo en cuenta que el individuo fuese adulto y se encontrase en buen estado fitosanitario.

Ubicación: Argentina, Provincia de Buenos Aires, Ensenada, Punta Lara, Reserva Natural, (camino a Villa Elisa a 50 m del camino costanero). Altura aproximada del Ejemplar 8 m; perímetro del tronco 75,0 cm. Las muestras mensuales de este Ejemplar se encuentran depositadas en LPE, bajo el N° 993.

Se recolectó material para herborizar e incorporar al Herbario de Botánica y Farmacognosia "Carlos Spegazzini" (LPE) .Se efectuaron observaciones *in situ*. En la Tabla 1 se consignan la fecha y el tipo de material recolectado para la realización de los ensayos biológicos.

| Fecha | Material |
|-----------------------|--|
| 28/11/98 | hojas, tallos primarios y secundarios |
| 31/12/98 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza, escasas flores y frutos inmaduros |
| 28/1/99 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza y frutos inmaduros. |
| 24/2/99 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza y frutos inmaduros |
| 28/3/99 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza y frutos inmaduros |
| 28/4/99 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza, frutos inmaduros y frutos maduros |
| 30/5/99 | escasas hojas amarillentas, tallos primarios y secundarios, corteza y frutos (la mayoría del suelo). |
| 10/7/99 | tallos primarios con yemas, corteza y frutos (la mayoría en el suelo) |
| 30/7/99 | tallos primarios, secundarios, yemas y corteza; se recolectaron estacas para las pruebas de enraizamiento en el Centro de Propagación Vegetativa (CEPROVE). |
| 29/8/99 | tallos primarios y secundarios con yemas y corteza |
| 30/9/99 | tallos primarios y secundarios con yemas (algunas yemas abiertas) y corteza |
| 30/10/99 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza y flores, la mayoría en estado de botón |
| 28/11/99 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza y flores abiertas |
| 15/11/99- 21/12/99 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza, flores abiertas y frutos inmaduros |
| 31/1/00 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza y frutos inmaduros |
| 29/2/00 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza y frutos inmaduros |
| 26/3/00 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza y frutos maduros (gran cantidad en el suelo) Colección de frutos para ensayos de geminación |
| 12/4/00 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza y frutos maduros (gran cantidad en el suelo) |
| 29/4/00 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza |
| 28/5/00 | algunas hojas verdes caídas, otras rojizo-amarillentas, tallos primarios y secundarios, corteza |
| 28/6/00 | muy escasas hojas amarillentas, tallos primarios y secundarios con yemas y corteza |
| 30/7/00 | tallos primarios y secundarios con yemas y corteza |
| 30/8/00 | tallos primarios y secundarios con yemas y corteza; se recolectaron estacas para el CEPROVE y se obtuvo 1 rodaja para estudio de corteza y leño |
| 30/9/00 | tallos primarios y secundarios y corteza |
| 26/10/00 | primeras hojas, tallos primarios y secundarios, escasas flores en botones florales |
| 26/11/00 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza y floración plena; fijación flores 3:1 e inflorescencias en líquido conservador |
| 23/12/00 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza, flores y frutos inmaduros |
| 31/1/01 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza, flores y frutos inmaduros (varios frutos caídos en el suelo probablemente debido a las tormentas); se recolectaron frutos del suelo |
| 28/2/01 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza, escasas flores y frutos inmaduros, frutos con semillas en desarrollo desde el punto de vista anatómico; gran cantidad de frutos en el suelo con la semilla consumida, mayor cantidad que el 2/00 (Fig. 3 C). |
| 30/3/01 | hojas, tallos primarios y secundarios, corteza, todos los frutos en el suelo (probablemente debido a la semana lluviosa del 20-24/3/01) consumidos; frutos con semillas maduras desde el punto de vista anatómico |

Tabla 1. Fecha y tipo de material recolectado para la realización de los ensayos biológicos.

3.2.1.2. *Procesamiento*

Las partes aéreas de *Terminalia australis* fueron desecadas en estufa con convección forzada de aire a 45°C por 24 horas y molidas a polvo grueso en un molino de cuchillas Arthur Thomas.

El material pulverizado (300g) fue extraído en frío con diclorometano (48 horas, 2 X 800 ml) con agitación frecuente. Se filtró por Büchner, al vacío, entre cada extracción y el marco fue lavado repetidas veces con el solvente de extracción. Los extractos fueron reunidos y llevados a seco a presión reducida y rotulados como Ext-DCM. El material vegetal extraído con diclorometano se dejó secar a temperatura ambiente antes de cambiar de menstruo. La operación se repitió utilizando metanol como solvente de extracción (48 horas, 3 X 1000 ml). Los extractos fueron reunidos y llevados a seco a presión reducida y rotulados como Ext-MeOH.

Los extractos acuosos obtenidos en caliente (infusiones) se realizaron según método Farmacopea Argentina VII edición, se dejaron reposar, se filtraron y se liofilizaron. Se rotularon como Ext-H₂O.

3.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS

3.3.1. MATERIAL FÚNGICO

3.3.1.1. *Procedencia*

Se emplearon los siguientes hongos provenientes del Instituto de Micología Carlos Spegazzini, La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina (LPS): *Candida albicans*(Robin) Berkhou 639 (LPS), *Candida krusei* Castellani 589 (LPS), *Aspergillus niger* Van Tieghem 51(LPS), *Aspergillus fumigatus* Fries 170 (LPS) y *Aspergillus flavus* Link 4 (LPS).

Las cepas empleadas corresponden a hongos levaduriformes (*Candida spp.*) y miceliares (*Aspergillus spp.*) que no presentan resistencia a los

antimicóticos, utilizados como controles recomendados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), en sus documentos M27-A2 (2002 a), M38-A (2002 b) y M38-P (1998) .

3.3.1.2. *Ubicación taxonómica de las cepas fúngicas*

REINO FUNGI

PHYLLUM *Ascomycota*

SUBPHYLLUM *Ascomycotina*

CLASE *Ascomycetes*

ORDEN *Saccharomycetales*

FAMILIA *Saccharomycetaceae*

GÉNERO *Candida*

ESPECIES *C. albicans*
C. krusei

ORDEN Eurotiales

FAMILIA *Aspergillaceae*

GÉNERO *Aspergillus*

ESPECIES *A. fumigatus*
A. niger
A. flavus

3.3.1.3. *Candida spp.*

Se trata de un género heterogéneo que comprende mas de 150 especies. Las células en yema (blastoconidios) son redondas, ovaladas u oblongas, de 2,5 por 3 a 14 μm , solas o en racimos o cadenas y Gram (+), con pseudohifas ausentes, rudimentarias o bien desarrolladas. La producción de tubos germinativos y de clamidosporos son útiles para diferenciar especies.

El crecimiento es aeróbico. Diminutas colonias en Agar Glucosado Sabouraud (AGS) pueden ser visibles entre 24 y 36 horas y alcanzar un tamaño de 1,5 a 2 mm en 5 a 7 días. Las colonias son generalmente de color blanco, pero pueden tomar color crema o bronce con la edad, son glabras, algunas veces cremosas o membranosas y pueden tener una franja de hifas

sumergidas. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 37 °C. La habilidad de las levaduras de crecer a 37°C es una característica importante a ser considerada en su identificación a partir de muestras clínicas. Las levaduras más virulentas crecen rápidamente a temperaturas que oscilan entre 25 °C y 37 °C, mientras que las poco virulentas dejan de crecer a 37 °C (Dignani, 2003). En el citoplasma pueden observarse gránulos de glucógeno y vacuolas que en algunas ocasiones contienen cuerpos lipídicos y gránulos de polifosfato. Los hidratos de carbono se utilizan en forma oxidativa o fermentativa o de ambas formas, lo cual es útil para diferenciar las especies. Son generalmente ureasa negativas, salvo en muy escasas ocasiones (Linares & Solís, 2001).

3.3.1.3.1. Características de *Candida albicans*

Candida albicans suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas (Fig.19); sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levaduras que permanecen unidas entre sí.

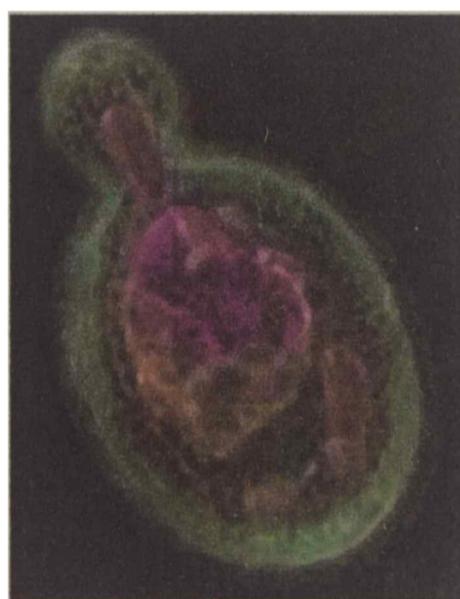


Figura 19. *Candida albicans* (MEB).

Al microscopio óptico *C. albicans* presenta dimorfismo, el cual es descrito como una transformación de la forma ovoide de las blastosporas gemantes a hifas. Por su parte Samson (1990) sostiene que desde el punto de vista microscópico el material blanco que crece en los medios de cultivo consiste en pseudomicelios (actualmente llamados filamentos de *C. albicans*). Se presentan bajo condiciones de cultivos semianaeróbicos o facultativos y están formados por células elongadas que se mantienen unidas entre sí como una cadena y blastoconidias o blastosporas que están agrupadas a lo largo del pseudomicelio, en los sitios en que los extremos finales de las células pseudomiceliales se empalman con otras (Fig. 20).

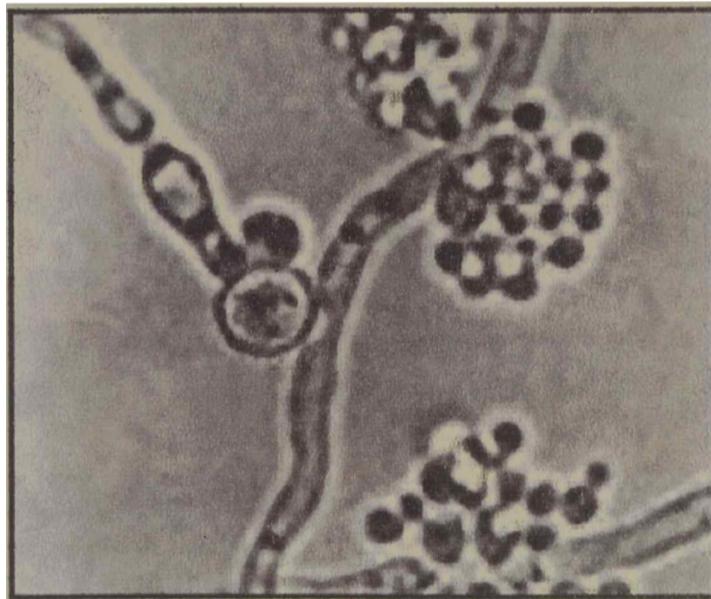


Figura 20. Clamidosporas, blastoconidias y pseudomicelios (MO)

En contraste con otras especies del género, *C. albicans* tiene una marcada tendencia a formar esporas grandes, de pared gruesa, denominadas clamidosporas, sobre todo cuando se cultivan en un medio especial como agar- harina de maíz, donde las clamidosporas alcanzan un diámetro de 7-8 micras, lo que constituye una importante característica morfológica en la identificación de la especie. Asimismo, tiene la capacidad para producir

tubos germinales (filamentación en suero) cuando las colonias son inoculadas en 0,5 ml de suero a temperatura de 37 °C, observándose los resultados después de 2 a 3 horas.

La composición química de *C. albicans* está representada por 20-40% de proteínas y 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono.

La membrana citoplasmática es una estructura que reviste gran importancia, ya que los antimicóticos actúan a nivel de la misma. Además de contener las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular, presenta una doble capa compuesta por fosfolípidos y posee invaginaciones que se observan como surcos de 200 a 300 nanómetros de longitud, por 35 a 40 nanómetros de espesor, además de los fosfolípidos, la membrana citoplasmática está compuesta por grandes cantidades de proteínas y carbohidratos. Las colonias en AGS son de tamaño mediano, de color cremoso, lisas y pastosas (Fig. 21).



Figura 21. Colonia en AGS.

3.3.1.3.2. Características de *Candida krusei*

Las colonias de *C. krusei* en AGS se diferencian de varias especies del mismo género pues son típicamente secas y a menudo tienen pseudomicelio, presentan una coloración crema y su forma es a menudo lenticular, produciendo una película de crecimiento superficial prominente (Fig. 22).



Figura 22. Colonia en AGS.

Sobre agar-harina de maíz (AHM) y a 25°C después de 72 horas produce blastosporas que típicamente se alargan y tienen un aspecto parecido a un árbol con pseudohifas que se bifurcan (Larone, 1995)(Fig. 23).



Figura 23. Pseudohifas y blastosporas en AHM (MO)

Las pseudohifas presentan la característica de tener en la base del comienzo de la gemación una mínima contracción (Fig. 24).

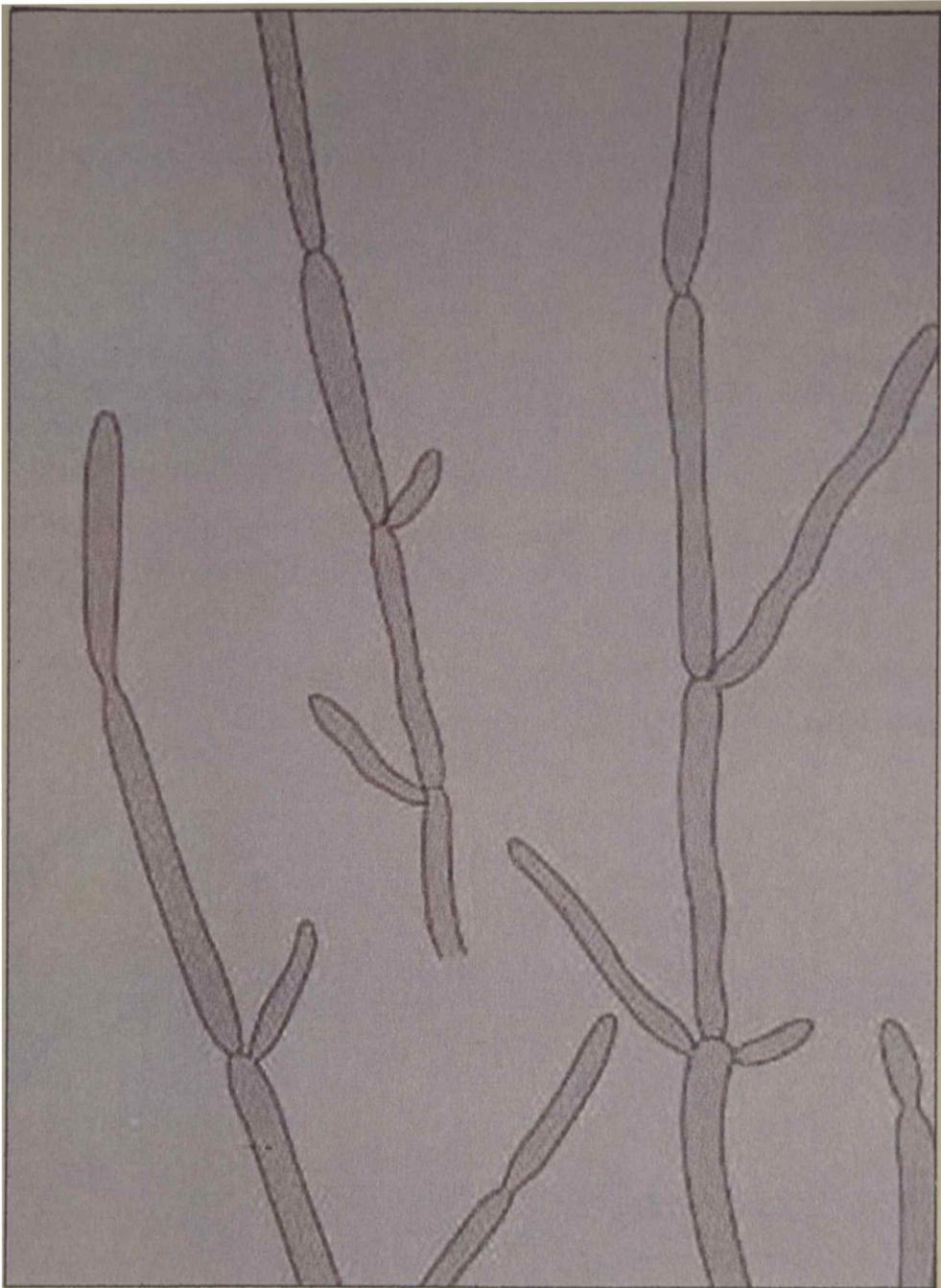


Figura 24. Contracción típica (MO).

Las blastosporas poseen una forma ovoide a redondeada (Sutton *et al.*, 1998),(Fig. 25).

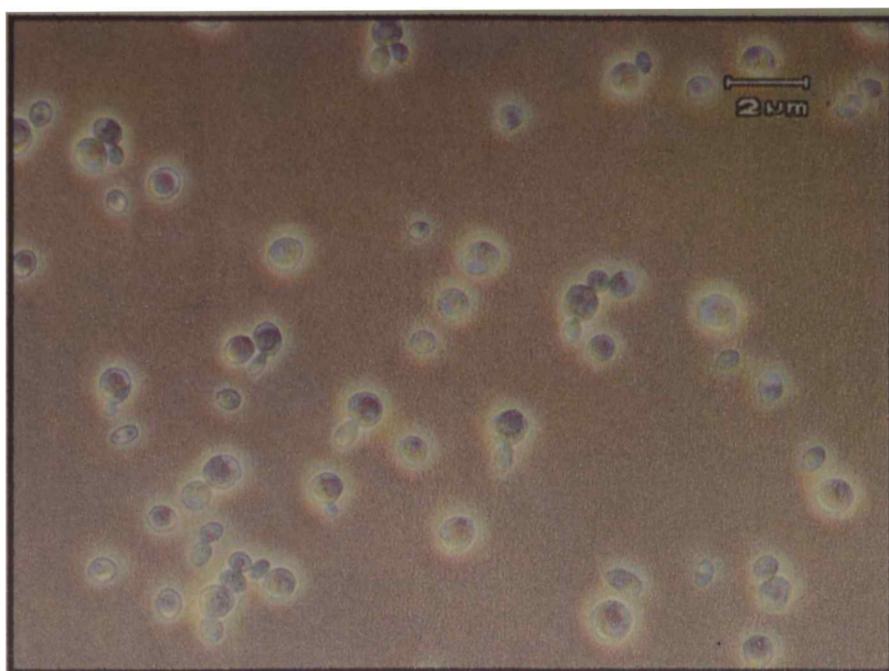


Figura 25. Blastosporas ovoides brotantes (MO).

3.3.1.4. *Aspergillus* spp.

La mayoría de las especies de este género forman colonias con colores vivos debido a la profusa producción de esporas pigmentadas de color azul, verde o amarillo, aunque también las hay de color blanco y negro. Las especies de *Aspergillus* se caracterizan por poseer cadenas de conidias pequeñas, ovals u esféricas sostenidas en cadenas en las puntas de fiálides radialmente ubicadas sobre la superficie del ápice dilatado del conidióforo, denominado vesícula, elementos visibles al microscopio óptico. Algunas especies pueden reproducirse sexualmente en los medios de cultivo y producir cleistotecios. Éstos contienen ascos que contienen a su vez ascosporas, cuya morfología también pueden usarse como elemento de identificación de las especies. Se han descrito cientos de especies, en base a las características de las fases asexuadas como la pigmentación de las colonias por las conidias, tamaño y longitud de los conidióforos, forma de las vesículas, presencia de métulas, posición de las fiálides, tamaño y longitud de las cadenas de las esporas, etc. (Fig. 26).

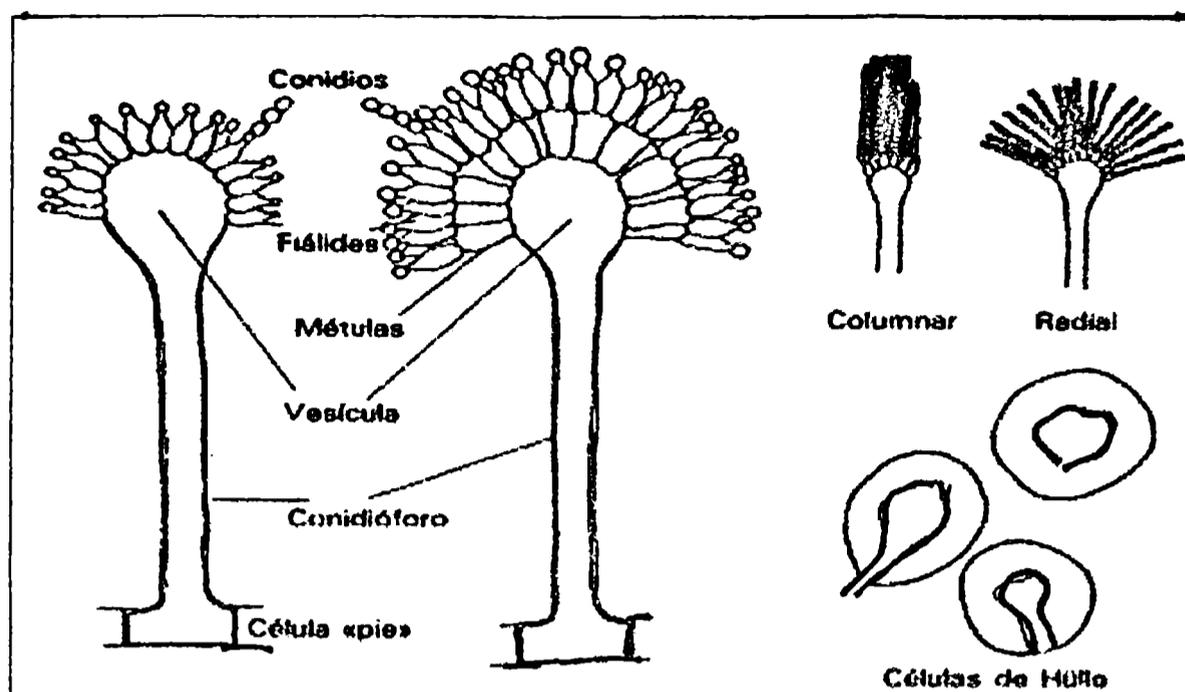


Figura 26: Elementos microscópicos típicos de la fase asexual.

3.3.1.4.1. Características de *Aspergillus fumigatus*

Al microscopio óptico las hifas son hialinas y tabicadas. La longitud de los conidióforos es moderada y tienen una célula de pie característica en la base. Las vesículas tienen forma de cúpula y la mitad a dos tercios de la superficie está cubierta por una hilera de fiálides, desde las cuales salen largas cadenas de conidias globulosas, equinuladas, de 2-3 μm de diámetro, con tendencia a mantenerse en manojos paralelos hacia el centro (Fig. 27). Los cultivos pueden tolerar temperaturas de hasta 45 °C (Domsch *et al.*, 1980; Pitt & Hocking, 1985).

Esta especie crece en 2–6 días en medios sin cicloheximida. La colonia crece con un borde evidente, es vellosa y blanca durante el crecimiento precoz, pero luego se hace aterciopelada o granulosa y de color azul-verde a gris-verde por la producción de conidios pigmentados. El reverso de la colonia tiene color blanco a crema. Microscópicamente las hifas son hialinas

y tabicadas. (Fig.28).

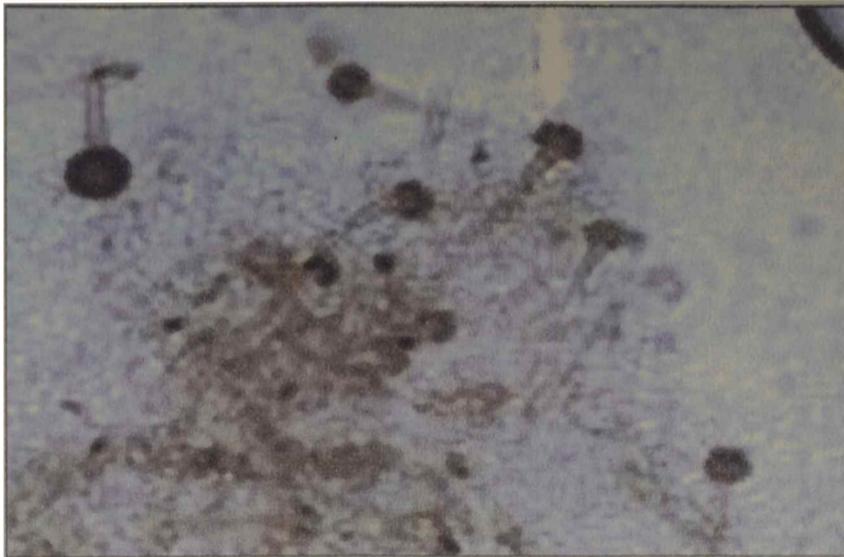


Figura 27. Fase asexuada de *Aspergillus fumigatus* (MO)

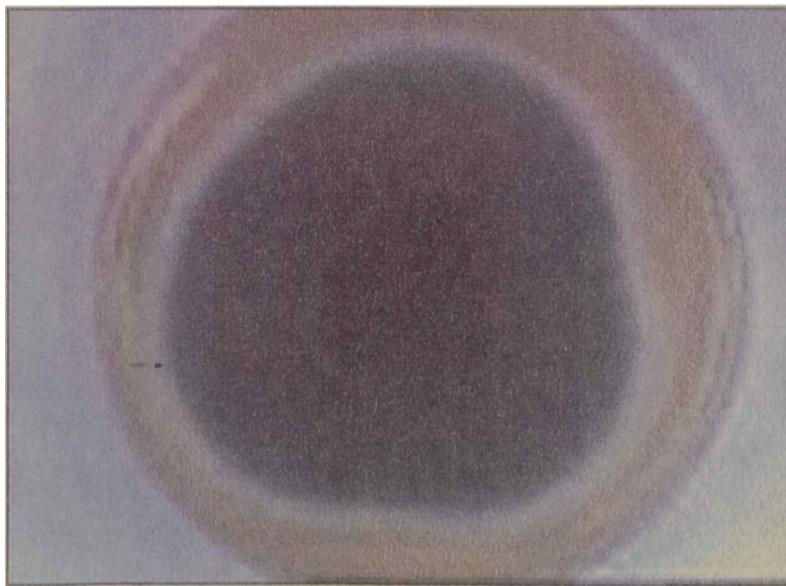


Figura 28. Colonia típica en AGS

3.3.1.4.2. Características de *Aspergillus niger*

Las hifas son tabicadas y los conidióforos son largos y lisos, la vesícula es esférica y da origen a grandes métulas y fiálides más pequeñas que oscurecen la superficie de la vesícula (Fig. 29).

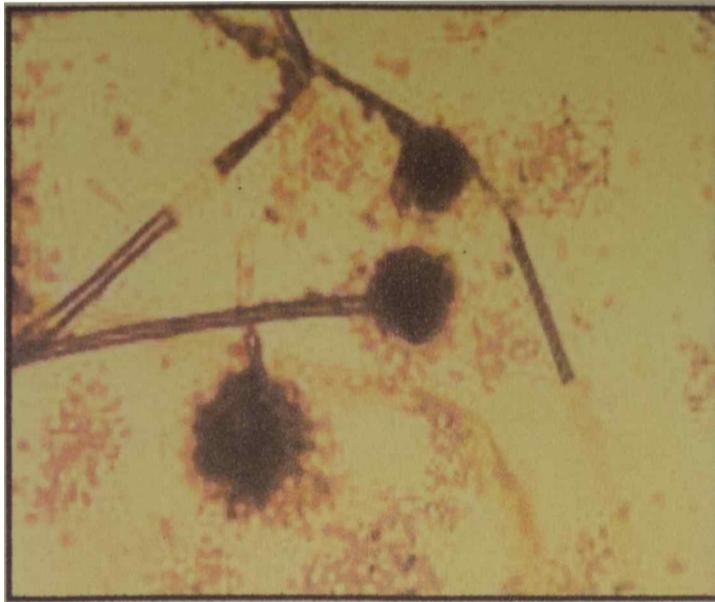


Figura 29: Fase asexual de *Aspergillus niger* (MO).

Esta especie comienza como una colonia blanca que puede volverse amarilla, pero rápidamente desarrolla pigmentación negra sobre la superficie a medida que se producen las conidias, que con el tiempo pueden hacerse tan densas como para producir una mata negra. El reverso de la colonia queda de color gamuza o crema (Fig. 30).

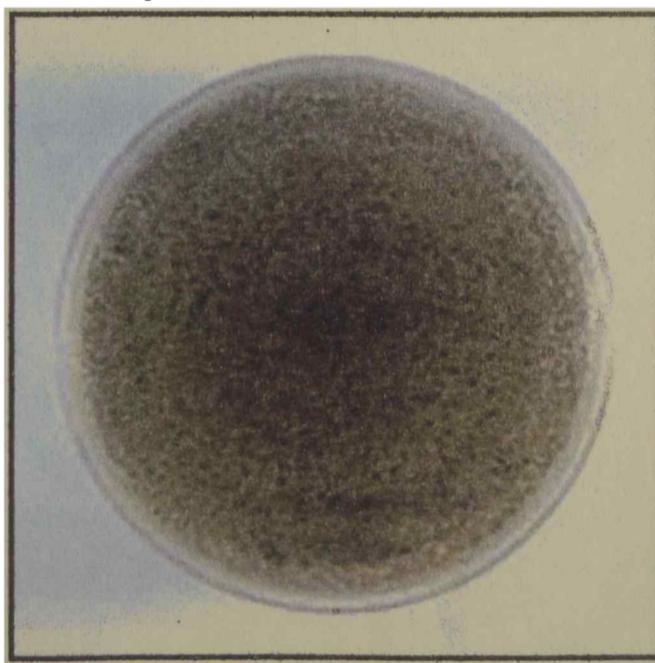


Figura 30: Colonia de *Aspergillus niger* en AGS.

3.3.1.4.3. Características de *Aspergillus flavus*

Las vesículas miden de 20 a 60 μm , son globulosas y la esporulación ocurre en toda la superficie. Las fiálides se originan en la vesícula (uniseriado) o en una hilera primaria de métulas que dan origen a fiálides en la vesícula (biseriado). Las fiálides a su vez dan origen a cortas cadenas o masas globulosas de conidias elípticas a esféricas, de 3-5 μm de diámetro y de color amarillo o amarillo-anaranjado que se tornan equinulados con el tiempo (Christensenn, 1981; Klich & Pitt, 1985); (Fig.31).

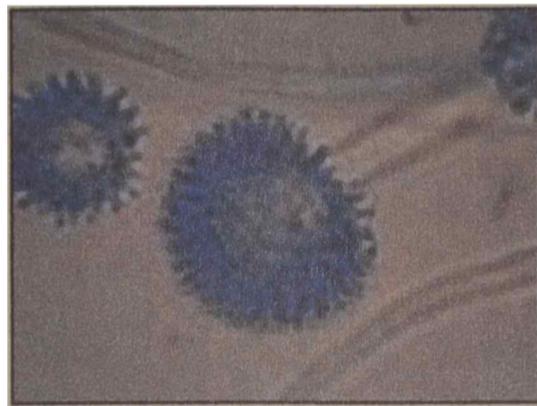


Figura 31: Fase asexual de *Aspergillus flavus* (MO).

Las colonias crecen rápidamente en 5 días a 25 °C y tienen un micelio aéreo algodonoso y bien desarrollado que presenta cierta tonalidad de amarillo, marrón o verde-amarillo (Fig. 32).

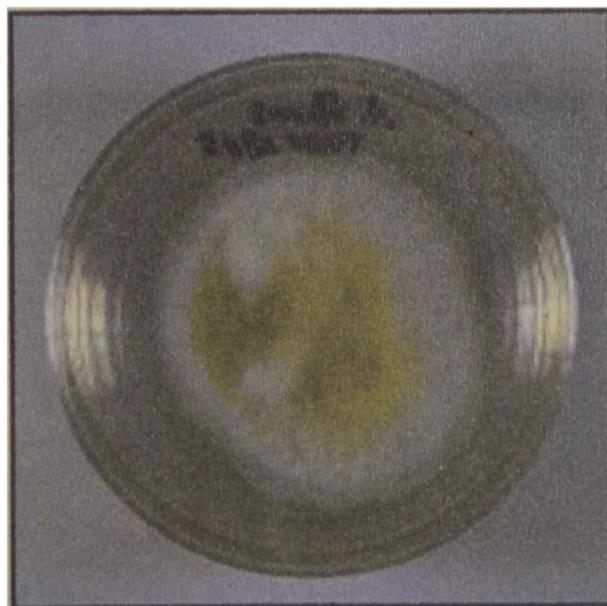


Figura 32. Colonia de *Aspergillus flavus* (MO).

3.3.1.5. Mantenimiento de las cepas fúngicas

Se trabaja con un programa metódico de repiques de cepas, archivo de cada uno de los cultivos con sus características microscópicas, culturales, pruebas bioquímicas y fechas de repiques. Los métodos de mantenimiento que se emplean se pueden dividir en tres categorías: cultivos stock, cultivos semistock y cultivos de trabajo diario.

3.3.1.5.1. Cultivos stock

Representan el verdadero "banco de cultivos". Se mantienen en un sistema cerrado de conservación y el método aplicado es la liofilización. Se realiza una suspensión concentrada de un cultivo puro y joven del hongo a conservar en leche de vaca desnatada deshidratada que se obtiene en el comercio, la que se usa en una concentración del 10% en agua destilada. El método de esterilización es por tindalización (vapor fluente durante 30 minutos en 3 días consecutivos) o en autoclave (con una presión de 10 libras durante 10 minutos). La suspensión se coloca en tubos con tapa a rosca y se siguen las instrucciones del liofilizador utilizado (Koneman, 1995).

3.3.1.5.2. Cultivos semistock.

En el caso de las levaduras se mantienen cultivos por un período intermedio entre el relativamente permanente del cultivo en stock y el cultivo de cepas para el trabajo diario. Se emplea el congelamiento en congelador convencional (-10 a -25°C). Los cultivos se preparan haciendo una suspensión concentrada de la colonia pura en caldo glucosado de Sabouraud

Caldo glucosado de Sabouraud deshidratado (Britania) pH final: 5.6 ± 0.2

| Fórmula (en gramos por litro) | | Instrucciones(Britania) |
|-------------------------------|------|---|
| Pluripeptona | 10.0 | Suspender 65 g del polvo deshidratado por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver. Distribuir y esterilizar 15 minutos a 118-121° en autoclave. Dejar enfriar. Agregar el Cloranfenicol antes de la solidificación del medio homogeneizar. Mantener en lugar fresco, Distribuir en tubos con cierre hermético o placas. |
| Glucosa | 40.0 | |
| Cloranfenicol | 0.05 | |
| | | |

Para los hongos filamentosos esporulados se utiliza un cultivo joven y bien esporulado en agar glucosado de Sabouraud deshidratado (Britania) inclinado cubierto con aceite mineral estéril.

Agar glucosado de Sabouraud deshidratado (Britania) pH final: 5.6 ± 0.2

| Fórmula (en gramos por litro) | | Instrucciones(Britania) |
|-------------------------------|------|---|
| Pluripeptona | 10.0 | Suspender 65 g del polvo deshidratado por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver. Distribuir y esterilizar 15 minutos a 118-121°C. Dejar enfriar. Agregar el Cloranfenicol antes de la solidificación del medio. Homogeneizar. Mantener en lugar fresco. Distribuir en placas o en tubos con cierre hermético. |
| Glucosa | 40.0 | |
| Cloranfenicol | 0.05 | |
| Agar | 15.0 | |

Se deja enfriar a temperatura ambiente, se colocan en tubos de ensayo dejando solidificar en forma inclinada y se siembra con ansa a partir de un cultivo joven y bien esporulado. Se cubre completamente con aceite mineral estéril. El aceite se esteriliza a 15 libras de presión por 45 minutos en autoclave.

3.3.1.5.3. Cultivos de trabajo diario

Los cultivos para el trabajo diario son mantenidos en tubos con AGS (Britania). Los cultivos se incuban a temperatura ambiente (20-22°C) hasta que haya crecimiento en las levaduras y desarrollo y esporulación en los hongos filamentosos para luego ser colocados en refrigerador (4° C) hasta el momento de su empleo. Los cultivos de trabajo deben ser repicados cada 2 meses. Pasado este tiempo se prepara otro cultivo de trabajo a partir de la cepa en stock.

3.3.2. ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO*

3.3.2.1. *Método de difusión en medio sólido para levaduras y hongos filamentosos productores de conidias.*

Se adoptaron los Documentos M27A , M38- y M38P, del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) .

La actividad antifúngica fue determinada utilizando pruebas de difusión en medio sólido sobre cultivos estandarizados de hongos representativos.

Los extractos fueron enfrentados a los hongos, impregnando discos de papel de filtro hasta una carga total de 200 a 250 µg por disco. Previamente secados a 50-60° C, los discos fueron depositados en placas de Petri conteniendo cultivos de los hongos en una concentración de aproximadamente

10^5 unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/ml) en medios de agar glucosado Sabouraud (*cf.* 3.3.1.5.2.).

3.3.2.1.1. Preparación de los extractos

Los residuos secos de los extractivos con diclorometano y metanol fueron redisueltos en DMSO (dimetilsulfóxido) y los acuosos (liofilizados) en agua destilada estéril. Los extractos fueron diluídos con agua destilada estéril hasta una concentración de 50 g/l y luego con solución de cloruro de sodio al 0,85% estéril hasta 5g/l.

3.3.2.1.2. Preparación de las placas

Se colocaron 25 a 30 ml del medio esterilizado, fundido y enfriado a 50-55°C en placas estériles de vidrio, de modo de obtener una capa de 4 mm de alto, y se secaron incubándolas a 35-37°C en estufa de secado durante 30-60 minutos en forma invertida y con la tapa entreabierta.

3.3.2.1.3. Preparación de los inóculos

Las colonias de las especies de *Candida* fueron repicadas a partir de cultivos mantenidos en tubos con AGS inclinado en refrigerador (cultivos de uso diario) en caldo glucosado Sabouraud (*cf.* 3.3.1.5.2.) y se incubaron a temperatura ambiente (20-22 °C) durante 24 hs.. Se suspendieron las colonias en solución de cloruro de sodio al 0,85 % estéril, se transfirieron a tubo de ensayo estéril y se igualó la turbidez a la del testigo 0,5 de la escala de Mc Farland (0,5 ml de cloruro de bario 0,048 M y 9,5 ml de ácido sulfúrico 0,36 N), similar a la producida por una suspensión de 10^5 UFC/ml.

Se verificó usando un espectrofotómetro con un haz de luz de 1 cm y la cubeta

correspondiente a la absorción de la muestra, que fue de 0,08 – 0,10 a 625 nm para el estándar 0,5 de Mc Farland.

Las especies de *Aspergillus* fueron repicadas a partir de cultivos mantenidos en tubos con AGS inclinado en refrigerador (cultivos de uso diario) a agar glucosado de papa (PDA); se incubaron 7 días a 35 °C, (Carrillo, 1995).

Agar glucosado de papa (PDA), pH final: $5,6 \pm 0,2$

Componentes (en gramos por litro) :

| | |
|-------------------|------|
| Papa picada cruda | 100g |
| Glucosa | 20g |
| Agar | 20g |

Preparación. Se hierve durante 30 minutos la papa picada cruda con 1 litro de agua, se filtra por gasa y algodón, se repone el agua evaporada, se agrega la glucosa y el agar y se esteriliza en autoclave. Se deja enfriar a 50 – 55 °C y se distribuye en placas de Petri o tubos de ensayo.

Para la recolección de las conidias se introdujo el asa de cultivo en Tween 20 y se pasó por encima del medio de cultivo, se resuspendió en solución de cloruro de sodio al 0,85% estéril. Se dejaron sedimentar las partículas durante 3-5 segundos. Se ajustó la turbidez hasta igualar al testigo 0,5 de la escala de Mc Farland. Se verificó la turbidez por espectrofotometría.

3.3.2.1.4. Siembra en placas

Los inóculos preparados de las especies a testear se absorbieron con hisopo de algodón estéril y el exceso de líquido se descartó oprimiendo el algodón contra la pared del tubo. Para sembrar las placas se aplicaron los hisopos sobre la superficie de las mismas, efectuando estrías en direcciones

diferentes hasta cubrir uniformemente la superficie. Se dejaron secar durante cinco minutos antes de proceder a aplicar los discos embebidos con los extractos y controles (*cf.* 3.3.2.1.6).

3.3.2.1.5. Metodología

Se impregnaron los discos con los extractos hasta una carga total de 200 a 250 μg y luego se secaron a 50-60°C. Se aplicaron sobre la superficie del medio inoculado con una pinza estéril junto con los discos embebidos en los controles positivos y negativos, ejerciendo ligera presión sobre los mismos. Transcurridos 15 minutos de la colocación, las placas se incubaron invertidas en la estufa a 35°C durante 48 – 72 horas o hasta observar desarrollo en la placa control de viabilidad (se sembraron 100 μl de una dilución 1/100 en SF estéril de los inóculos en AGS).

Los discos (6 mm de diámetro) fueron preparados con Papel Whatman nº 5, esterilizados, refrigerados y protegidos del exceso de humedad. Se emplearon 6 discos en una placa convencional de 100 mm.

3.3.2.1.6. Controles

Control de Solvente (control negativo). Discos cargados con cada uno de los solventes y secados en iguales condiciones que las muestras. Ensayo válido: ausencia de halo inhibitorio.

Control de inhibición (control positivo). Se prepararon soluciones madre de 2 mg/ml de fluconazol (Pfizer) en solución fisiológica estéril y Anfotericina B (Pfizer) en DMSO. A partir de ellas se emplearon 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cada una, la primera como control positivo en las pruebas de levaduras y la segunda en hongos filamentosos. Ensayo válido: presencia de halos inhibitorios.

3.3.2.1.7. Interpretación de los resultados

La lectura de las pruebas de susceptibilidad de las levaduras se hizo visualmente y los halos de inhibición se midieron en mm empleando una reglilla calibrada. Los diámetros se compararon con los obtenidos con los controles positivos.

En los hongos filamentosos la lectura se hizo del mismo modo y los halos de inhibición medidos se compararon con los halos de los discos embebidos en los extractos y el del control positivo.

3.3.2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de levaduras y hongos filamentosos formadores de conidias por el método de dilución .

3.3.2.2.1. Metodología

Se subcultivaron las especies de *Candida* y *Aspergillus* sobre AGS y PDA, respectivamente, se incubaron toda la noche a 35°C para las levaduras y a la misma temperatura hasta la fructificación en los hongos filamentosos. En un tubo conteniendo 2 ml de CGS se inocularon 5 o más colonias de *Candida spp.* y conidias de *Aspergillus spp.*, se corrigió la turbidez para que sea equivalente al estándar de Mc Farland 1 (aproximadamente 10^8 UFC/ml). Se transfirió 0,1 ml de los caldos turbios a 10 ml de CGS y se incubó a 35°C hasta que se observó turbidez. Se prepararon diluciones seriadas al medio de los extractos y los antifúngicos controles en 2ml de solución fisiológica estéril utilizando pipeta estéril. Se colocaron 0,1 ml de los inóculos en los tubos que contenían las diluciones seriadas de los extractos (se introdujo la pipeta por debajo de la superficie del caldo y se lavó la punta 5 veces en cada cambio de dilución en SF estéril). La concentración final del inóculo fue de aproximadamente $2,5 \cdot 10^5$ UFC/ml. Se Incubaron los tubos

durante 20 horas a 5 °C. La CMI se determinó por observación visual de los tubos, considerando como tal a la concentración más baja de extracto en la cual no se observó crecimiento fúngico después de la incubación.

3.3.2.3. Conservación y controles de calidad de los medios de cultivo.

3.3.2.3.1. Medios de cultivo deshidratados

Los frascos conteniendo los medios de cultivo deshidratados fueron almacenados en lugares frescos, a temperatura ambiente y protegidos contra la humedad y la luz. El medio esterilizado fue enfriado a 50-55 °C antes de ser vertido en las placas de Petri; durante este proceso se tomaron muestras del medio para realizar el control de calidad por esterilidad y eficiencia. Si el medio de cultivo no se empleó de inmediato, se almacenó a 4°C en refrigeradora con las placas de Petri ubicadas en forma invertida.

Cuando se emplearon las placas refrigeradas éstas fueron colocadas a 35°C por 2 horas, colocándolas siempre invertidas. Si el material sufrió cambios, tales como deshidratación, endurecimiento y cambio de color, fue descartado.

Se realizó un registro de cada frasco adquirido, con el nombre del producto, nombre y número de control del frasco, fecha de recibo, fecha de vencimiento, número de lote y fecha en que se abrió el frasco. Cada lote preparado de medio de cultivo fue probado antes de su uso rutinario, por eficiencia o calidad, mediante la inoculación de las cepas fúngicas. Se emplearon para ello las cepas de colección y se preparó un libro de registro de los resultados obtenidos.

Se rotularon todos los medios preparados, tanto en placas de Petri como en tubos, indicando además la fecha de preparación y de vencimiento. Antes de la realización de las pruebas antimicrobianas se efectuaron las siguientes observaciones de las posibles alteraciones de los medios de cultivo: a)

presencia de rajaduras del envase conteniendo los medios de cultivo tanto en placas de Petri como en tubos, b) presencia de rajaduras en la superficie de los medios de cultivo, c) variaciones en el volumen del medio, d) presencia de burbujas, e) cambio de color normal, f) presencia de contaminación microbiana y g) valor de pH incorrecto.

3.3.2.3.2. Medios de cultivo preparados

Luego de preparados siguiendo las instrucciones de la bibliografía, estos medios se fraccionaron en tubos de ensayo (aproximadamente 10 ml) y se esterilizaron. Se conservaron refrigerados a 4°C hasta su empleo y previamente a su uso se realizaron las mismas pruebas de calidad y eficiencia que en los medios deshidratados.

3.3.3. ENRAIZAMIENTO DE ESTACAS

3.3.3.1. Procedencia

Los ensayos de enraizamiento de estacas de *Terminalia australis* se instalaron en el invernáculo del Centro de Propagación Vegetativa (CEPROVE) ubicado en la Escuela de Bosques de la ciudad de La Plata, Pcia. de Bs. As., Argentina. Las estacas recolectadas los días mencionados en 3.2.1.1. fueron obtenidas a una distancia del suelo de 1m del ejemplar depositado en LPR, bajo el n° 993 (8 m de altura, 75 cm de perímetro de fuste principal).

3.3.3.2. Procesamiento

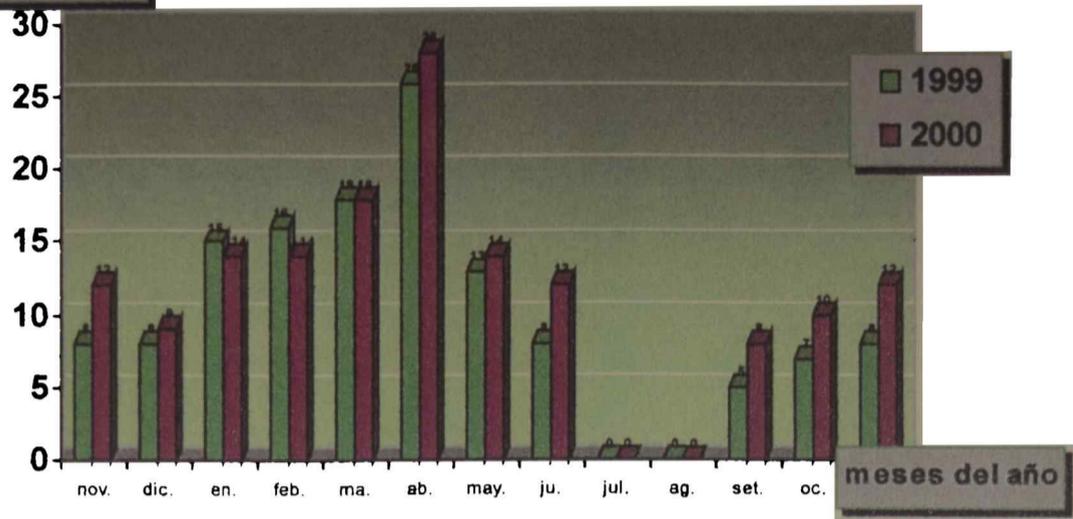
El mismo día en que las estacas fueron recolectadas, aquellas de diámetro variable entre 0,2 cm y 1,4 cm, leñosas y desprovistas de hojas, fueron

cortadas de modo de obtener estacas de 20 cm de longitud. Se pusieron 25 estacas por solución de ácido naftilacético (ANA), ensayando cuatro concentraciones de ANA: 0, 25, 50 y 100 ppm, manteniendo las estacas durante 48 horas en oscuridad.

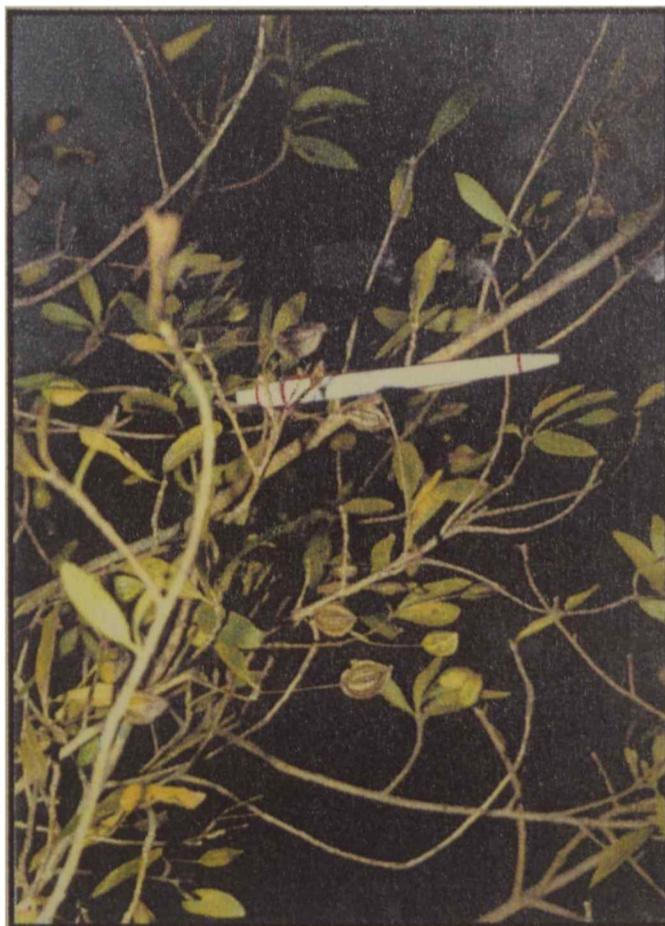
Previo a su instalación, en la superficie de corte se aplicó una mezcla de talco y Benlate en proporción de 18,8 g y 1,2 g, respectivamente. Las estacas se colocaron en bandejas de plástico con drenaje, llenas con sustrato (perlita y vermiculita, 1:1) tratado previamente con una solución de hipoclorito de sodio comercial 1:100. Se empleó sistema de neblina, sin calefacción artificial.

Luego de tres meses las estacas fueron levantadas para la toma de datos: número, longitud y lugar de inserción de raíces, número y longitud de brotes, formación de callos, estacas vivas y muertas. Las estacas vivas se volvieron a colocar en el mismo sustrato. pH final: 5.6 ± 0.2

halo de inhibicion
en mm.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Las plantas constituyen una fuente inagotable de compuestos químicos. En el caso de los constituyentes químicos con actividad farmacológica, su presencia en la planta varía como resultados de factores genéticos, climáticos, composición de suelos y de otros factores externos, como el momento en el cual se realiza la recolección, el secado y la conservación del material (Schulz *et al.*, 1998).

Antes de comenzar las pruebas biológicas para determinar la potencial actividad farmacológica de un extracto vegetal se debe conocer con seguridad la identidad botánica del vegetal que se estudiará. La descripción de la exo-endomorfología del mismo permite determinar los parámetros de identificación imprescindibles para conocer su identidad botánica.

Terminalia australis Cambessedes (en Saint-Hilaire, Fl. Bras. Merid., 2:240, t. 128, 1829) constituye la especie objeto del presente estudio. El nombre genérico *Terminalia* L., (Mant., 1:21, 1767) proviene del latín *terminus* (fin, cúspide) aludiendo a las hojas agrupadas en el ápice de las ramitas.

Sinonimia: *Myrobalanus australis* (Cambess.) Kuntze (Rev. Gen. 1:237, 1891).

El material que documenta *Terminalia australis*, descrito por Cambessedes, consigna: "Ad ripas rivuli vulgo Toropasso ad amnem Ibicuy in provinciâ Missionum; necnon in sylvis prope prædium vulgo S. Juan haud longè ab urbe Colonia do Sacramento". Posteriormente Eichler (1867:85) cita: "In Brasilia austro-orientali: Sello; ad ripas rivuli vulgo Toropasso ad amnem Ibicuy in prov. Paraná, nec non in silvis prope prædium vulgo S. Juan haud longe ab urbe Colonia do Sacramento: St. Hilaire".

Terminalia australis registra una gran cantidad de nombres vulgares (Backes y Nardino 1999, Bertoni s/a, Corrêa 1984, Lahitte y Hurrell 1997 b), entre ellos "palo amarillo", "amarillo", "amarillo del río", "blanquillo" y "tanimbú" (castellano), "ihvihrá saihdyú" (guaraní), "amarilho", "sarandi amarelo", y "amarelinho" (portugués) y "bombawy" (inglés).

Sus nombres vulgares se deben al color amarillo-ocráceo de la madera. Bajo el nombre vernáculo de "palo amarillo" se designa también a los siguientes taxones: *Terminalia triflora* (Griseb.) Lillo (Combretaceae), *Berberis buxifolia* Lam. (Berberidaceae), *Phyllostylon rhamnoides* (Poiss.) Taub. (Ulmaceae) y *Aloysia gratissima* (Gillies *et* Hook.) Troncoso (Verbenaceae).

4.1. ESTUDIO BOTÁNICO

4.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Los ejemplares adultos son árboles de 4-15 m de altura y 40 cm de diámetro, ramificados desde la base, con troncos frecuentemente tendidos (Figs.33 y 34). La corteza externa ocupa el 20 % de la corteza total, de textura corchosa, cubierta de líquenes crustáceos, con lenticelas negras, lineares, pequeñas y compactas; presenta fisuras superficiales, de tipo irregular, de disposición aproximadamente paralela, con crestas redondeadas o planas; la forma en que se desprende la corteza es escamosa, con escamas adheridas, de forma irregular (Fig. 35). La corteza interna ocupa el 80 % de la corteza total, es de textura fibrosa, patrón corrugado y húmeda al tacto.



Figura 33



Figura 34



Figura 35

Las ramas son pubérulas cuando jóvenes, las adultas glabrescentes. Presenta hojas simples, discolores, alternas o en seudoverticilos, angostamente elípticas u oblanceoladas, 4-6 veces más largas que anchas, de 2-7 cm de largo, generalmente de ápice agudo, con 4-7 pares de nervaduras laterales manifiestas en la cara abaxial, cortamente pecioladas (Fig. 36).

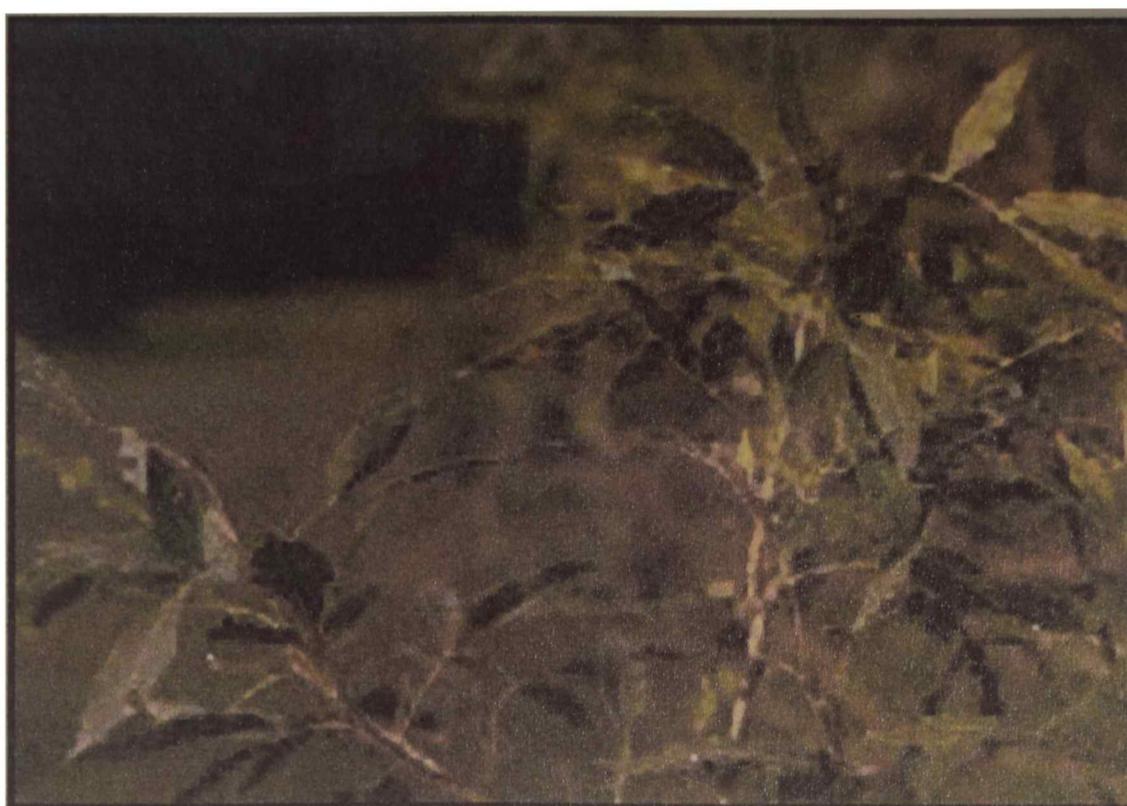


Figura 36

Las inflorescencias son espigas subcapitadas axilares, con un pedúnculo de 2-4,5 cm, conteniendo 3-12 flores, perfectas, amarillentas (Fig. 37), sobre un raquis de 1-12 mm de longitud, con brácteas diminutas. Flores de 6-9,2 mm, con tubo floral (o hipanto) pubescente. Sépalos 5, triangular-aovados, aproximadamente de 1 mm. Pétalos ausentes. Estambres 10, biseriados, exertos. Disco epígino, glabro. Óvulo anátropo. Estilo de aproximadamente 4,5 mm. Fruto péndulo, leñoso, elipsoidal o aovado, de unos 1,7-2,5 cm de largo por 0,7-1,7 cm de ancho, una de las caras convexa con una costilla, más o menos marcada, la opuesta plana con surco longitudinal poco marcado, apiculado; el ala marginal es estrecha, de 1-4 mm de ancho, indehiscente (Fig. 38). Las semillas son elipsoides, de 5 mm de largo por 2 mm de ancho, desnudas, sin ala, y la cubierta seminal es de color castaño claro .



Figura 37

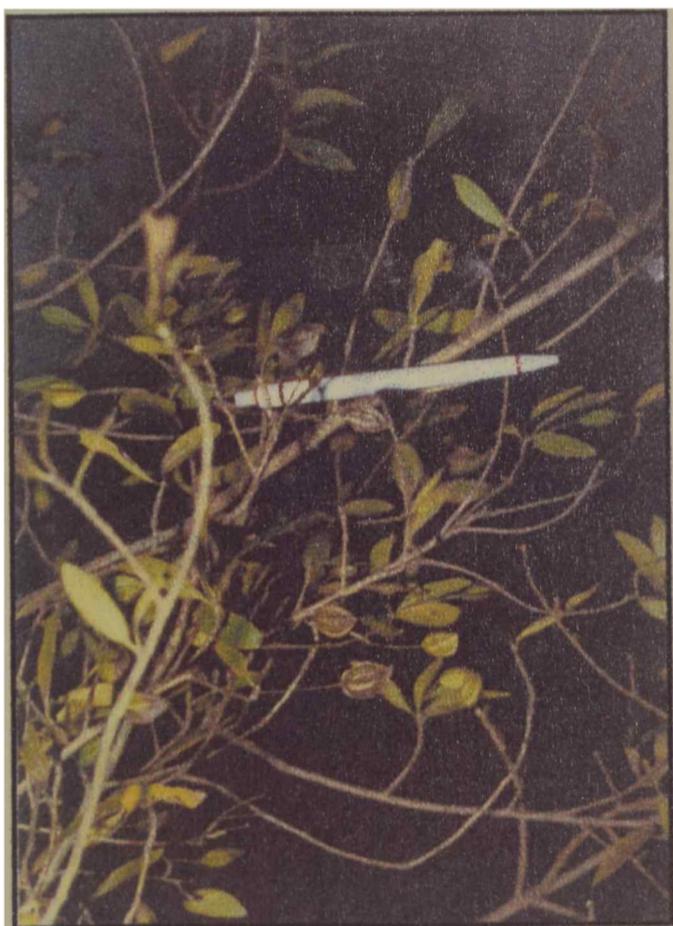


Figura 38

4.1.2.FENOLOGÍA

Florece en primavera y fructifica en verano y otoño.

4.1.3.OBSERVACIONES ECOLÓGICAS

Los ejemplares observados en Misiones, márgenes del Arroyo Cuña Pirú y Piray Guazú, presentan hojas de color verde oscuro, sin coloraciones rojizas, y tallos mas grisáceos que los vistos en Buenos Aires, Punta Lara. Esto se debe probablemente a la mayor cantidad de estratos arbóreos que limitan la cantidad de luz solar que llega a los estratos inferiores; no se descarta la posibilidad de que factores edáficos contribuyan a estas características. Exell y Reitz (1967) consideran que protege de la erosión las márgenes de los ríos.

4.1.4.HERBORISTERÍA

Bassols y Gurni (1998) la mencionan como posible adulterante del "poleo" (*Lippia turbinata* Griseb, *Verbenaceae*).

4.1.5.ESPECIE AFIN

Un taxón estrechamente emparentado es *Terminalia triflora* (Griseb.) Lillo, llamada vulgarmente "palo amarillo", "lanza amarilla", "amarillo del río", "guayaibí amarillo", " guayaibí-saiyú" o "lapachillo". Exell (1939) y Alwan (1983) consideran que, en ausencia de frutos, ambas especies son difíciles de diferenciar. Es una especie arbórea, termohigrófila, nativa de Brasil meridional, Paraguay, Bolivia y norte de Argentina (Catamarca, Corrientes, Chaco, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Sante Fé y Tucumán). Es tintórea; su madera se usa para construcciones civiles, muebles rústicos, revestimientos decorativos, fabricación de diversos objetos pequeños, elaboración de leña y carbón (Lopez, *et al* 1987;Ortega Torres *et al.*, 1989) y puede ser aplicada para la recomposición de áreas degradadas,

(Lorenzi 1995). Su madera presenta color amarillo, su textura es fina y homogénea y el grano derecho; moderadamente pesada, compacta, dura al corte (Lopez, *et al* 1987; Lorenzi 1995; Tortorelli 1956). Su leño fue estudiado por Cristiani (1962, 1973) y Tortorelli (1956).

4.1.6.DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Especie higrófito que crece en Brasil meridional, Paraguay, Uruguay y nordeste de Argentina, hasta el delta del Paraná, ribera platense e Isla Martín García El citado mapa fue confeccionado sobre la base de los materiales de colecciones de herbarios consultados y los citados por otros autores (Exell 1939, Exell y Reitz 1967). Crece desde 0-500 m sobre el nivel del mar(Guaglianone 1999).(Fig.39).



Figura 39

4.1.7. EXO-ENDOMORFOLOGÍA DE ÓRGANOS AÉREOS

4.1.7.1. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA HOJA

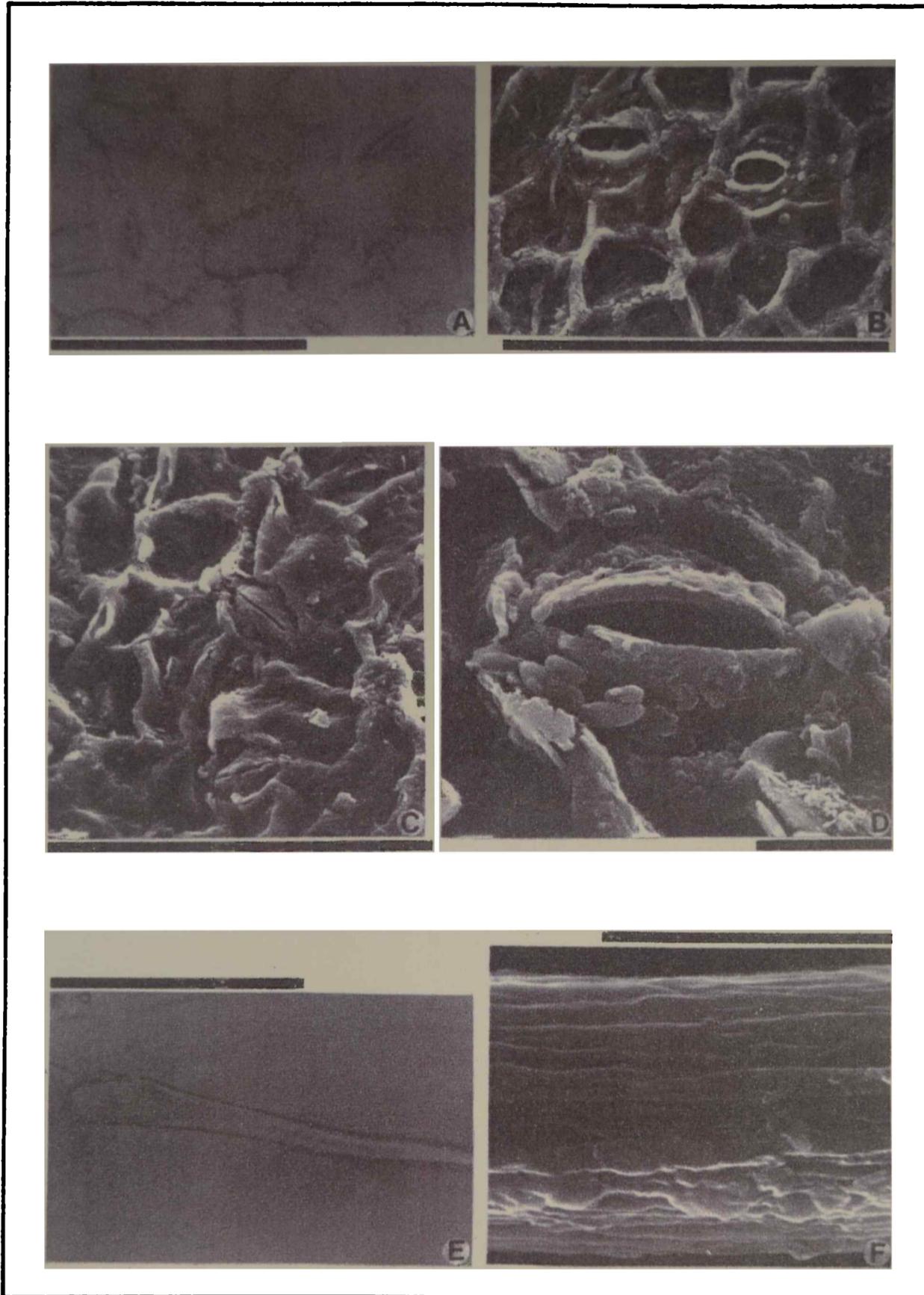
4.1.7.1.1. *Epidermis*

Microscopía óptica (Fig. 40 A y Fig. 41 A,E)

La cutícula es ornamentada. La epidermis adaxial está constituida por células de contorno recto o levemente ondulado (Fig.40 A ,41 A); la epidermis abaxial presenta células con contorno recto o levemente onduladas, con algunas divisiones anticlinales secundarias. Estomas anomocíticos en la epidermis abaxial, con paredes internas de márgenes engrosados (Fg.40 A). Tricomas "combretáceos" en ambas epidermis, unicelulares, simples, largos, rectos, de ápice agudo, con pared muy gruesa y en la base un compartimiento (Fig. 41 E). La base del tricoma es bulbosa y está circundada por 5(6)7 células epidérmicas en ambas caras (Fig. 42 B).

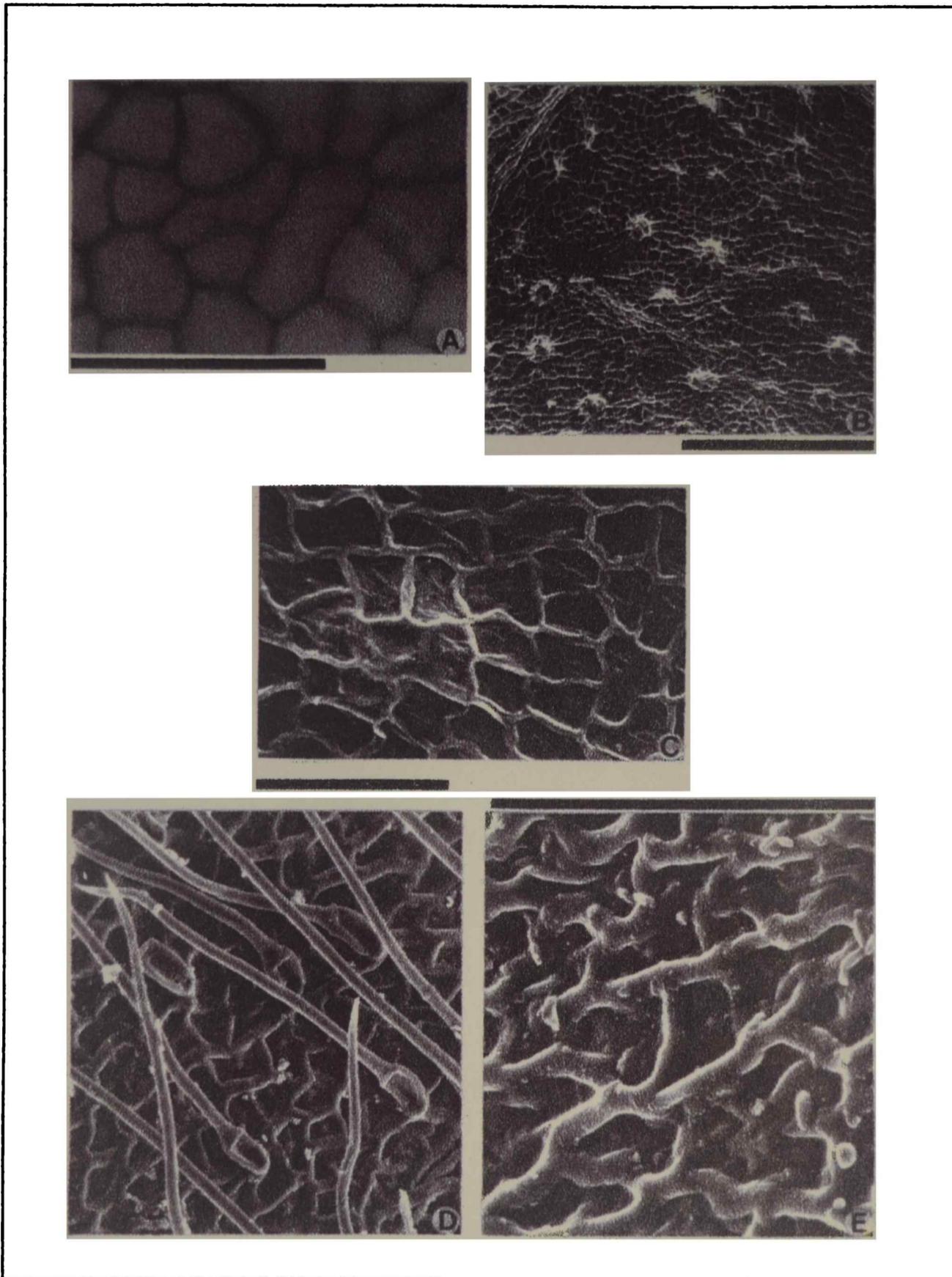
Microscopía electrónica de barrido (Fig. 40 B-E; 41 B-D, F y 42 C,E)

La cutícula de la epidermis adaxial está ornamentada con costillas, de sección redondeada, tortuosas formando un diseño retículoide (Fig. 40 E). Se observan ceras epicuticulares en forma de gránulo (Fig. 40 E). La cutícula de la epidermis abaxial está formada por costillas de sección redondeada (Fig. 41 C). Las paredes internas de los estomas poseen márgenes engrosados (Fig. 41 E).



Tamaño de barra: 100 μ m(A,C,D,E); 500 μ m (B).

Figura 40:Microscopía óptica: fotomicrografía de hoja (A: vista superficial de la epidermis adaxial). B-E: Microscopía electrónica de barrido: fotomicrografía de la epidermis adaxial (B: aspecto general con drusas en el mesófilo; C: detalle sin cutícula; D: ornamentaciones de la cutícula y tricomas; E: detalles de la ornamentación cuticular y epicutícula cerosa).



Tamaño de barra: 10 μ m (D, F), 100 μ m (A,B,C,E).

Figura 41 : Microscopía electrónica : fotomicrografía de hoja (A: vista superficial de la epidermis abaxial).B-D: Microscopía electrónica de barrido : fotomicrografía de la epidermis abaxial (B: sin cutícula, C: ornamentación cuticular; D: detalles del estoma y epicutícula cerosa)

4.1.7.1.2. Caracteres anatómicos del corte transverso de hoja (Figs. 42 A-E).

4.1.7.1.2.1. Lámina

Posee una cutícula gruesa y ornamentada. Las epidermis adaxial y abaxial son uniestratificadas, ésta última con estomas (Fig. 42 B). La estructura es dorsiventral. El mesófilo está compuesta por células de parénquima en empalizada dispuestas en una capa, en tanto que el parénquima lagunoso está integrado por 4(5)5 capas de células (Fig. 42 B). Se observan idioblastos cristalíferos conteniendo drusas de oxalato de calcio de 23,30(38,50)56,60 μm , $M_o=50.00 \mu\text{m}$, $s=3.07$ (Fig. 42 B,D,E).

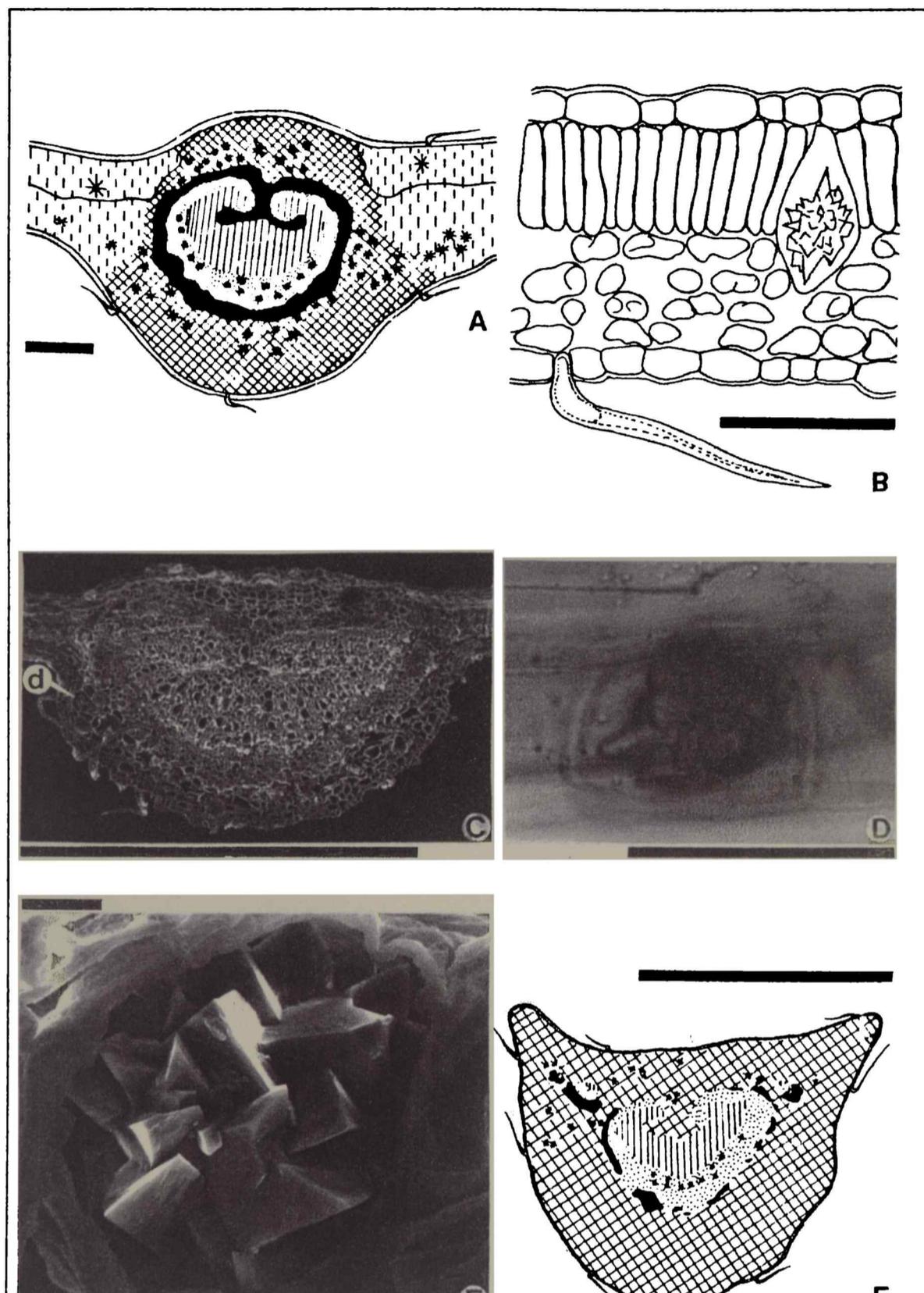
4.1.7.1.2.2. Sistema vascular de la nervadura principal

Haz colateral en forma de herradura, leño interno y liber externo con drusas de oxalato de calcio de 6,60(840)1340 μm , $M_o = 6,70 \mu\text{m}$, $s = 0,68$, rodeado de una vaina esclerenquimática completa (Fig. 42 A,C). Colénquima angular por debajo de ambas epidermis, con drusas de oxalato de calcio de 23,30(30,70)43,30 μm , $M_o = 26,60 \mu\text{m}$, $s = 1,28$ (Fig 42 A). Los nervios menores son colaterales, con un casquete de esclerénquima debajo del liber, rodeados por una vaina parenquimática, con extensiones de colénquima hacia ambas epidermis.

4.1.7.1.2.3. Pecíolo

Cutícula gruesa y ornamentada. Epidermis uniestratificada con tricomas "combretáceos" y estomas. Parénquima cortical constituido por colénquima angular, clorofiliano, con idioblastos cristalíferos conteniendo drusas de oxalato de calcio de 23,30(36,20)53,30 μm , $M_o = 33,00 \mu\text{m}$, $s = 2,00$.

Estructura vascular en forma de herradura, con xilema interno y floema externo, rodeado en la parte superior del pecíolo por una vaina de esclerénquima de fibras en proceso de diferenciación (lignificación). Floema con idioblastos cristalíferos conteniendo drusas de oxalato de calcio de 3,30(7,65)13,30 μm , $M_o = 6,60 \mu\text{m}$, $s = 0,65$. Nudo unilacunar.



Tamaño de barras: 200 μ m (A); 1000 μ m (C,F);100 μ m (B,D); 10 μ m (E).

Figura 42 : representación esquemática de la hoja en la zona de la nervadura media. B: Mesófilo. C: Microscopía electrónica de barrido: fotomicrografía de corte transverso de hoja. D: Microscopía óptica Fotomicrografía de una drusa. E: Microscopía electrónica de Barrido de una drusa. F: Representación esquemática del pecíolo.

4.1.7.1.2.4. Reacciones histoquímicas : taninos y alcaloides positivos.

4.1.7.2. Análisis estructural del tallo

4.1.7.2.1. Tallo primario. (Fig. 43, A-E).

4.1.7.2.1.1. Epidermis

Uniestratificada, de paredes celulares rectas, con abundantes tricomas "combretáceos" y estomas anomocíticos poco frecuentes (Fig. 43, C). El córtex primario está constituido por un colénquima angular (Fig. 43, E) con idioblastos cristalíferos, prismáticos y abultados, conteniendo drusas de oxalato de calcio de $16,50(27,00)43,30 \mu\text{m}$, $M_o = 26,60 \mu\text{m}$, $s = 2,13$ (Figs. 43 A, 44, A). La capa más interna del córtex es de naturaleza endodermoide (Fig. 44, C).

4.1.7.2.1.2. Tejidos vasculares

Se disponen formando una euestela, de haces bicolaterales. Periciclo conteniendo cordones aislados de fibras esclerenquimáticas situadas alrededor de una amplia porción de parénquima interno (Figs .43 A, 44 C). Floema interno escasamente desarrollado (Fig. 43 A). Floema externo con idioblastos cristalíferos, dispuestos en hileras tangenciales, conteniendo drusas de oxalato de calcio de $3,30(6,70)10,00 \mu\text{m}$, $M_o = 6,70 \mu\text{m}$, $s = 0,60$ (Fig. 43 A). Elementos de vaso con engrosamientos anillados, espiralados, escalariformes y areolados, con tabiques oblicuos a muy oblicuo, de $230,00(320,00)515,00 \mu\text{m}$, $M_o=233,00, 333,00 \mu\text{m}$, $s= 20,48$ de longitud, con apéndices de hasta $50,00 \mu\text{m}$. Los vasos no están aislados como en los tallos viejos, sino ordenados en grupos de hileras radiales. Presenta punteaduras intervasculares areoladas, pequeñas, circulares a ovals ornadas y alternas. El parénquima axial contiene cristales simples de

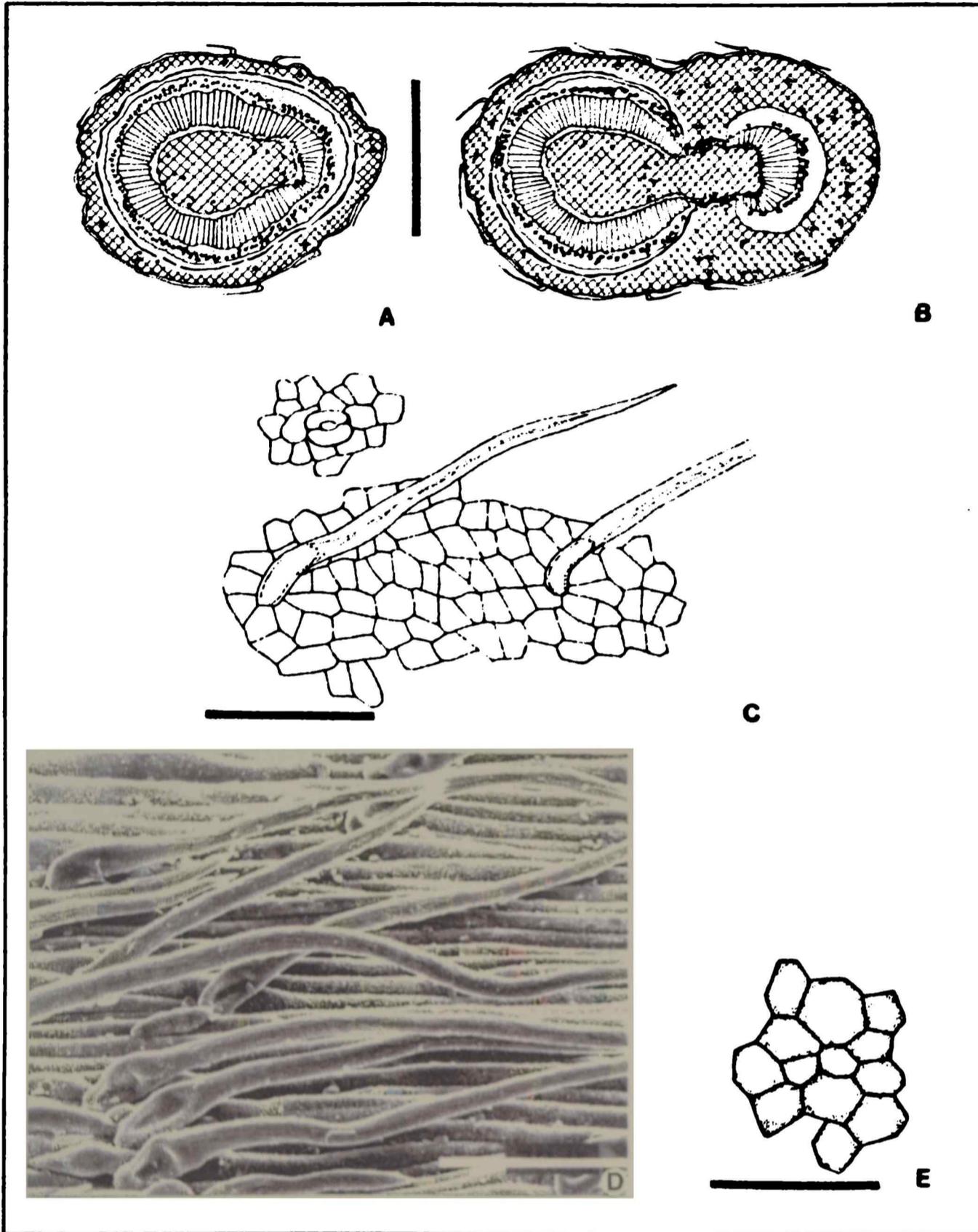
oxalato de calcio , alargados, prismáticos, de 16,60(27,70)40,00 μm , Mo = 23,30 μm , s =1,90. Fibras xilemáticas con punteaduras simples, de 400,00(695,00)975,00 μm , Mo = 880,00 μm , s = 13,34 de longitud.

4.1.7.2.1.3.Médula

Está formada por colénquima angular con idioblastos cristalíferos conteniendo drusas de oxalato de calcio de 10,00(19,80)33,30 μm , Mo = 20,00 μm , s = 1,43 (Fig. 43 A). Nudo unilacunar (Fig. 43 B).

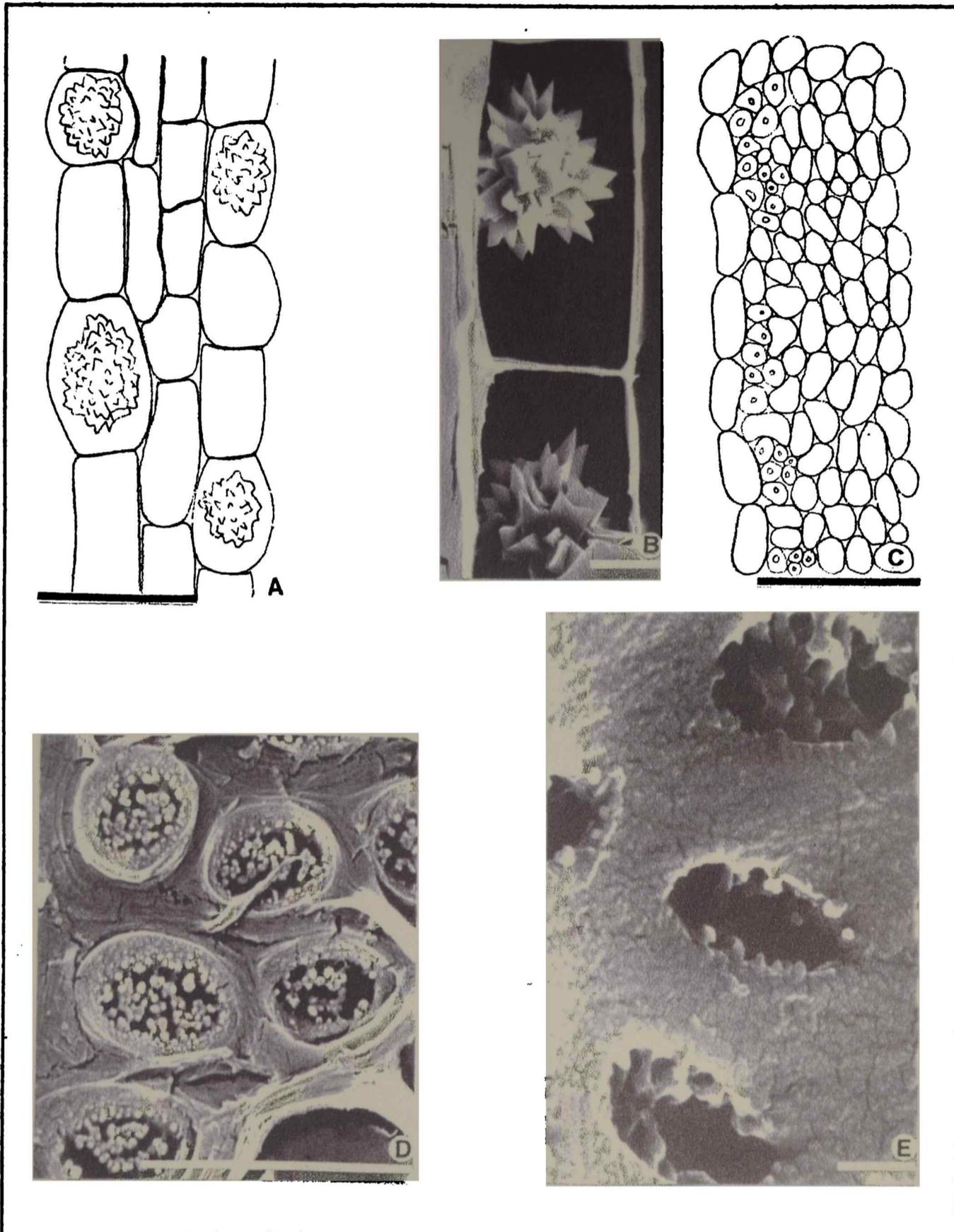
Microscopía electrónica de barrido

La cutícula de los tricomas está formada por estrías paralelas (Fig. 30 D). Los ornamentos de las punteaduras, como troncos gruesos con ramas, o apenas ramificadas, se encuentran hacia el interior de la cavidad areolar (Fig. 43 D, E).



Tamaño de la escala: 100 μ m (C-E); 1mm (A,B).

Figura 43 : Tallo primario (A: tallo primario; B: relación entre el sistema vascular del tallo y la hoja; C: epidermis en vista superficial; D: fotomicrografía con MEB de tricomas; E: colénquima en corte transversal).



Tamaño de la escala: 1 μm (E); 10 μm (B,D); 100 μm (A,C).

Figura 44 : Tallo primario (A: idioblastos cristalíferos del cortex en corte longitudinal; B: fotomicrografía con MEB de idioblastos cristalíferos del cortex; C: capa endodermoide, fibras y parénquima pericíclico en corte transversal; D-E: fotomicrografías con MEB, detalles de la vista externa e interna de las punteaduras ornadas respectivamente).

4.1.7.2.1.4. Reacciones Histoquímicas

Taninos y alcaloides positivo.

4.1.7.3. Análisis estructural de la flor

(Figs. 45 A-K, 46 A-F)

Las inflorescencias son espigas subcapitadas axilares, con un pedúnculo de 2-4,5 cm de longitud, ligeramente piloso. Las flores (3-12, perfectas, amarillentas) están dispuestas sobre un raquis de 1-12 mm de long.; las brácteas tienen 2-3 mm de longitud y son pilosas. Las flores miden de 6-9,2 mm; el hipanto está dividido en una parte inferior de 2-2,5 mm de longitud, tubuliforme, densamente serícea, adnata al ovario y una parte superior de 2-2,5 mm de longitud, cupuliforme, pubescente (Fig.45 A). Posee 5 sépalos triangular-aovados, reflexos, de aproximadamente 1 mm, pubescentes y valvados. Pétalos ausentes. Los estambres son 10, biseriados, con un primer ciclo antisépalos y el segundo alternisépalos, exertos, con anteras versátiles y dehiscencia longitudinal. El disco glandular epigino es lobado, de 2-2,5 mm de diámetro, adnato al hipanto superior. El ovario es unilocular. Los óvulos son anátropos, péndulos. El estilo es exerto, cilíndrico, de aproximadamente 4,5 mm, con estigma simple.

4.1.7.3.1. Hipanto

La epidermis externa del hipanto inferior está formada por células de paredes rectas a levemente onduladas, con estomas anomocíticos y tricomas "combretáceos" (Fig. 45 B), conteniendo entre los haces vasculares idioblastos cristalíferos con drusas de oxalato de calcio de 10,00(17,00)27,00 μm , $M_o = 16,60 \mu\text{m}$, $s = 1,18$. La epidermis externa del hipanto superior está formada por células de paredes rectas a levemente onduladas, con estomas anomocíticos y tricomas "combretáceos" (Fig. 45 C). La epidermis interna del hipanto superior está constituida por células de paredes rectas a levemente onduladas, con tricomas "combretáceos" (Fig. 45 D). Entre ambas hay un parénquima con algunos espacios intercelulares, conteniendo en las capas cercanas a la epidermis interna idioblastos cristalíferos con drusas de oxalato de calcio de 6,50(11,60)30,00 μm , $M_o = 10,00 \mu\text{m}$, $s = 1,36$ (Fig. 45 E).

4.1.7.3.2. Disco glandular

La epidermis está formada por células de paredes rectas a levemente onduladas, con estomas anomocíticos y muy escasos tricomas "combretáceos". Entre las células secretoras hay idioblastos cristalíferos con drusas de oxalato de calcio de 20,00(20,80)26,65 μm , $M_o = 20,00 \mu\text{m}$, $s = 1.03$.

4.1.7.3.3. Sépalos

La epidermis externa presenta paredes rectas a onduladas con estomas anomocíticos (Fig. 45 F), en tanto que la epidermis interna está formada por células de paredes rectas a onduladas (Fig. 45 G), ambas con tricomas "combretáceos" (Figs.45 F, G). Entre ellas hay un parénquima con algunos espacios intercelulares, conteniendo en las capas cercanas a la epidermis interna idioblastos cristalíferos con drusas de oxalato de calcio de 6,50(13,50)23,50 μm , $M_o = 13,00 \mu\text{m}$, $s = 1,55$.

4.1.7.3.4. Gineceo

La epidermis del estilo es de aspecto prosenquimatoso, formada por células con cutícula estriada, el tercio basal con tricomas "combretáceos" y el resto glabra (Fig. 45 H); el parénquima contiene idioblastos cristalíferos con drusas de oxalato de calcio de 6,50(14,00)30,00 μm , $M_o = 16,65 \mu\text{m}$, $s = 2,02$. el ovario presenta idioblastos cristalíferos con drusas de oxalato de calcio de 3,30(6,40)10,00 μm , $M_o = 6,50 \mu\text{m}$, $s = 0,64$. Los óvulos son 2, crasinucelados, bitegmentados y con funículo largo.

4.1.7.3.5. Estambres

4.1.7.3.5.1. Filamento

La epidermis presenta células rectangulares con cutícula estriada (Fig. 46 J), rodeando un colénquima angular que contiene un haz vascular; los elementos de vaso muestran engrosamientos anillados y espiralados.

4.1.7.3.5.2. Antera

La epidermis posee una cutícula estriada, con endotecio conspicuo a la madurez, con engrosamiento de lignina, tapete secretor y 4 sacos polínicos. Debajo de la epidermis hay idioblastos cristalíferos con drusas de oxalato de calcio de 5,00(8,00)10,00 μm , $M_o = 6,50 \mu\text{m}$, $s = 0,50$ y también entre los sacos polínicos de cada teca, en este caso de 13,30(16,00)23,30 μm , $M_o = 16,60 \mu\text{m}$, $s = 0,84$.

Microscopio Electrónico de barrido

La cutícula de la antera exhibe numerosas estrías tortuosas (Fig. 45 K); el endotecio muestra engrosamientos en forma de bandas (Fig. 46 A).

4.1.7.3.5.3. Polen

Los granos son polares, radiosimétricos, subprolatos a esferoidales (Fig. 46 D), heterocolpados, con 3 colporos y 3 pseudocolpos; los colpos y pseudocolpos están próximos a los polos y son circulares a alargados, a veces protrusivos; la exina es tectada.

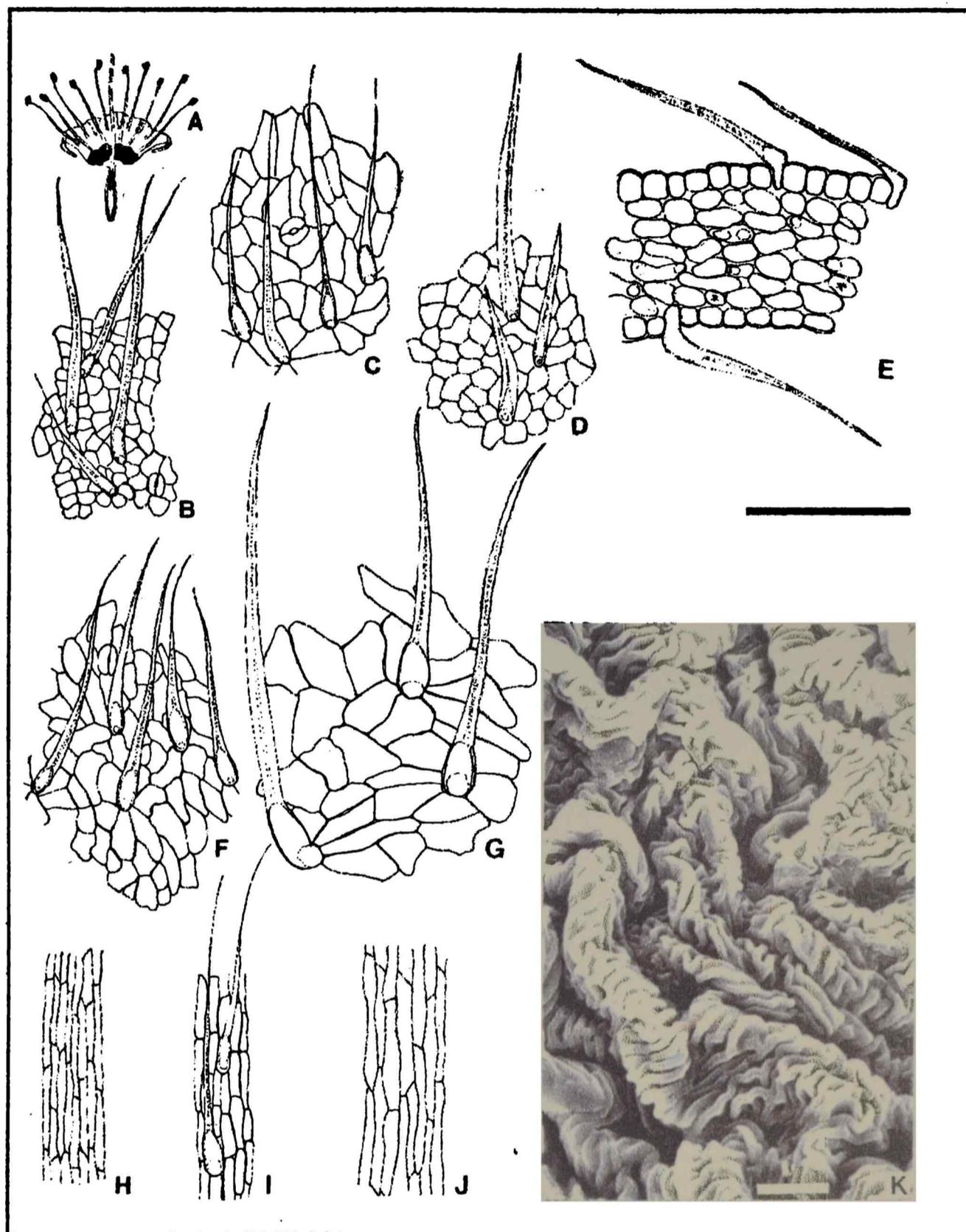
Dimensiones: diámetro polar 13,60(17,00)20,50 μm , $M_o = 16,30 \mu\text{m}$, $s = 0,88$; diámetro ecuatorial 11,00(14,00)16,30 μm , $M_o = 15,00 \mu\text{m}$, $s = 0,90$; diámetro de ora 1,90(2,50)3,00 μm , $M_o = 2,70 \mu\text{m}$, $M_o = 0,21$, $s = 0,21$ x 4,00(4,60)5,50 μm , $M_o = 4,00 \mu\text{m}$, $s = 0,46$; espesor de la exina en los polos 1,4 μm .

Microscopio electrónico de barrido

Superficie con puntas y nanorúgulas (Figs. 46 C, E, F).

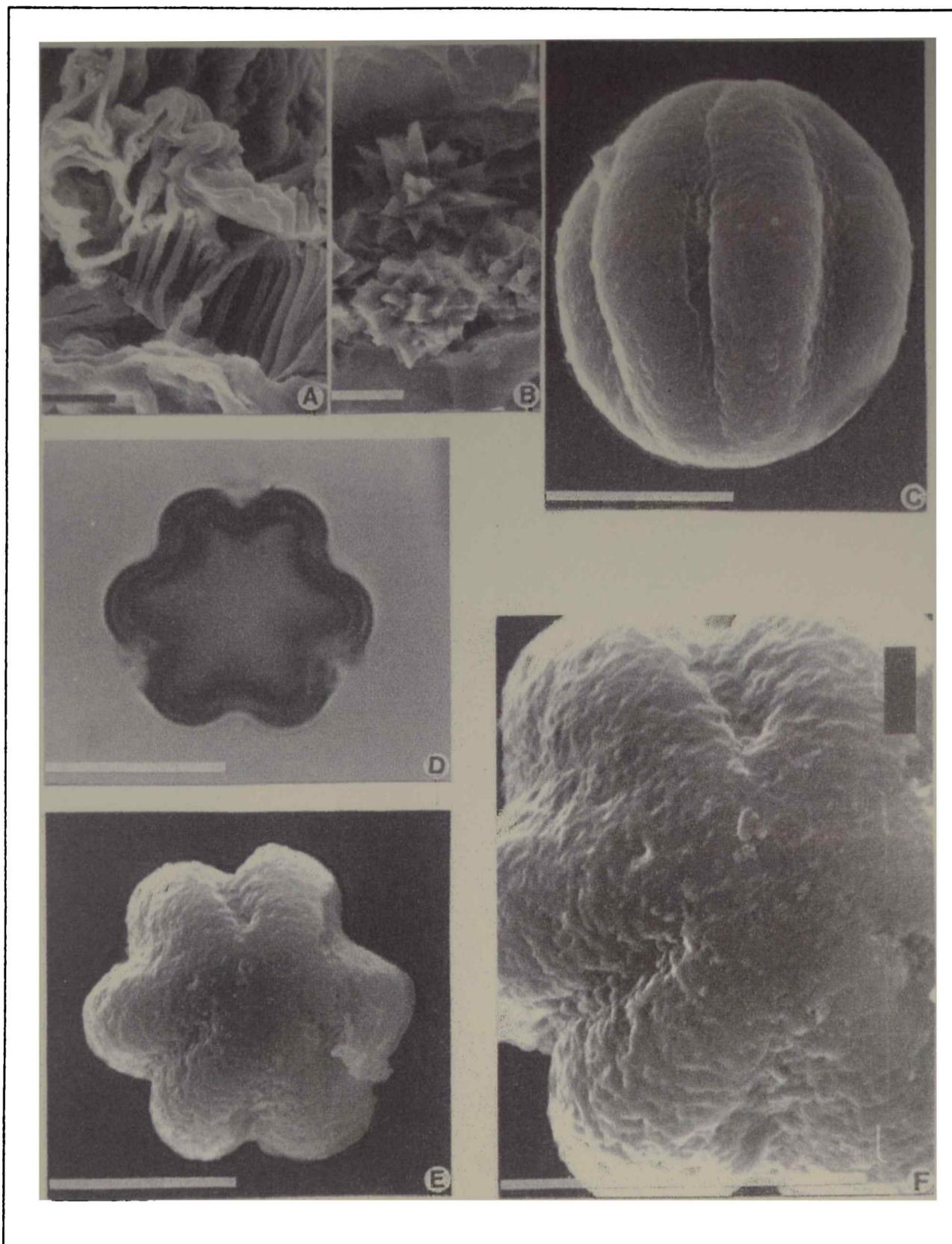
4.1.7.3.6. Reacciones histoquímicas

Las reacciones para detectar presencia de taninos dieron resultado positivo en hipanto, disco glandular, sépalos, gineceo y estambres.



Tamaño de la escala: 10 μ m (I); 100 μ m (B-J).

Figura 45. Flor. A: hipanto parcialmente desplegado; B: vista superficial de la epidermis externa del hipanto inferior; C, D, E: vista superficial de la epidermis externa, interna y corte transverso del hipanto superior respectivamente; F, G: vista superficial de la epidermis externa e interna de los sépalos respectivamente; H, I: vista superficial del sector medio y basal de la epidermis del estilo respectivamente; J: vista superficial de la epidermis del filamento estaminal; K: fotomicrografía con MEB del detalle de la cutícula de la antera).



Tamaño de la escala: 10 μm (A-F).

Figura 46. Flor (A, B, C, E, F): fotomicrografías con MEB). A: engrosamientos del endotecio, B: drusas entre sacos polínicos, C: vista ecuatorial del polen, E: vista polar, F: detalle de la escultura; D: fotomicrografía con MO del polen en vista polar).

4.1.7.4. Análisis estructural del fruto (Figs 47 A-G, 48 A-D, 50 E, F)

El fruto es péndulo, leñoso, elipsoidal o aovado, de unos 1,7-2,5 cm de largo por 0,7-1,7 cm de ancho, con una de las caras convexa con una costilla más o menos marcada, la opuesta plana con surco longitudinal poco marcado, apiculado; el ala marginal es estrecha, de 1-4 mm de ancho, indehiscente.

4.1.7.4.1. Pericarpio

4.1.7.4.1.1. Epicarpio

Está constituido por 1 capa de células de contorno poligonal en vista superficial, con tricomas "combretáceos" y estomas anomocíticos (Fig. 47C).

4.1.7.4.1.2. Mesocarpio

Está formado por aproximadamente 6 capas de células parenquimáticas (Figs. 47 A, B, G).

4.1.7.4.1.3. Endocarpio

El endocarpio externo está constituido por fibras esclerénquimáticas de 221,00(508,00)860,00 μm , $M_o = 312,00 \mu\text{m}$, $600,00 \mu\text{m}$, $s = 12,67$ de largo (Figs. 47 A, 6A). El endocarpio medio está formado por esclereidas (braquiesclereidas, astroesclereidas y macroesclereidas), fibras esclerenquimáticas de 203,00(283,00)366,00 μm , $M_o = 283,00 \mu\text{m}$, $s = 15,53 \mu\text{m}$ de largo, idioblastos cristalíferos conteniendo drusas de oxalato de calcio de 26,60(34,00)43,00 μm , $M_o = 36,60 \mu\text{m}$, $s = 1,57$ y 5 haces vasculares con una casquete externo de esclerénquima (Figs. 47 A, 48 A). El endocarpio interno está constituido por fibras esclerénquimáticas de 208,00(400,00)550,00 μm $M_o = 170,00 \mu\text{m}$, $s = 6,84$ de largo y fibras con cristales prismáticos de oxalato de calcio de 13,30(19,00)30,00 μm , $M_o = 16,60 \mu\text{m}$, $s = 1,19$ (Figs. 47A, 48 A).

Microscopía electrónica de barrido

La cutícula de los tricomas está formada por estrías paralelas (Figs. 47 D,E). El

epicarpio se halla cubierto por una película de cera amorfa sobre la cual están sobrepuestas estructuras semicristalinas y cristalinas en forma de costras y placas (Fig. 47 F). Las esclereidas y fibras esclerenquimáticas del endocarpio presentan punteaduras simples de 0,22-2,30 μm (Fig. 48 B) y 0,50-3,00 μm de diámetro, respectivamente (Fig. 48 C). Los idioblastos cristalíferos del endocarpio son poliédricos (Fig. 48 D).

4.1.7.4.2. Pedúnculo

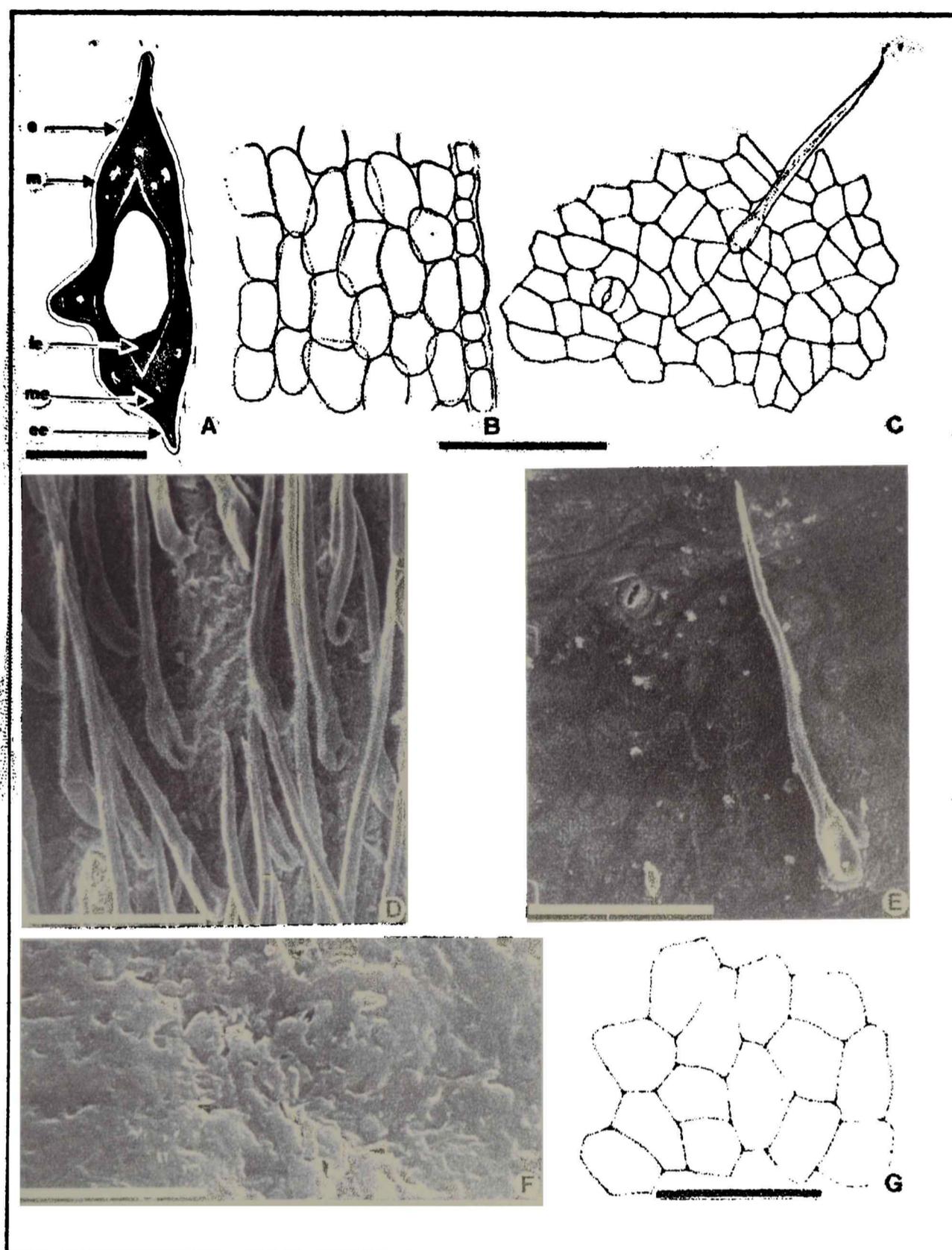
Las células de la epidermis tienen paredes rectas, con tricomas "combretáceos" (Fig. 48 F). El córtex primario está constituido por un colénquima angular con idioblastos cristalíferos conteniendo drusas de oxalato de calcio de 20,00(28,50)40,00 μm , $M_o = 26,50 \mu\text{m}$, $s = 1,44$. La capa más interna de la corteza es de naturaleza endodermoide.

Es una euestela de haces bicolaterales. El periciclo está formado por una vaina colenquimatosa, que a veces se lignifica, y una porción interna de parénquima. El floema interno está escasamente desarrollado (Fig. 48 E), en tanto que el floema externo presenta idioblastos cristalíferos conteniendo drusas de oxalato de calcio de 3,30(5,00)6,70 μm , $M_o = 5,00 \mu\text{m}$, $s = 0,60$.

La médula está formada por colénquima angular con idioblastos cristalíferos conteniendo drusas de oxalato de calcio de 13,30(19,00)23,30 μm , $M_o = 5,00 \mu\text{m}$, $s = 0,37$ (Fig. 48 E).

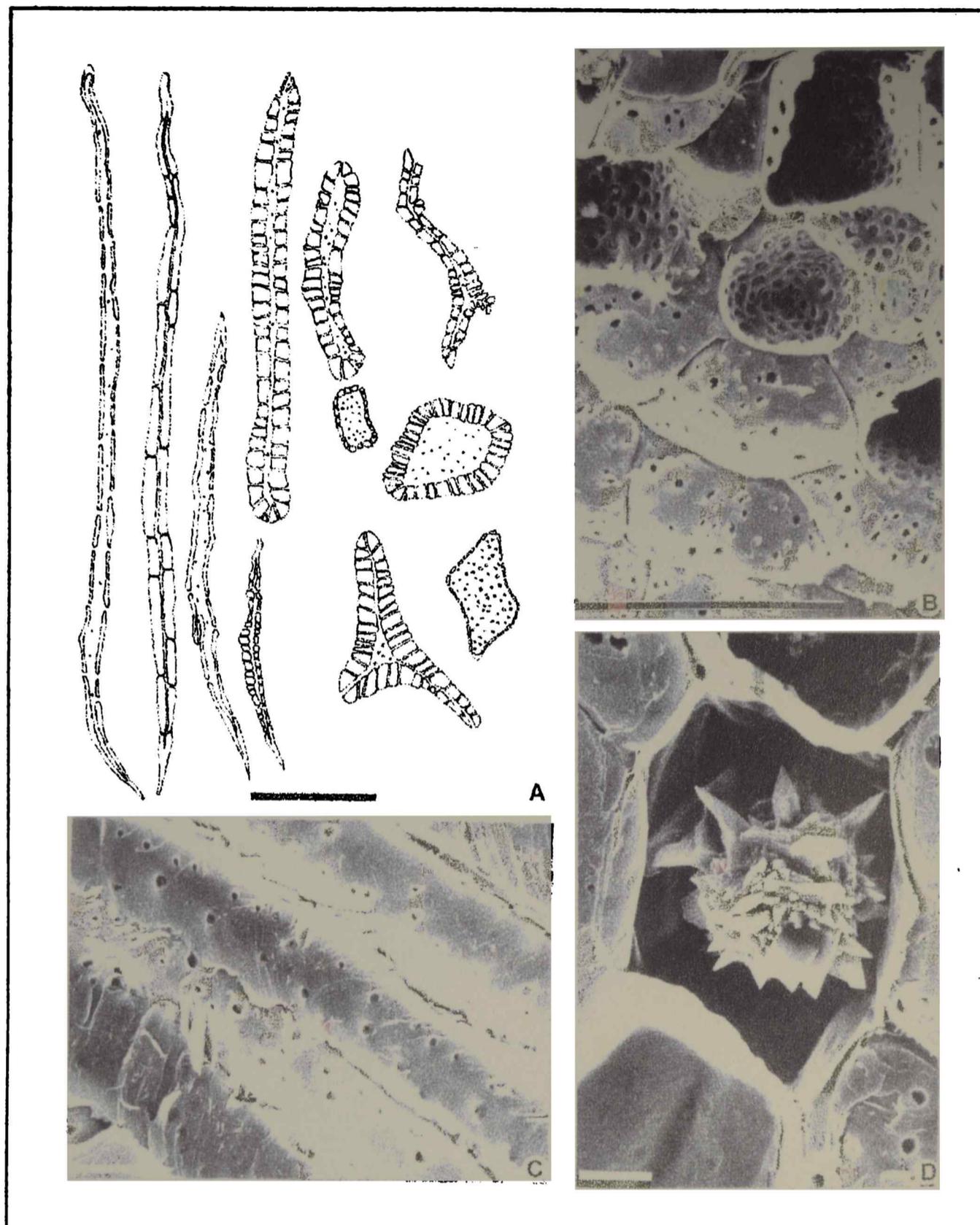
4.1.7.4.3. Reacciones histoquímicas

Las reacciones para determinar la presencia de taninos resultaron positivas en frutos (pericarpio y pedúnculo) inmaduros y maduros .



Tamaño de la escala: 10 μ m (F); 100 μ m (B-E,G); 5 mm (A).

Figura 47. Fruto (A: fruto en corte transversal; B: epicarpio y mesocarpio en corte transversal; C: epicarpio en vista superficial; D-F: fotomicrografías con MEB del epicarpio inmaduro, maduro y detalle de ceras epicuticulares respectivamente; G: primer capa del mesocarpio en vista superficial).



Tamaño de la escala: 10 μm (C,D); 100 μm (A,B).

Figura 48. Fruto (A: fibras esclerenquimáticas y esclereidas del endocarpio; B-D: fotomicrografías con MEB, B: esclereidas del endocarpio, C: fibras esclerenquimáticas del endocarpio, D: idioblasto cristalífero del endocarpio).

4.1.7.5. Análisis estructural de la semilla .(Figs. 49 A-G, 50 A-D)

Las semillas son fusiformes, de 5-12 mm largo por 2 mm de ancho, desnudas, sin ala, con cubierta seminal de color castaño claro y rafe castaño apical y circular.

La exotesta es de color amarillo pálido, mate, formada por células de paredes celulósicas rectas a brevemente onduladas, sin estomas (Fig. 49 C). La mesotesta es de color castaño-amarillento, constituida por células escleróticas (Fig. 49 D). La endotesta, así como el exotegmen, es de color castaño-amarillento y está constituida por células traqueidales, con engrosamientos espiralados (Fig. 49 F). El endotegmen es de color amarillo pálido y está formado por 2-3 capas de células de paredes delgadas, alargadas y aplastadas tangencialmente (Fig. 49 A).

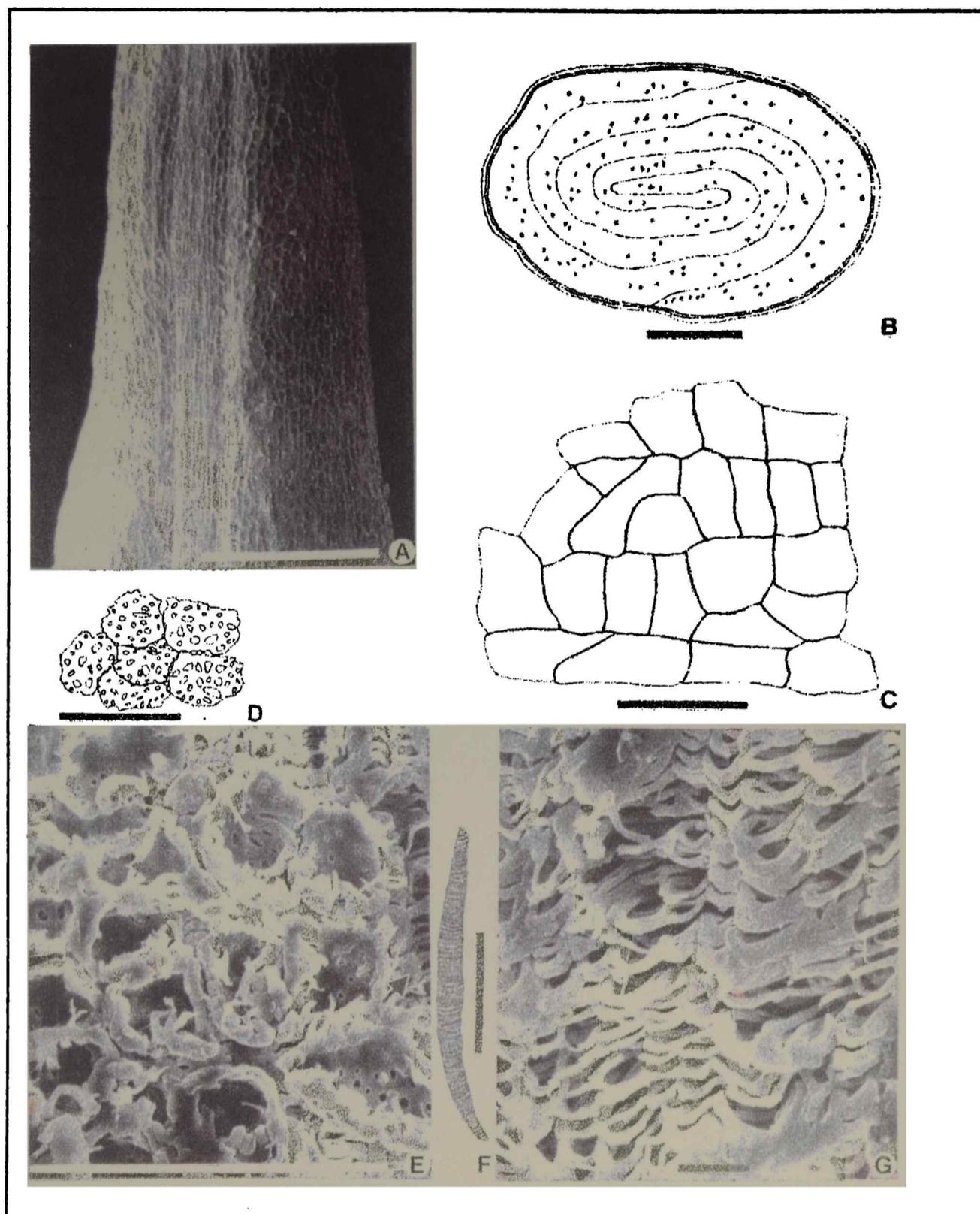
La semilla es no endospérmica, con cotiledones gruesos y carnosos que llenan la cavidad seminal, de vernación convoluta (Fig. 49 B y contiene células con sustancias ergásticas y drusas de oxalato de calcio de 23,30(37,00)47,00 μm , Mo = 36,60 μm , s = 2,09 (Figs. 49 B, 50 B).

Microscopio electrónico de barrido

La exotesta a nivel del rafe está constituida por células más estrechas respecto a las circundantes (Fig. 50 A). Las células escleróticas de la mesotesta presentan punteaduras simples circulares a lineales (Fig. 50 E). La endotesta muestra engrosamientos espiralados de 6,00–10,5 μm (Figs. 49 E, G). Los granos de aleurona de los cotiledones son globosos y con una superficie mayormente granular, de 0,66-1,33 μm (Fig. 50 C).

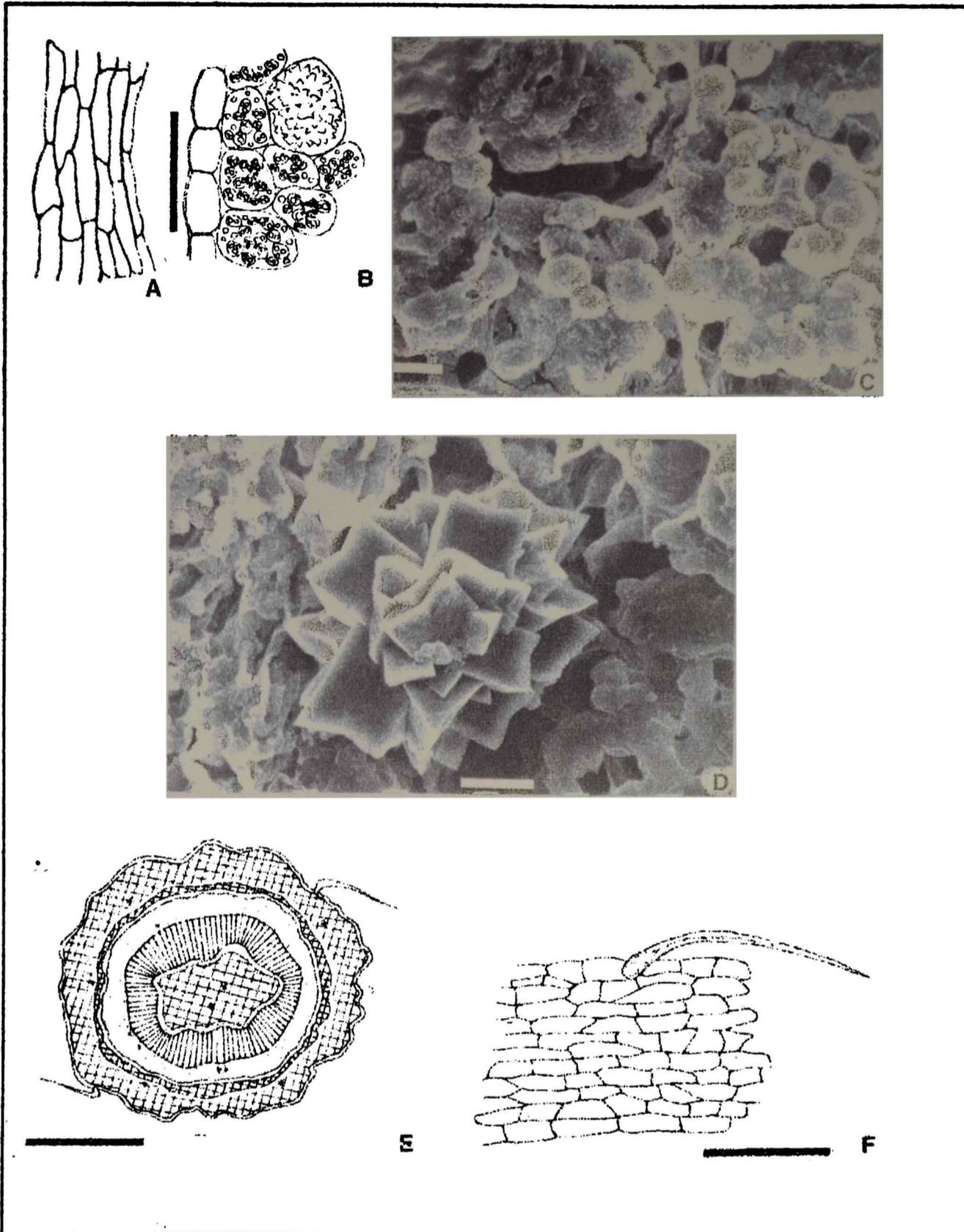
4.1.7.5.1. Reacciones Histoquímicas

La reacción de taninos dio positiva en cubiertas seminales. También se detectaron lípidos (gotas de aceite) en la exotesta y cotiledones, así como aleurona (con 1-2 globoides y 1-3 cristaloides) en estos últimos (Fig. 50 B), donde el almidón secundario resultó ser muy escaso.



Tamaño de la escala: 10 μm (G); 50 μm (D, F); 100 μm (B, C,E); 1000 μm (A).

Figura 49. Semilla (A: fotomicrografía con MEB de un sector de la semilla con rafe central; B: semilla en corte transversal con cotiledones de vernación convoluta; C: exotesta en vista superficial; D: células escleróticas de la mesotesta en vista superficial; E: fotomicrografía con MEB de células escleróticas en corte tangencial y células traqueidales de la endotesta (flecha); F: célula traqueidal de la endotesta; G: fotomicrografía con MEB de células traqueidales de la endotesta.



Tamaño de la escala: 10 μm (C,D); 50 μm (A, B); 100 μm (F); 500 μm (E).

Figura 50. Semilla (A: endotegmen en vista superficial; B: cotiledones en corte transversal; C, D: fotomicrografía con MEB, C: aleurona de los cotiledones, D: drusa de los cotiledones). E, F: Pedúnculo del fruto (E: corte transversal; F: vista superficial de la epidermis).

4.1.7.6. *Análisis estructural del tallo secundario y corteza* (fig. 51 A-G)

4.1.7.6.1. *Corteza*

El súber se presenta estratificado, formado por numerosas capas celulares, pero la felodermis está compuesta por sólo 1-2 capas celulares. El líber duro está formado por fibras no septadas, dispuestas en bandas tangenciales, que alternan con el líber blando constituido por tubos cribosos y células parenquimáticas. Estas últimas contienen drusas de oxalato de calcio de 13,30(19,00)27,00 μm , $M_o = 16,50 \mu\text{m}$, $s = 1,15$. Los radios floemáticos son uniseriados, de 76,50(160,00)243,00 μm , $M_o = 106,50\mu\text{m}$, $s = 14,18$ de altura, algunos con crecimiento de dilatación conteniendo drusas de oxalato de calcio de 33,33(45,00)66,60 μm , $M_o = 33,30 \mu\text{m}$, $s = 3,22$.

4.1.7.6.2. *Leño*

Los anillos de crecimiento están poco marcados, debido a que a nivel del límite entre las paredes de las fibras medianamente engrosadas del leño temprano y las paredes más gruesas en el leño tardío se forma una banda continua. La porosidad es difusa y no se observa ninguna disposición especial de los vasos. Los vasos son mayormente solitarios y múltiples, cortos y largos, de contorno circular u oval, con placa de perforación simple. El índice de agrupamiento de vasos es de 1,15(1,45)1,75, $M_o = 1,55\mu$, 170,50, $s = 7,68$. Los elementos de los vasos presentan tabiques oblicuos a muy oblicuos, de diámetro tangencial del lumen 20,00(44,00)73,25 μm , $M_o = 43,30 \mu\text{m}$, $s = 3,99$; la longitud del elemento de vaso es de 195,00(340)470,00 μm , $M_o = 377,00 \mu\text{m}$, $s = 5,55$ y el número de vasos/ mm^2 es de 24,70(33,20)41,50, $M_o = 37,00$, $s = 9,03$. Se observan puntuaciones intervasculares areoladas, ornadas y alternas (Fig. 51 A). El parénquima axial paratraqueal es confluyente, con puntuaciones simples y granos de almidón, con algunas células conteniendo cristales alargados tipo prismáticos de oxalato de calcio. El parénquima radial presenta células cuadradas y procumbentes, con puntuaciones simples (Fig. 51 B), dando radios de tipo

heterogéneo, uniseriados, la altura de los radios es de 50,00(182,50)450,00 μm , $M_o = 156,50, 220,00, 286,00 \mu\text{m}$, $s = 25.61$; el número de radios/mm es de 11.60(13.70)20.30, $M_o = 11.60$, $s = 0.89$. Se observan fibras de pared gruesa, con puntuaciones simples y escasas, de longitud 545,00(845,00)1095,00 μm , $M_o = 936,00 \mu\text{m}$, $s = 10,50$. La estructura es no estratificada. Pueden verse canales intercelulares longitudinales de tipo traumático con contenido sólido, granular y amarillo, presentes en círculos concéntricos.

Microscopio electrónico de barrido

Se aprecian puntuaciones intervasculares alternas y ornadas, con la cavidad areolar cubierta con proyecciones de la pared secundaria (Fig. 51 E,F).

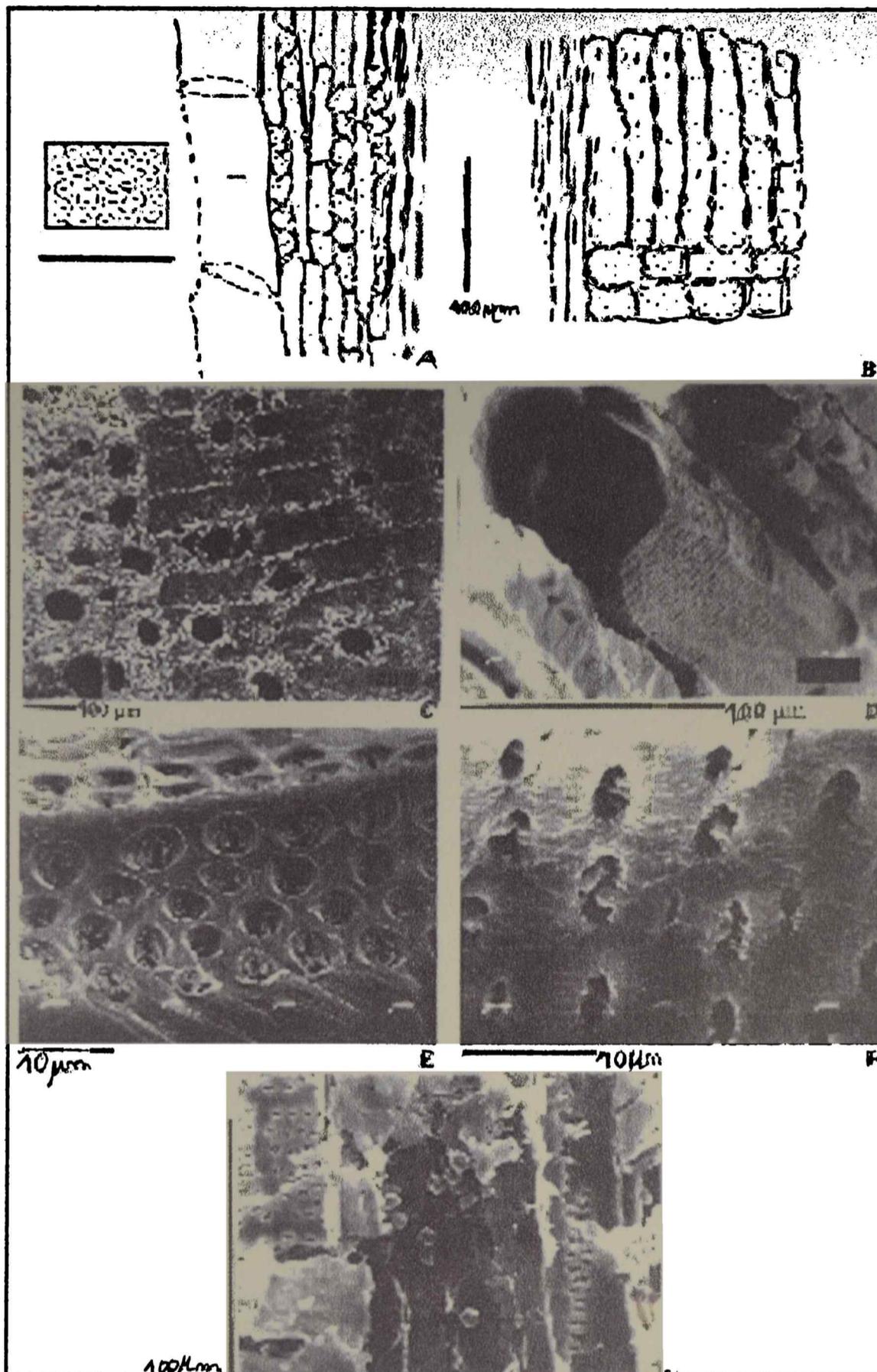


Figura 51. *T. australis* A-G: Leño del tallo secundario. A,B: Diseño del leño(A: corte longitudinal tangencial; B: corte longitudinal radial). C-G: Fotomicrografías con MEB (C: corte transverso; D: elemento de vaso con placa de perforación simple; E, F: detalle de la vista externa e interna de las puntuaciones ornadas alternas respectivamente; G: parénquima axial con granos de almidón).

4.1.7.6.3. Reacciones histoquímicas

A continuación se consignan los resultados obtenidos para los distintos ensayos histoquímicos realizados.

1. Taninos y alcaloides positivo a nivel de los parénquimas axial y radial.
2. Test de quemado de astillas: las astillas muestran cierta renuencia a quemarse, lo hacen parcialmente a cenizas, de color grisáceo.
3. Test de Froth: negativo.
4. Fluorescencia del duramen: negativa.
5. Fluorescencia del extracto acuoso: negativa.
6. Color del extracto acuoso: amarillo.
7. Fluorescencia del extracto etanólico: negativa.
8. Color del extracto etanólico: amarillo pálido.
9. Contenido de los canales intercelulares longitudinales: con ferricianuro potásico no se tiñe de color verde esmeralda azulado, con ácido nítrico-ácido acético el contenido no se deposita formando un esmalte blanco, con ácido clorhídrico no adquiere coloración pardusco verdosa oliva, con alcohol etílico-metílico no precipita en forma de gránulos blancos y filamentos sino que se disuelve, con solución saturada de acetato de cobre no se colorea de verde esmeralda y con Lugol no se tiñe.

| | | | |
|-------------|-------------------------------|--|---|
| HOJA | Drusas | Mesófilo Colénquima Líber | 23,30(38,50)56,60 μm , Mo = 50,00 μm 23,30(30,70)43,30 μm , Mo = 26,60 μm 6,60(8,40)13,40 μm , Mo = 6,70 μm |
| | Número de capas de parénquima | Empalizada 1 Lagunoso 4(5)5, Mo = 5 | |
| | Índice de estomas | 10,50(15,60)21,00, Mo=16,00 | |
| | Índice de empalizada | 5,00(11,00)13,00, Mo=6,00 | |

Tabla 2. Parámetros micrográficos cuantitativos de hoja para la identificación de *Terminalia australis*.

| | | | |
|---------------------------|--------------------|---|--|
| TALLO PRIMARIO | Drusas | Cortex | 16,50(27,00)43,30 μm , Mo = 26,60 μm |
| | | Liber | 3,30(6,70)10,00 μm , Mo = 6,70 μm |
| | | Leño | 10,00(19,80)33,30 μm , Mo = 20,00 μm |
| | Cristales simples | | 16,60(27,70)40,00 μm , Mo = 23,30 μm |
| Leño | Elementos de vasos | 230,00(320,00)515,00 μm , Mo = 233,00, 333,00 μm | |
| | Fibras | 400,00(695,00)975,00 μm , Mo = 880,00 μm | |

Tabla 3. Parámetros micrográficos cuantitativos de tallo primario para la identificación de *Terminalia australis*.

| | | | |
|----------------------|--------|------------------|---|
| FLOR | Drusas | Hipanto | 6.50(13.60)30.00 μm , Mo = 10.00 μm |
| | | Disco glandular | 20.00(20.80)26.65 μm , Mo = 20.00 μm |
| | | Gineceo | Estilo 6.50(14.00)30.00 μm , Mo = 16.65 μm |
| | | Sépalos | Ovario 3.30(6.40)10.00 μm , Mo = 6.50 μm 6.50(13.50)23.50 μm , Mo = 13.00 μm |
| | | Anteras | subepidérmicos 5.00(8.00)10.00 μm , Mo = 6.50 μm , entre sacos polen 13.30(16.00)23.30 μm , Mo = 16.60 μm |
| | Polen | Diámetros | Polar: 13.60(17.00)20.50 μm , Mo = 16.30 μm Ecuatorial: 11.00(14.00)16.30 μm , Mo = 15.00 μm Ora 1.90(2.50)3.00 μm , Mo = 2.70 μm x 4.00(4.60)5.50 μm , Mo = 4.00 μm |
| | | Espesor de exina | 1,40 μm |
| Número de óvulos | | 2 | |
| Número de tegumentos | | 2 | |

Tabla 4. Parámetros micrográficos cuantitativos de flor para la identificación de *Terminalia australis*

| | | | |
|--------------|----------------------------|------------|--|
| FRUTO | Drusas | Endocarpio | 26,60(34,00)43,00 μm , Mo = 36,60 |
| | | Pedúnculo | Córtex 20,00(28,50)40,00 μm , Mo = 26,50 μm Líber 3,30(5,00)6,70 μm , Mo = 5,00 μm Médula 13,30(19,00)23,30 μm , Mo = 20,00 μm |
| | Cristales simples | | 13,30(19,00)30,00, Mo = 16,60 μm |
| | Longitud fibras endocarpio | | 203,00(397,00)860.00 μm , Mo = 312,00,468.00 μm |
| | Número haces vasculares | | 5 |

Tabla 5. Parámetros micrográficos cuantitativos de fruto para la identificación de *Terminalia australis*

| | | | |
|----------------|--|-------------|---|
| SEMILLA | Drusas | Cotiledones | 23,30(37,00)47,00, Mo = 36.60 μm |
| | Número de capas de cubiertas seminales | Exotesta | 1 |
| | | Mesotesta | 1 |
| | | Endotesta | 1 |
| | | Exotegmen | 1 |
| | | Endotegmen | 2-3 |

Tabla 6. Parámetros micrográficos cuantitativos de semilla para la identificación de *Terminalia australis*

| | | | |
|------------------|---------|---|--|
| TALLO SECUNDARIO | Corteza | Drusas Radios Floemáticos | Parénquima: 13,30(19,00)27,00 μ m, Mo=16,50 μ m Radios dilatados: 33,33(45,00)66,60 μ m, Mo=33,30 μ m Altura 76,50(160,00)243,00, Mo=106,50 μ m |
| | Leño | Índice agrup. vasos Elementos de vaso Parénquima radial | 1,15(1,45)1,75, Mo=1,55, 170,50 Diámetro lumen: 20,00(44,00)73,25 μ m, Mo=43,30 μ m Longitud: 195,00(340,00)470,0 μ m, Mo=377,00 μ m N° de vasos/mm ² : 24,70(33,20)41,50, Mo=37,00 μ m Altura radios: 50.00(182.50)450.00 μ m, Mo= 156.50, 220.00, 286.00 μ m N° radios/mm ² 11.60(13.70)20.30, Mo=11.60 Longitud de fibras 545.00(845.00)1095.00 μ m, Mo= 936.00 μ m |

Tabla 7. Parámetros micrográficos cuantitativos de tallo secundario para la identificación de *Terminalia australis*

Los caracteres cualitativos de los órganos aéreos de valor diagnóstico que permiten caracterizar a la droga, con MO, se consignan a continuación.

HOJA

- Estomas anomocíticos en la epidermis adaxial.
- Tricomas “combretáceos” en ambas epidermis.
- Mesófilo de estructura dorsiventral.
- Drusas de oxalato de calcio en el mesófilo y el liber.
- Estructura vascular de la nervadura principal: haz colateral en forma de herradura, rodeado por una vaina esclerenquimática. Nudo unilacunar.
- Presencia de taninos y alcaloides

TALLO

-Estructura Primaria

- Tricomas “combretáceos” en la epidermis.
- Estomas anomocíticos en la epidermis.
- Drusas de oxalato de calcio en el cortex primario, el floema externo (en hileras tangenciales) y la médula.

- Estructura vascular: euestela de haces bicolaterales.
- Periciclo constituido por cordones de fibras esclerenquimáticas y parénquima.
- Elementos de vaso con placa de perforación simple y engrosamientos anillados, espiralados, escalariformes y areolados –
- Elementos de vaso areolados con puntuaciones ornadas y alternas.
- Parénquima axial con cristales simples, prismáticos, de oxalato de calcio.
- Presencia de taninos y alcaloides.

-Estructura secundaria

- Presencia de drusas de oxalato de calcio en el parénquima axial del liber.
- Radios floemáticos uniseriados
- Liber duro formado por fibras no septadas, dispuestas en bandas tangenciales.
- Estructura no estratificada.
- Porosidad difusa.
- Placa de perforación simple.
- Puntuaciones intervasculares areoladas, ornadas y alternas.
- Número de bandas del parénquima axial
- Parénquima axial con cristales alargados prismáticos, de oxalato de calcio.
- Radios leñosos uniseriados y heterogéneos.
- Presencia de taninos y alcaloides.

FLOR

- Tricomas “combretáceos” en la cara externa del hipanto inferior, ambas caras del hipanto superior, ambas caras de los sépalos, el tercio basal del estilo y muy escasos en el disco glandular.
- Estomas anomocíticos en la epidermis externa del hipanto, en la epidermis externa de los sépalos y en el disco glandular.
- Drusas de oxalato de calcio en las anteras, el gineceo, el hipanto, los sépalos y el disco glandular.
- Ovulos crasinucelados con funículo largo.
- Polen isopolar.
- Forma del polen: subprolato a esferoidal.
- Amb del polen lobado.

- Heterocolpados. Os circulares a lalongados.
- Exina tectada.
- Presencia de taninos.

FRUTO

- Estructura vascular del pedúnculo: eustela de haces bicolaterales.
- Periciclo constituido por una vaina colenquimática y un parénquima interno.
- Drusas de oxalato de calcio en el cortex , floema externo y médula del pedúnculo.
- Tricomas "combretáceos" en la epidermis del pedúnculo y el epicarpio.
- Estomas anomocíticos en el epicarpio.
- Mesocarpio parenquimático.
- Endocarpio esclerenquimático (esclereidas y fibras).
- Drusas de oxalato de calcio en el endocarpio.
- Cristales prismáticos de oxalato de calcio en fibras del endocarpio.
- Presencia de taninos.

SEMILLA

- Exotesta amarillo pálido, de paredes celulósicas, con gotas de aceite; mesotesta castaño-amarillenta, de células escleróticas; endotesta y exotegmen castaño-amarillentos, de células traqueidales, con engrosamientos espiralados y endotegmen amarillo pálido, de células de paredes celulósicas, delgadas, alargadas y aplastadas tangencialmente.
- Cotiledones de vernación convoluta, con gotas de aceite, cuerpos de aleurona y muy escaso almidón secundario.
- Drusas de oxalato de calcio en los cotiledones.
- Presencia de taninos.

Las observaciones de la exo–endomorfolología de *Terminalia australis* concuerda, en parte, con datos aportados por diferentes autores, discrepándose con conceptos que pasaremos a puntualizar.

El fruto de *T. australis* es leñoso y seco, tipo samaroide, y no una drupa como estima Corrêa (1984).

Metcalf y Chalk (1957) mencionan bandas tangenciales de fibras septadas llenas de cristales en varios géneros de *Combretaceae* incluyendo *Terminalia*. Sin embargo en el análisis efectuado no se hallaron fibras septadas y los cristales sólo se presentan en células parenquimáticas. Similares características fueron encontradas por Roth (1969) para *Terminalia guayanensis* Eichler y *Terminalia amazonia* (Gmel.)Exell.

El tallo primario de *T. australis* con haces vasculares bicolaterales, el periciclo formado por fibras de esclerénquima y parénquima y la presencia de drusas parecen ser caracteres compartidos por los miembros de las *Combretaceae*, según las descripciones de Metcalf y Chalk (1957) Verhoeven y Van der Schijff (1975).

En un estudio que incluyó 37 especies de *Terminalia*, Van Vliet (1978) estableció la presencia de punteaduras ornadas tipo B con las formas 2, 3 e intermedias entre ambas. El análisis con MEB de las punteaduras de *T. australis* permite precisar que son intermedias entre las formas 2 y 3. Acerca del valor diagnóstico de este carácter, Van Vliet (1979) lo ha considerado dudoso, con la salvedad de ser el único género de *Combretaceae* que presenta tal variación.

Van Vliet (1979) y Chattaway (1955) mencionan que los cristales del leño de *Terminalia* pueden presentarse en el parénquima axial o radial. Tortorelli (1956) menciona cristales en el parénquima radial y el tejido fibroso del leño de *T. australis*. En cambio en el material analizado fueron observados solamente en el parénquima axial.

El contenido de los canales intercelulares de tipo traumático es sólido y presenta aspecto granular y apariencia gomosa y en la bibliografía (Van Vliet, 1979; Record, 1936) se considera que son gomas. Heiden (en Metcalf y Chalk, 1957) habla de "espacios secretores", con contenidos amarillos que dan positiva la reacción de mucilagos, en ramas gruesas de *Terminalia bellerica* Roxb. y *Terminalia macroptera* Mart. Asimismo en la familia distintos autores (Bruneton, 1991; Howes, 1949; Mantell, 1947; Perrot ,1943/44, Van Vliet, 1979) mencionan la presencia de gomas, siendo la de mayor importancia comercial la goma "ghatti" o "gatty", que es el exudado amorfo de *Anogeissus latifolia* Wallich.

Scala (1912) menciona distintas reacciones histoquímicas (ferricianuro potásico, ácido nítrico-ácido acético, ácido clorhídrico, alcohol etílico-metílico) para lograr identificar diferentes gomas de *Acacia* y *Prunus*. Sin embargo,

dichas reacciones histoquímicas practicadas indican la ausencia de gomas, resinas (solución saturada de acetato de cobre) y almidón. Este último polisacárido está presente en algunas gomas, tales como la goma tragacanto (Evans 1991).

Respecto al contenido de los vasos de *Terminalia*, Van Vliet (1979) menciona que puede ser sólido amorfo o granular, aunque no indica su composición química. Metcalfe y Chalk (1957) consideran que en *Terminalia* las tilosis son abundantes y que los depósitos de goma comunes y algunas veces abundantes.

En relación a los taninos hallados en las *Combretaceae* distintos autores (Dahlgren y Thorne, 1984; Fernández Fernández y Crespo Irizar, 1999) establecen la presencia de taninos hidrolizables y condensados. Fernández Fernández y Crespo Irizar (1999) consideran que los taninos hidrolizables con sales férricas dan coloraciones y precipitados azul-negrusco y que los taninos condensados dan precipitados pardo-verdosos. Como resultado de las reacciones histoquímicas practicadas en órganos aéreos de *Terminalia australis* en el presente trabajo pareciera que se hallan taninos hidrolizables dentro de las vacuolas de los distintos tipos celulares.

A diferencia del quemado de astillas de *Terminalia catappa* (IAWA 1989) la especie en estudio no muestra chispas brillantes.

Finalmente, la obtención de valores numéricos de esta especie mediante la microscopía analítica cuantitativa permitió aportar magnitudes numéricas proporcionales que resultaron originales e inéditas.

4.2. ENSAYOS BIOLÓGICOS

La búsqueda de sustancias farmacológicamente activas es un objetivo permanente de la ciencia. El reino vegetal es una fuente inagotable de nuevas estructuras, por lo que se llevan a cabo cotidianamente investigaciones especializadas, con baterías de ensayos tendientes a probar extractos de plantas de todo el mundo, en búsqueda de sustancias que permitan combatir determinadas enfermedades.

La búsqueda de sustancias con actividad antifúngica representa una de ellas. En las últimas décadas se han producido cambios sustanciales en el mundo de la Micología médica (Dignani, MC *et al*, 2003). Los avances diagnósticos, quirúrgicos y farmacológicos iniciados a finales de los años 1960 revolucionaron la Medicina moderna, ya que empezaron a tratarse con éxito enfermedades que habían sido tradicionalmente incurables. La contraparte de ello fue el aumento de las complicaciones iatrogénicas, entre las que se cuentan las infecciones oportunistas. Microorganismos saprófitos o ambientales de escasa virulencia, como *Candida spp.* y *Aspergillus spp.*, se convirtieron en patógenos que podían causar cuadros infecciosos mortales (Steinbach *et al.*, 2004). Este aumento de prevalencia de las micosis hizo necesario desarrollar fármacos con los que poder tratar estas infecciones. Los polienos, la fluorocitosina y los imidazoles empezaron a utilizarse con frecuencia en muchos grupos de enfermos y con el desarrollo de los triazoles (fluconazol e itraconazol), se inició el uso masivo de la profilaxis antifúngica y de la terapia empírica (Aller, A. I., *et al.* 2000).

Estas prácticas terapéuticas han generado cambios epidemiológicos, entre los que destacan la aparición de cepas que han desarrollado resistencia secundaria a los antifúngicos y la sustitución de algunas especies sensibles por otras con resistencia intrínseca. De esta manera es como se vuelve a la búsqueda en los productos naturales de principios activos con actividad antifúngica.

La actividad antimicrobiana de especies de la familia Combretaceae quedó demostrada en varios trabajos a través de la presencia en muchas de sus especies de sustancias con actividad antibacteriana y antifúngica (Bassene *et al.*, 1995; Martini *et al.*, 1998; Elegami *et al.*, 2002; Batawila *et al.*, 2005).

Del género *Terminalia* han sido estudiadas varias especies que también han demostrado actividad antimicrobiana: *T. catappa* (Bushnell *et al.* 1950); *T. alata* (Taylor *et al.*, 1996), *T. macroptera* (Silva *et al.*, 1997,2002); *T. complanata* (Khan *et al.*, 2002) y *T. bellerica* y *T. chebula* (Arora *et al.* 2003).

En nuestro país Martino *et al.* (2004) trabajaron con extractos acuosos de hojas de *Terminalia triflora*, especie afín a la planta en estudio, encontrando que posee compuestos que inhiben el desarrollo del HIV.

En cuanto a *Terminalia australis*, esta especie ha sido descripta sólo en trabajos florísticos de Argentina (Cabrera y Dawson, 1944; Exell, 1939; Fabris, 1965; Guaglianone 1999a, 1999b; Lahitte y Hurrell, 1997b; Leonardis, 1976), Brasil (Exell y Reitz, 1964) y Uruguay (Lombardo, 1964; Muñoz *et al.*, 1993) pero .no se ha encontrado en la bibliografía trabajos sobre estudios en busca de alguna actividad biológica, a excepción de los de Escalante y Carpano (1977) y de Carpano *et al.* (2004).

4.2.1. ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO*

4.2.1.1. Método de difusión en medio sólido para levaduras y hongos filamentosos productores de conidias.

Los resultados observados enfrentando extractos acuosos, metanólicos y de diclorometano obtenidos a partir de la recolección de partes aéreas de *Terminalia australis* con cepas de colección de *Candida albicans*, *C. krusei*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus* y *A. flavus* están representados en los Gráficos 1 a 7.

Gráfico 1: Extractos acuosos frente a *Candida albicans*

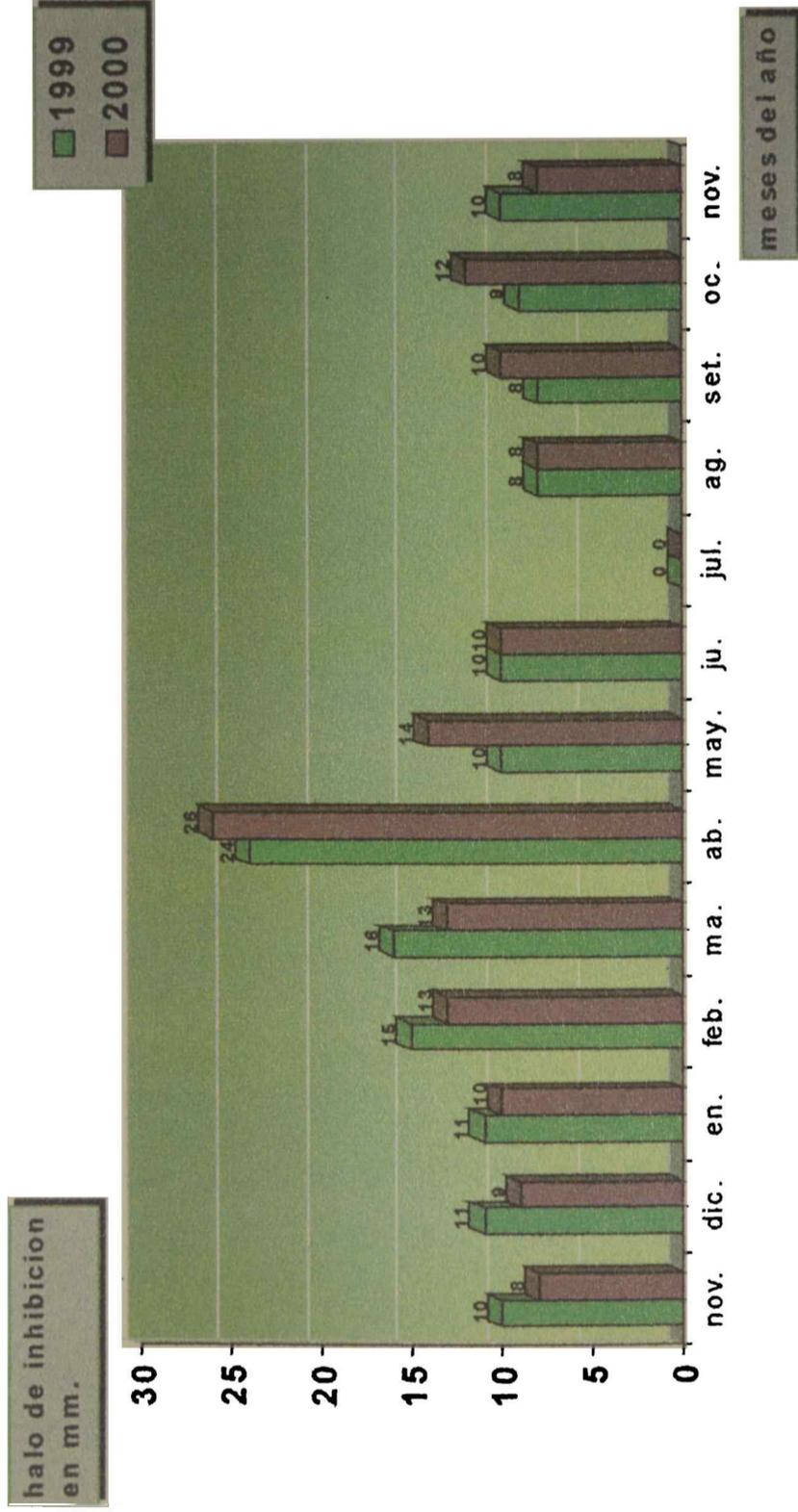


Gráfico 2: Extractos metanólico frente a *Candida albicans*

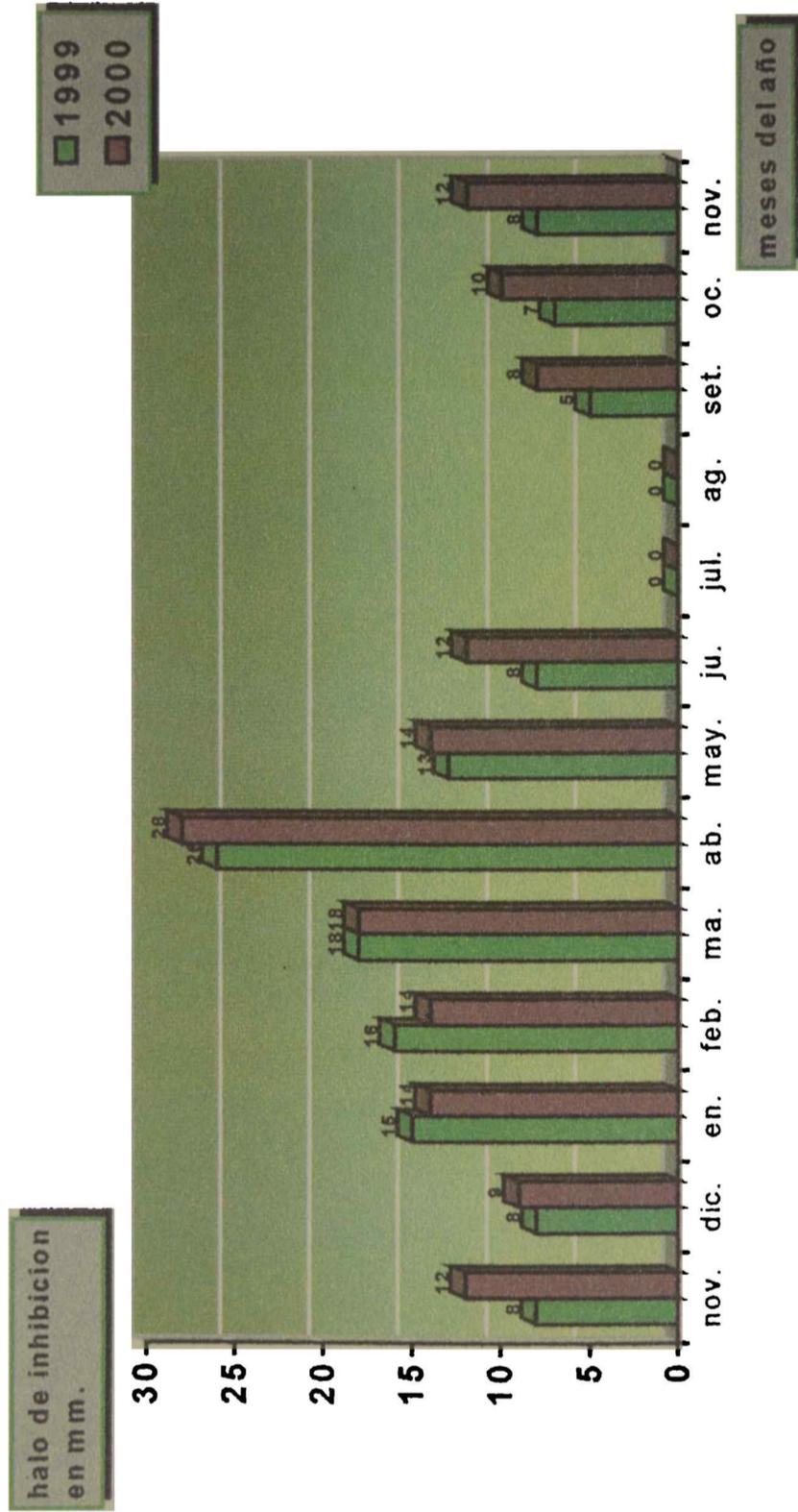
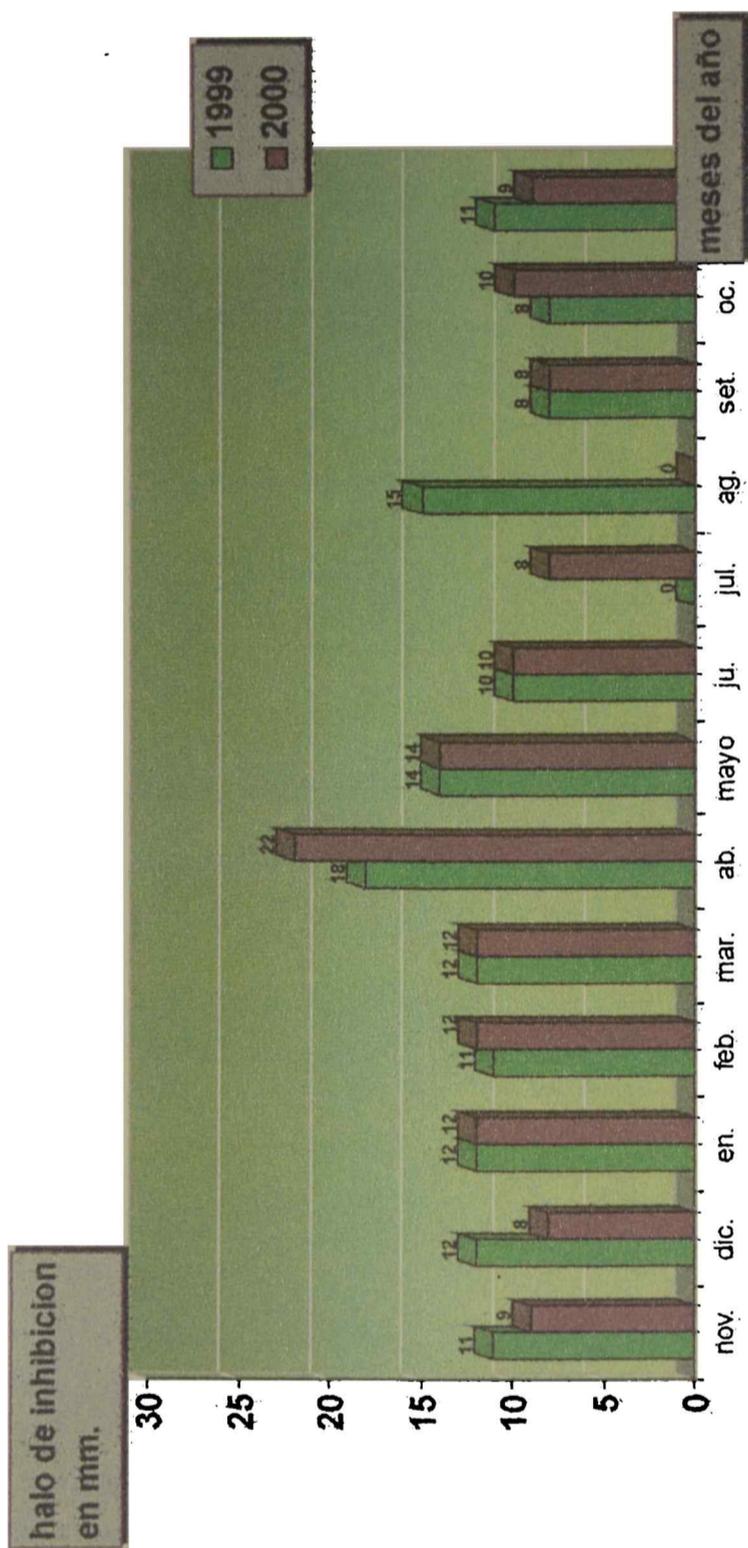
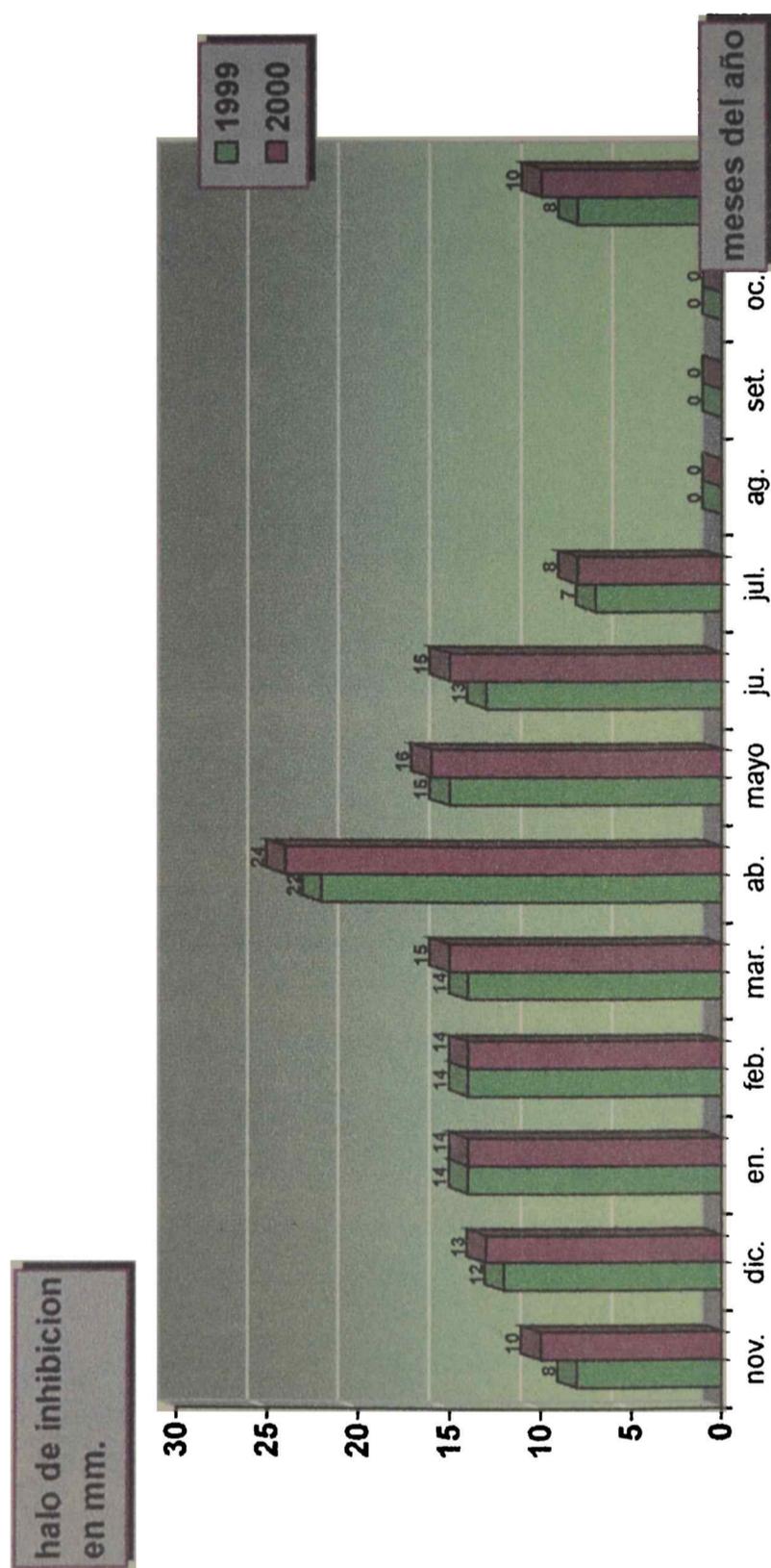


Gráfico 3 : Extractos acuosos frente a cultivos de *Candida krusei*



Resultados y Discusión

Gráfico 4 : Extractos metanólicos frente a cultivos de *Candida krusei*



Resultados y Discusión

Gráfico 5 : Extractos acuosos frente a cultivos de *Aspergillus fumigatus*

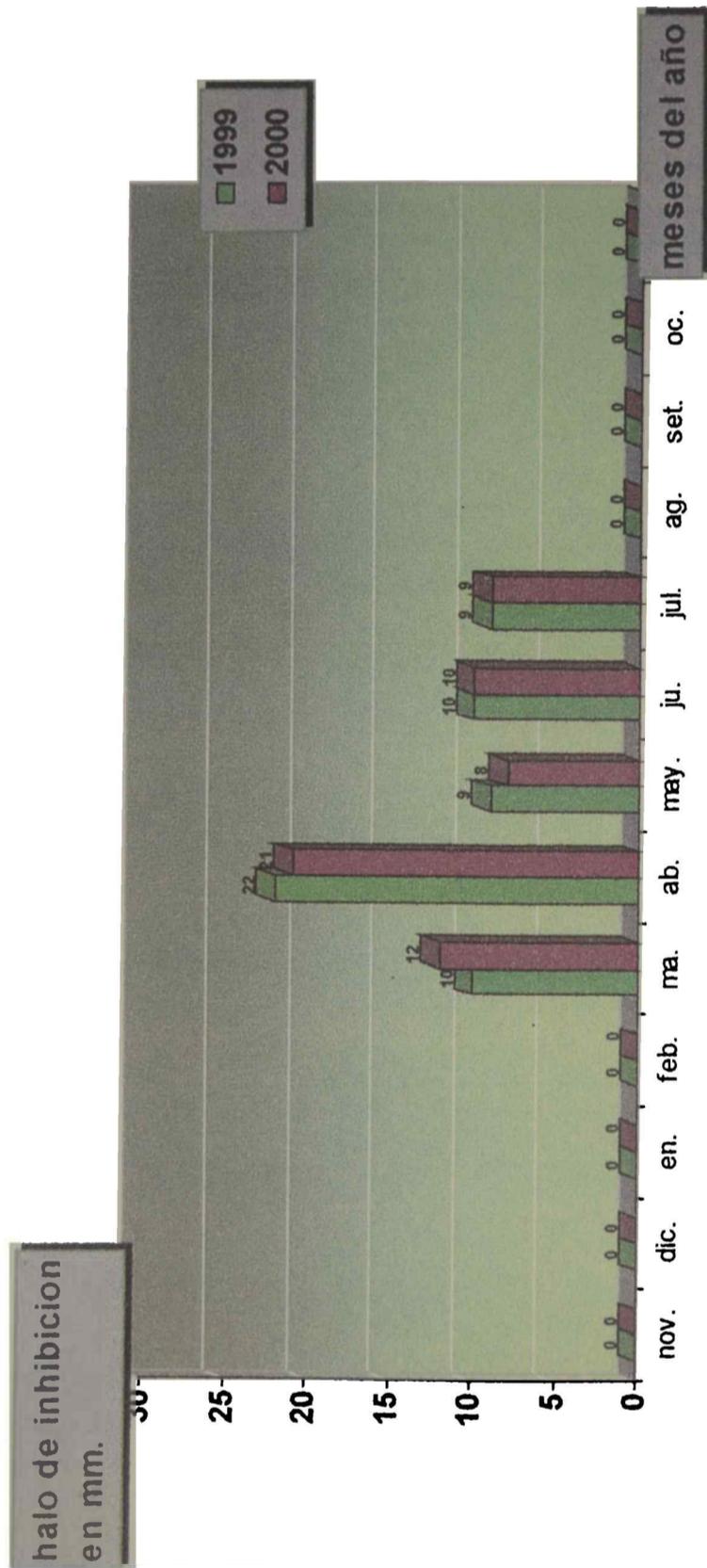
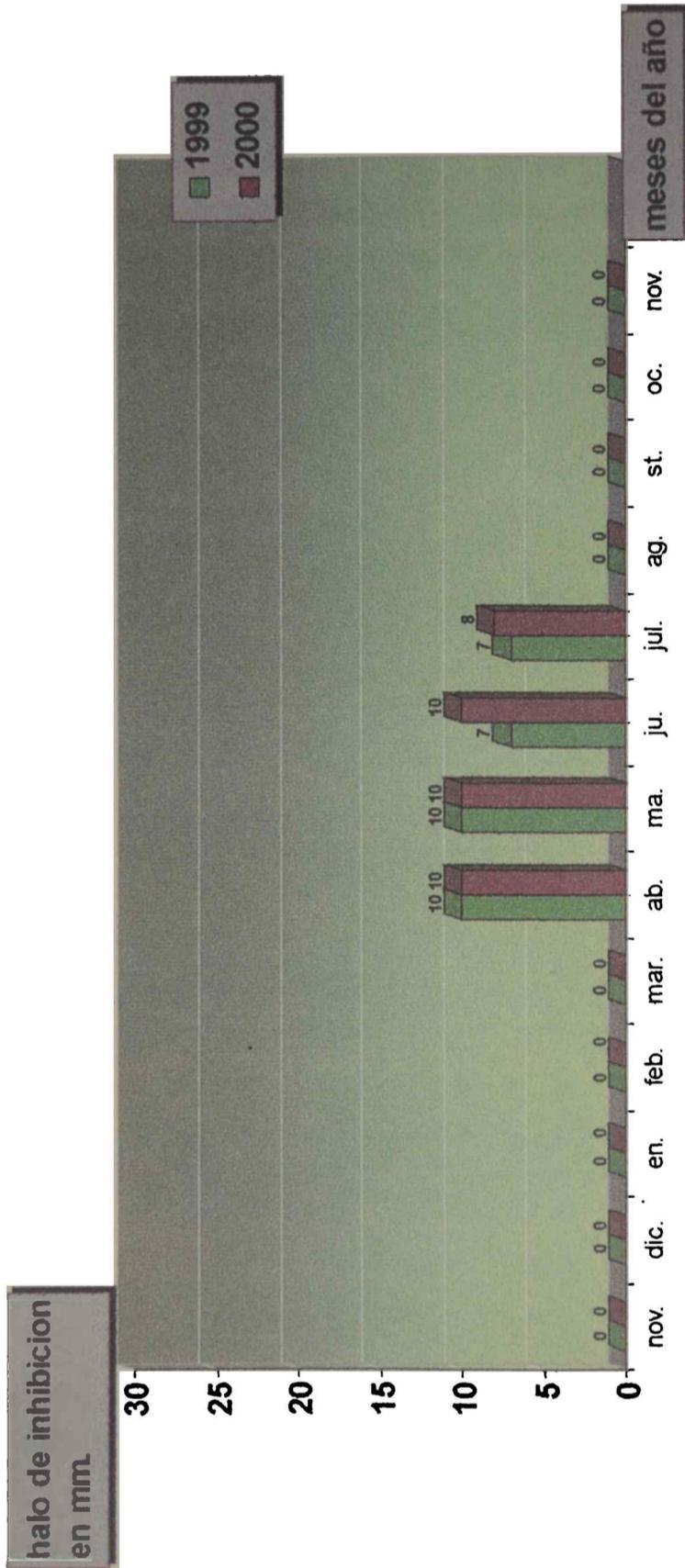
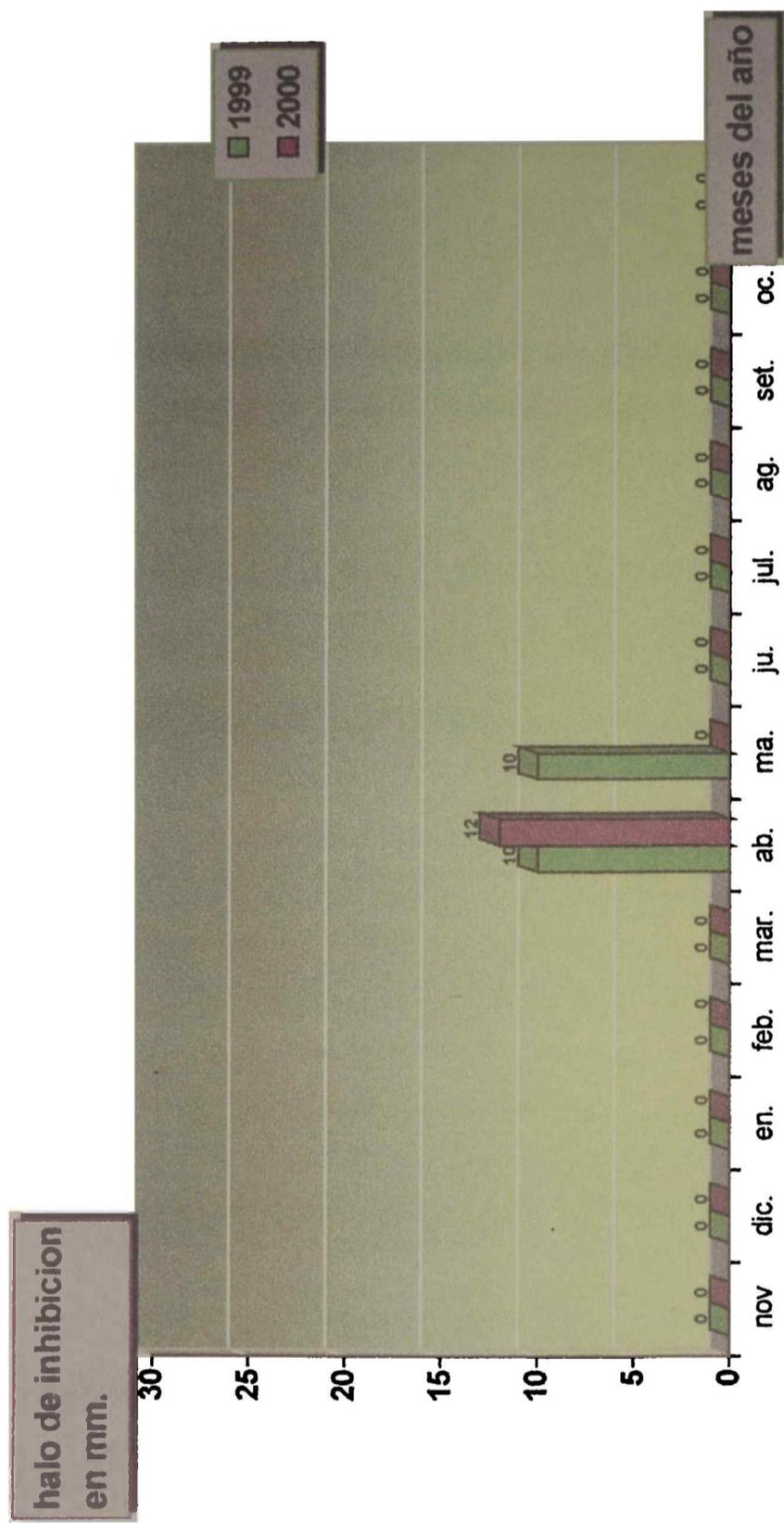


Gráfico 6 : Extractos metanólicos frente a cultivos de *Aspergillus fumigatus*



Resultados y Discusión

Gráfico 7 : Extractos acuosos frente a cultivos de *Aspergillus flavus*



Resultados y Discusión

| Cepas | Fluconazol | Anfotericina B |
|------------------------------|------------|----------------|
| <i>Candida albicans</i> | 20 | - |
| <i>Candida krusei</i> | 15 | - |
| <i>Aspergillus niger</i> | - | 18 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | - | 16 |
| <i>Aspergillus flavus</i> | - | 10 |

Tabla 8. controles positivos halos de inhibición en mm.

Los extractos acuosos de *Terminalia australis* obtenidos a partir de material recolectado desde noviembre del año 1998 al mismo mes del año 2000 (cfr. 3.2.1.1.) han demostrado frente a *Candida albicans* actividad antifúngica en aumento desde noviembre hasta abril, que es cuando se producen los picos de mayor efecto inhibitorio, 24 mm de halo de inhibición y 26 mm, respectivamente, para cada año. A partir de éste último mes la actividad comienza una progresiva disminución llegando a la inactividad total en el mes de julio. En agosto se produce un lento aumento de la actividad, alcanzando el máximo en abril de año siguiente. En el estudio comparativo de los dos ciclos biológicos consecutivos se observan mínimas diferencias de acción inhibitoria. Los extractos metanólicos enfrentados a la misma cepa fúngica demostraron similar acción, alcanzando su pico máximo en el mes de abril de 2000 con un halo de inhibición de 28 mm y de 26 mm en el mismo mes de 1999. La ausencia de halo inhibitorio se detectó en los extractos obtenidos del material recolectado en julio y agosto en ambos años. Los extractos de diclorometano no mostraron actividad en los dos períodos ensayados.

En el caso de las pruebas efectuadas frente a *Candida krusei* el comportamiento del extracto acuoso también presentó actividad inhibitoria máxima en el mes de abril (18 mm de halo de inhibición en el año 1999 y 22 mm en el 2000). La inactividad se observó en julio para el extracto realizado en 1999 y en agosto para el obtenido en 2000. Los extractos correspondientes al resto de

los meses mostraron similar actividad. Los extractos metanólicos mostraron acción antifúngica muy semejante, encontrando en el mes de abril sus máximos valores (22 mm de halo inhibitorio para 1999 y 24 mm para 2000). Los extractos obtenidos con diclorometano no presentaron actividad antifúngica.

Los antifungigramas obtenidos enfrentando extractos acuosos de *Terminalia australis* con *Aspergillus fumigatus* mostraron, al igual que los anteriores, un aumento significativo de la actividad inhibitoria de la cepa en abril (22 mm de halo en 1999 y 21 mm en 2000). La falta de inhibición fue total en los meses de noviembre, diciembre, enero, febrero, agosto, setiembre, octubre y noviembre, comenzando lentamente a aumentar en marzo hasta llegar a los valores máximos ya mencionados. Este comportamiento se repitió durante los dos años de prueba. Los extractos metanólicos han demostrado diferencias importantes con los descritos para los acuosos, ya que se ha observado el máximo de inhibición en los meses de abril y mayo para el año 1999 y en abril, mayo y junio para el año 2000. La inactividad fue total en los meses de noviembre, diciembre, enero, febrero, marzo, agosto, setiembre y octubre durante los dos ciclos. En cuanto a la disminución de la acción antifúngica en el año 1999 comienza en junio y en el 2000 en el mes de julio. Los extractos de diclorometano demostraron no poseer actividad en ningún mes de los dos ciclos biológicos.

Los extractos acuosos ensayados frente a *Aspergillus flavus* demostraron poseer acción inhibitoria solamente con un pico de 8 mm de halo en abril del año 1999. Los extractos metanólicos mostraron un halo de 10 mm durante los meses de abril y mayo del año 1999 y de 12 mm en los mismos meses del año 2000. La inactividad se registró en noviembre, diciembre, enero, febrero, marzo, junio, julio, agosto, setiembre y octubre de 1999. A los meses citados anteriormente se agrega mayo para el año 2000. Los extractos de diclorometano no tuvieron efectos inhibitorios en ninguna de las pruebas realizadas en los dos años.

Los extractos acuosos, metanólicos y de diclorometano no han demostrado poseer actividad inhibitoria frente a la cepa de *Aspergillus niger* ensayada en ninguna de la muestras testeadas.

Como antifúngicos de referencia se utilizaron el fluconazol y la Anfotericina B. Los valores obtenidos para el fluconazol fueron de 20 mm de halo de inhibición frente a *Candida albicans* y de 15 mm frente a *C. krusei*. Los halos observados para Anfotericina B frente a *Aspergillus niger*, *A. fumigatus* y *A. flavus* fueron de 18 mm, 16 mm y 10 mm, respectivamente.

4.2.1.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de levaduras y hongos filamentosos formadores de conidias por el método de dilución en agar en $\mu\text{g/ml}$

Los resultados obtenidos en la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria en los periodos de mayor actividad antifúngica (cfr.4.2.1.1.) se presentan en las Tablas 9, 10 y 11 .En la Tabla 12 la CMI de los controles

| Cepas | Extracto acuoso | Extracto metanólico |
|------------------------------|-----------------|---------------------|
| <i>Candida albicans</i> | < 250 | 250 |
| <i>Candida krusei</i> | 250 | >250 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 250 | 500 |
| <i>Aspergillus flavus</i> | 1000 | - |

Tabla 9 :Concentraciones Mínimas Inhibitorias del mes de abril de los años 1999 y 2000

| Cepas | Extracto acuoso | Extracto metanólico |
|------------------------------|-----------------|---------------------|
| <i>Candida albicans</i> | < 1000 | 1000 |
| <i>Candida krusei</i> | 1000 | 1000 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | - | - |
| <i>Aspergillus flavus</i> | - | - |

Tabla 10:Concentraciones Mínimas Inhibitorias de enero, febrero y marzo de los años 1999 y 2000

| Cepas | Extracto acuoso | Extracto metanólico |
|------------------------------|-----------------|---------------------|
| <i>Candida albicans</i> | >1000 | >1000 |
| <i>Candida krusei</i> | >1000 | >1000 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | - | - |
| <i>Aspergillus flavus</i> | - | - |

Tabla 11 :Concentraciones Mínimas Inhibitorias($\mu\text{g/ml}$) de mayo de los años 1999 y 2000

| Cepas | Fluconazol | Anfotericina B |
|------------------------------|------------|----------------|
| <i>Candida albicans</i> | 150 | - |
| <i>Candida krusei</i> | 120 | - |
| <i>Aspergillus niger</i> | - | 3 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | - | 1 |
| <i>Aspergillus flavus</i> | - | 3 |

Tabla 12 :Concentraciones Mínimas Inhibitorias($\mu\text{g/ml}$) de los controles positivos

Cuando se ensayan extractos vegetales se consideran activos aquellos con CMI menor ó igual a 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Muschiatti *et al.*, 2005)

4.3. ENRAIZAMIENTO DE ESTACAS

Los resultados obtenidos en el ensayo de enraizamiento de estacas de *Terminalia australis* fueron poco alentadores. Las estacas no presentan una elevada supervivencia: 33% para el testigo y aproximadamente 50% para los tratamientos. El enraizamiento tampoco fue elevado, pero aumentó con la concentración de ANA entre un 33% y 64%.

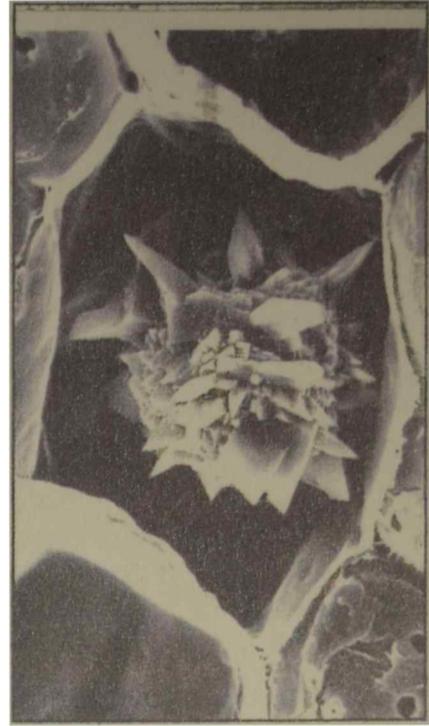
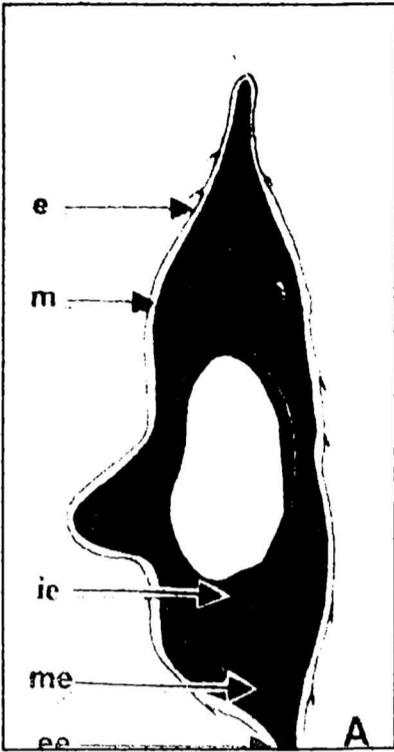
La iniciación de raíces adventicias en las estacas se produjo en todos los casos por encima de la base. El sistema radicular fue bastante pobre en el testigo, constituido generalmente de 1 a 4 raíces de 5 cm de longitud promedio, con escasas raicillas, aunque un ejemplar presentó raíces ramificadas con una longitud promedio de 12 cm.

La Tabla 13 muestra los resultados obtenidos. El grado de enraizamiento, así como el número de raíces producidas, se incrementó significativamente como consecuencia del tratamiento con el regulador de crecimiento ensayado, aún cuando no parece ejercer ningún efecto sobre la longitud de las mismas. No se observan diferencias al superar las 50 ppm de ANA.

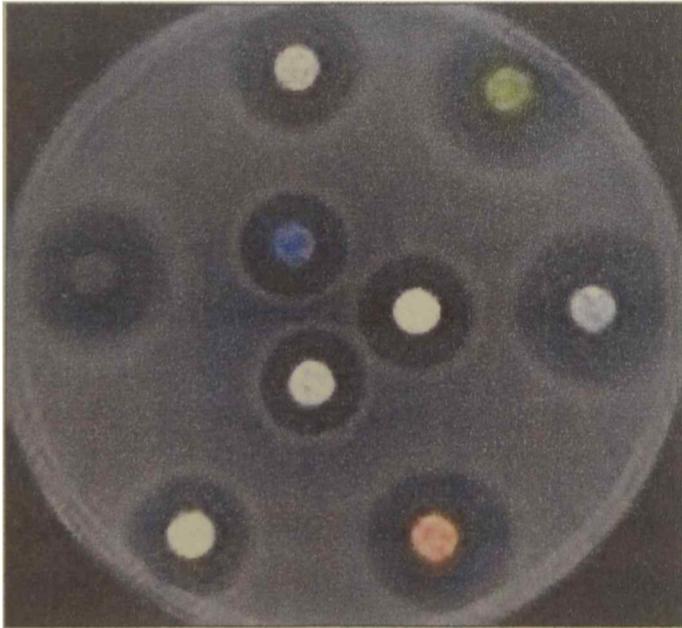
| Concentración de ANA (ppm) | Enraizamiento (%) | Número de raíces (rango) | Longitud de raíces (rango, cm) |
|----------------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 0 | 33,3 | - | - |
| 25 | 48 | 1-7 | 0,7-18 |
| 50 | 60 | 2-15 | 0,5-19,5 |
| 100 | 64 | 1-16 | 0,2-18 |

Tabla 13. Resultado del ensayo de enraizamiento de *Terminalia australis*, instalado el 30/08/00.

Son muchos los factores que afectan la regeneración de plantas por estacas, tales como las condiciones fisiológicas de las plantas madre, el tipo de estaca, la época del año en que se colecta el material y las condiciones ambientales durante el enraizamiento. En estas experiencias preliminares se evaluó solamente el efecto de la concentración de un único factor de regulación de crecimiento (ANA) y los resultados obtenidos permiten alentar expectativas ciertas de propagar vegetativamente mediante estacas enraizadas individuos de *Terminalia australis*. Será necesario diagramar nuevos ensayos que tengan en cuenta diferentes variables para optimizar el proceso de enraizamiento de estacas de la especie en estudio.



CONCLUSIONES



Terminalia australis Cambess. (Combretaceae) es una especie arbórea, menos frecuentemente arbustiva, nativa de Brasil meridional, Paraguay, Uruguay y nordeste de Argentina, hasta el delta del Paraná, ribera platense e Isla Martín García. Sus nombres vulgares en castellano son "palo amarillo", "amarillo", "amarillo del río", "blanquillo" y "tanimbú"; en guaraní "ihvihrá saihdyú"; en portugués "amarilho", "sarandi amarelo" y "amarelinho"; en inglés "bombawy". Sus nombres vulgares se deben al color amarillo-ocráceo de la madera.

El presente trabajo tiene como objetivos el estudio de la exo-endomorfología de los órganos aéreos, establecer los parámetros micrográficos de *Terminalia australis* Cambess., la realización de ensayos que permitan determinar la posible actividad antifúngica de extractos acuosos, metanólicos y de diclorometano e intentar mejorar la propagación de la especie si existiera su acción antimicótica.

En la selección del material vegetal se tuvo en cuenta que el individuo fuese adulto y se encontrase en buen estado fitosanitario. Este ejemplar de *Terminalia australis* se encuentra situado en Argentina, Provincia de Buenos Aires, Ensenada, Punta Lara, Reserva Natural, (camino a Villa Elisa a 50 m del camino costanero). Altura aproximada del Ejemplar 8 m; perímetro del tronco 75,0 cm. Las muestras mensuales de este Ejemplar se encuentran depositadas en LPE, bajo el N° 993.

Se describió la exo-endomorfología de los órganos aéreos y se establecieron los parámetros micrográficos de *Terminalia australis* Cambess. Esta información permitiría elaborar una monografía de la especie, con miras a su eventual inclusión en la Farmacopea Argentina. Los estudios anatómicos fueron realizados tanto en material fresco como en material seco.

Los caracteres cualitativos de los órganos aéreos de valor diagnóstico que permiten caracterizar a la droga, con MO, son los siguientes:

HOJA

- Estomas anomocíticos en la epidermis adaxial y tricomas "combretáceos" en ambas epidermis.

- Mesófilo de estructura dorsiventral. Drusas de oxalato de calcio en el mesófilo y el liber.
- Estructura vascular de la nervadura principal: haz colateral en forma de herradura, rodeado por una vaina esclerenquimática. Nudo unilacunar.
- Presencia de taninos y alcaloides

TALLO

Estructura Primaria

- Tricomas "combretáceos" en la epidermis. Estomas anomocíticos en la epidermis.
- Drusas de oxalato de calcio en el cortex primario, el floema externo (en hileras tangenciales) y la médula.
- Estructura vascular: euestela de haces bicolaterales.
- Periciclo constituido por cordones de fibras esclerenquimáticas y parénquima.
- Elementos de vaso con placa de perforación simple y engrosamientos anillados, espiralados, escalariformes y areolados .
- Elementos de vaso areolados con puntuaciones ornadas y alternas.
- Parénquima axial con cristales simples, prismáticos, de oxalato de calcio.
- Presencia de taninos y alcaloides.

Estructura secundaria

- Presencia de drusas de oxalato de calcio en el parénquima axial del liber. Radios floemáticos uniseriados .Líber duro formado por fibras no septadas, dispuestas en bandas tangenciales.
- Estructura no estratificada. Porosidad difusa. Placa de perforación simple. Puntuaciones intervasculares areoladas, ornadas y alternas. Número de bandas del parénquima axial.
- Parénquima axial con cristales alargados prismáticos, de oxalato de calcio. Radios leñosos uniseriados y heterogéneos.

- Presencia de taninos y alcaloides.

FLOR

- Tricomas "combretáceos" en la cara externa del hipanto inferior, ambas caras del hipanto superior, ambas caras de los sépalos, el tercio basal del estilo y muy escasos en el disco glandular.
- Estomas anomocíticos en la epidermis externa del hipanto, en la epidermis externa de los sépalos y en el disco glandular.
- Drusas de oxalato de calcio en las anteras, el gineceo, el hipanto, los sépalos y el disco glandular. Ovulos crasinucelados con funículo largo.
- Polen isopolar. Forma del polen: subprolato a esferoidal. Heterocolpados. Colpos y pseudocolpos circulares a alargados. Exina tectada.
- Presencia de taninos.

FRUTO

- Estructura vascular del pedúnculo: eustela de haces bicolaterales. Periciclo constituido por una vaina colenquimática y un parénquima interno.
- Drusas de oxalato de calcio en el cortex, floema externo y médula del pedúnculo. Tricomas "combretáceos" en la epidermis del pedúnculo y el epicarpio.
- Estomas anomocíticos en el epicarpio. Mesocarpio parenquimático.
- Endocarpio esclerenquimático (esclereidas y fibras). Drusas de oxalato de calcio en el endocarpio.
- Cristales prismáticos de oxalato de calcio en fibras del endocarpio.
- Presencia de taninos.

SEMILLA

- Exotesta de color amarillo pálido, de paredes celulósicas, con gotas de aceite; mesotesta castaño-amarillenta, de células escleróticas; endotesta y exotegmen castaño-amarillentos, de células traqueidales, con engrosamientos espiralados y endotegmen amarillo pálido, de células de paredes celulósicas, delgadas, alargadas y aplastadas tangencialmente.
- Cotiledones de vernación convoluta, con gotas de aceite, cuerpos de aleurona y muy escaso almidón secundario.
- Drusas de oxalato de calcio en los cotiledones.
- Presencia de taninos.

Para la realización de las pruebas biológicas se obtuvieron extractos acuosos, metanólicos y diclorometánicos de los órganos aéreos de *Terminalia australis* durante dos ciclos biológicos (24 meses consecutivos), que fueron utilizados para la realización de antifungigramas y la CMI con el propósito de determinar la posible existencia de actividad antifúngica y detectar los meses del ciclo biológico durante los cuales la actividad es mayor.

Se utilizaron los siguientes hongos provenientes del Instituto de Micología Carlos Spegazzini, La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina (LPS): *Candida albicans* (Robin) Berkhou 639 (LPS), *Candida krusei* Castellani 589 (LPS), *Aspergillus niger* Van Tieghem 51(LPS), *Aspergillus fumigatus* Fries 170 (LPS) y *Aspergillus flavus* Link 4 (LPS).

Las cepas empleadas corresponden a hongos levaduriformes (*Candida spp.*) y miceliares (*Aspergillus spp.*) que no presentan resistencia a los antimicóticos utilizados como controles recomendados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), en sus documentos M27-A2 (2002 a), M38-A (2002 b) y M38-P (1998) .

Para la realización de los ensayos de susceptibilidad *in vitro* se empleó el método de difusión en medio sólido para levaduras y hongos filamentosos productores de conidias. Se adoptó el Documento M27-A y M38-P, del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), modificado según Cantón Lacasa *et al.* (2001).

La actividad antifúngica fue determinada utilizando pruebas de difusión en medio sólido sobre cultivos estandarizados de hongos representativos.

emplearon controles negativos con discos cargados con cada uno de los solventes y secados en iguales controles positivos con soluciones de fluconazol (Pfizer) y Anfotericina B (Pfizer) en DMSO. La lectura de las pruebas preliminares de susceptibilidad de las levaduras se hizo visualmente y los halos de inhibición se midieron en mm empleando una reglilla calibrada. Los diámetros se compararon con los obtenidos con el control positivo. En los hongos filamentosos la lectura se hizo del mismo modo y los halos de inhibición medidos en mm se compararon con los halos de los discos embebidos en los extractos y el del control positivo.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/ml}$) en aquellos extractos que presentaron halos de inhibición (mm) importantes con respecto a los antifúngicos de referencia (fluconazol y Amphotericina B) establecidos por el National Commitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de levaduras y hongos filamentosos formadores de se realizó por el método de dilución en caldo glucosado Sabouraud. La CMI se determinó por observación visual de los tubos, considerando como tal a la concentración más baja de extracto en la cual no se observó crecimiento fúngico después de la incubación.

Los antifungigramas realizados permiten concluir que *Terminalia australis* contiene principios activos con probada acción antifúngica, como lo demuestran los siguientes resultados:

- Los extractos acuosos de *Terminalia australis* obtenidos a partir de material recolectado desde noviembre del año 1998 al mismo mes del año 2000 (*cfr.* 3.2.1.1.) han demostrado frente a *Candida albicans* actividad antifúngica en aumento desde noviembre hasta abril, mes este último donde se producen los picos de mayor efecto inhibitorio, 24 mm de halo de inhibición y 26 mm, respectivamente, para los años 1999 y 2000.
- Los extractos metanólicos enfrentados a la misma cepa fúngica demostraron similar acción, alcanzando su pico máximo en el mes de abril del 2.000 con un halo de inhibición de 28 mm y 26 mm en el mismo mes de 1999.
- En el caso de las pruebas efectuadas frente a *Candida krusei* el comportamiento del extracto acuoso presentó actividad inhibitoria máxima en el mes de abril, con 18 mm de halo de inhibición en el año 1999 y 22 mm en

el 2000.

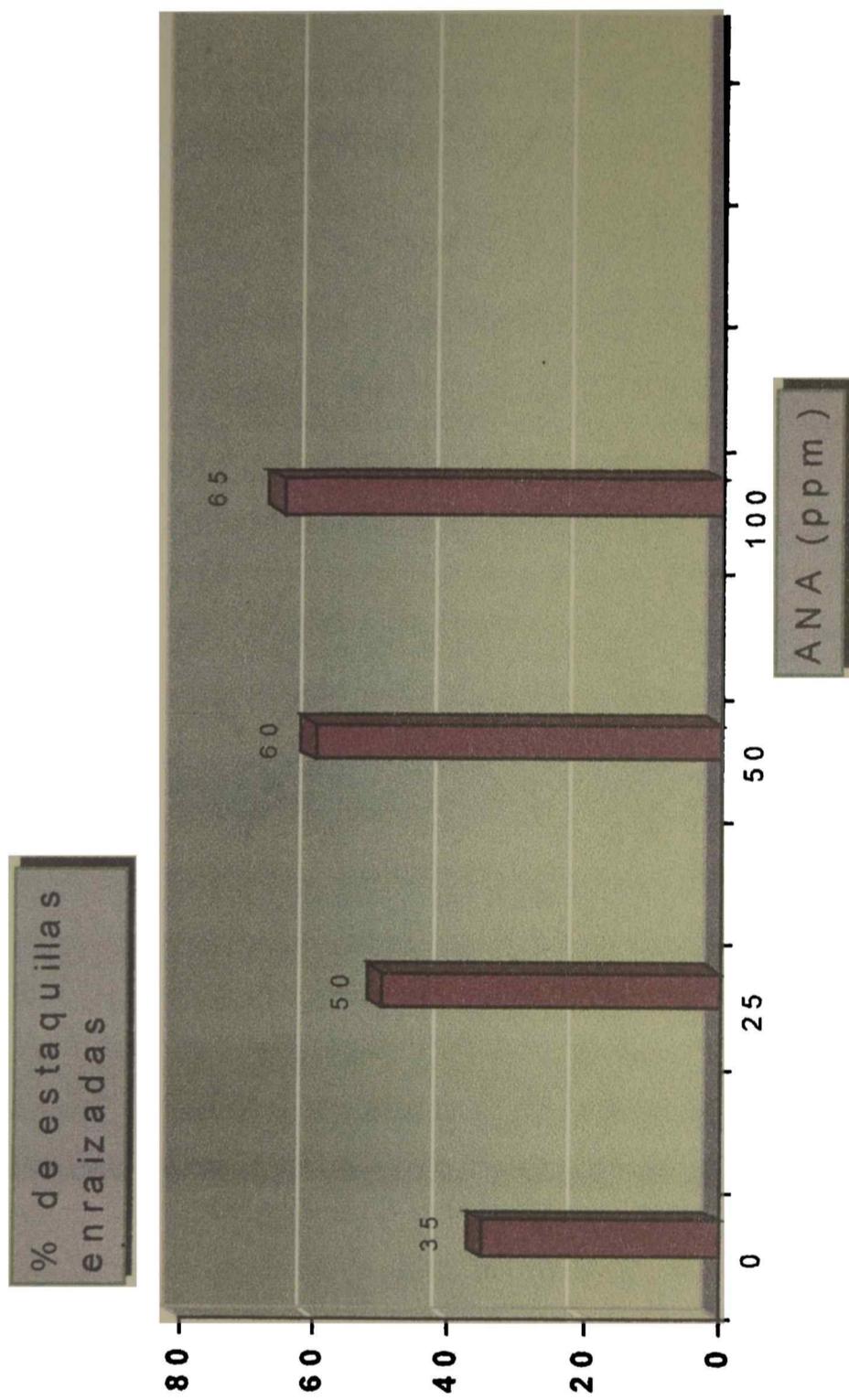
- Al ser ensayados frente a *Candida krusei* los extractos metanólicos mostraron acción antifúngica y en el mes de abril se observaron sus máximos valores, 22 mm de halo inhibitorio para 1999 y 24 mm para el 2000.
- Los antifungigramas enfrentando extractos acuosos de *Terminalia australis* con *Aspergillus fumigatus* mostraron, al igual que los anteriores, un aumento significativo de la actividad inhibitoria de la cepa en abril , 22 mm de halo en el año 1999 y 21 mm en el 2000.
- La acción de los extractos metanólicos sobre esta última especie han demostrado diferencias importantes con los descritos para los acuosos, observándose el máximo de inhibición en los meses de abril y mayo para el año 1999 y abril, mayo y junio para el 2000.
- En cuanto a la acción de los extractos acuosos frente a *Aspergillus flavus* demostraron poseer acción inhibitoria solamente con un pico de 8 mm de halo en el mes de abril del año 1999.
- Los extractos metanólicos mostraron un halo de 10 mm durante los meses de abril y mayo del año 1999 y de 12 mm en el 2000.
- Los extractos acuosos, metanólicos y de diclorometano no han demostrado poseer actividad inhibitoria frente a la cepa *Aspergillus niger* en ninguna de la muestras testadas.
- Los extractos de diclorometano no tuvieron efecto inhibitorio en ninguna de las pruebas realizadas en los dos años.

Los resultados de las CMI para *Candida albicans* y *Candida krusei* de los extractos acuosos y metanólicos han sido muy interesantes, ya que sus valores se encuentran entre menos de 250 µg/ml a 1000 µg/ml para los meses de la fructificación. Entre los meses de enero y marzo, si bien los valores que se han determinado son mayores, al ser entre menos de 1000 µg/ml y 1000 µg/ml son importantes de tener en cuenta. Los extractos acuosos y metanólicos han demostrado poseer una CMI muy importante frente a *Aspergillus fumigatus*: 250 µg/ml y 500 µg/ml, respectivamente. Para *Aspergillus flavus*, sólo el extractivo metanólico mostró una CMI de 1000 µg/ml. Cuando se ensayan extractos vegetales se consideran activos aquellos con CMI menor ó igual a 1000 µg/ml. (Muschiatti L. et al., 2005).

La etapa de fructificación son los meses a los cuales pertenecen los materiales vegetales recolectados que han demostrado poseer una interesante actividad antifúngica. En estos meses además de las partes aéreas recolectadas en otros periodos es importante destacar la alta proporción de frutos maduros de *Terminalia australis* (cfr. 3.2.1.1.), fenómeno que se repite en ambos periodos testados.

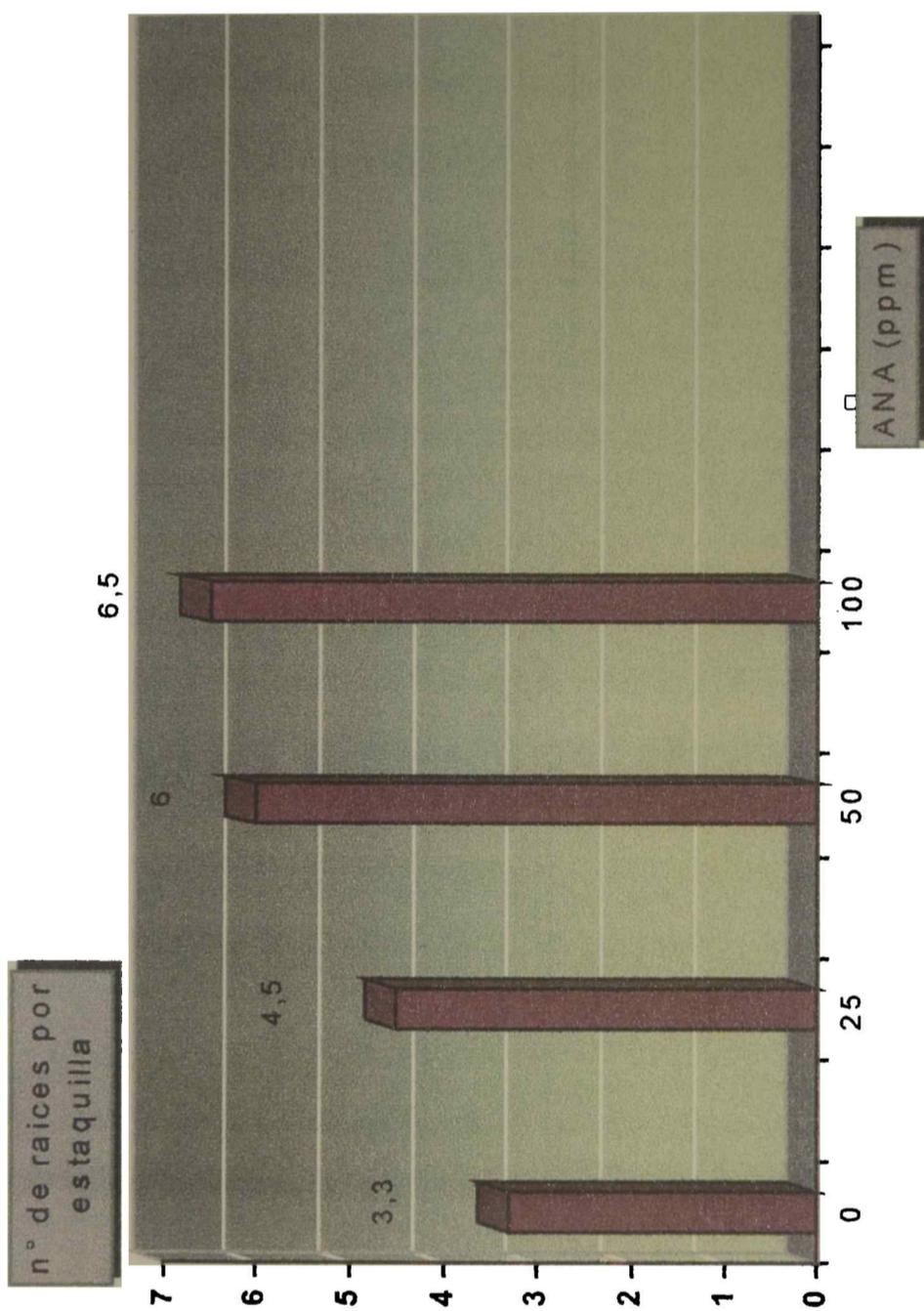
Finalmente, en cuanto al enraizamiento de estacas, debe tenerse en cuenta que son muchos los factores que afectan la regeneración de las plantas por este medio, como las condiciones fisiológicas de las plantas madre, el tipo de estaca, la época del año en que se colecta el material y las condiciones ambientales durante el enraizamiento. En estas experiencias preliminares se evaluó solamente el efecto de la concentración de un único factor de regulación de crecimiento (ANA) y los resultados obtenidos permiten alentar expectativas ciertas de propagar vegetativamente mediante estacas enraizadas individuos de *Terminalia australis* (Fig 52, Gráficos 8 y 9). Será necesario diagramar nuevos ensayos que tengan en cuenta diferentes variables para optimizar el proceso de enraizamiento de estacas de la especie en estudio.

Gráfico 8 : Efecto de los diferentes niveles de ANA (ppm.) en el porcentaje de estaquillas con raíces de *Terminalia australis*



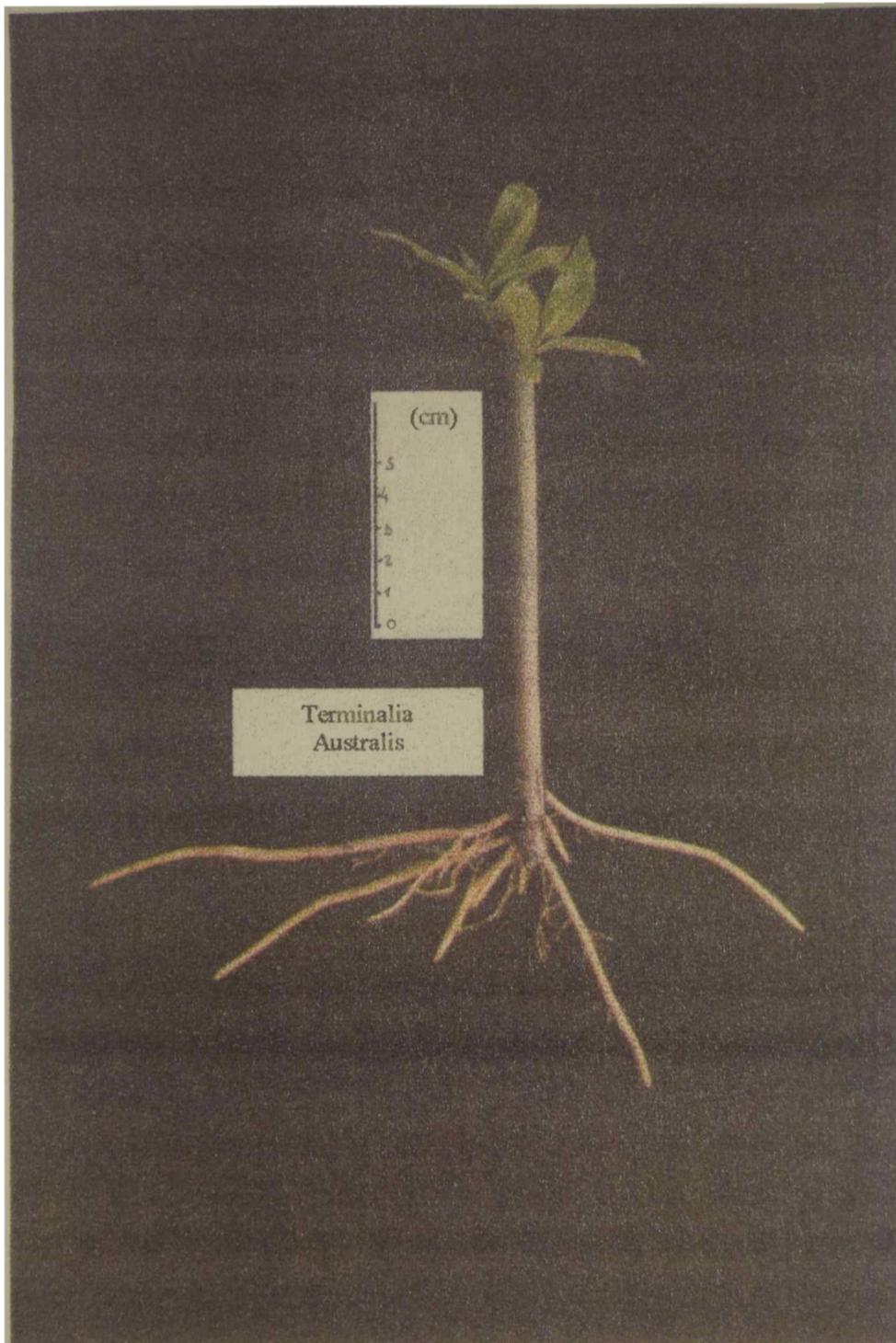
Conclusiones

Gráfico 9 : Efecto de los diferentes niveles de ANA (ppm.) en el número de raíces



Conclusiones

Figura 52 : Formación de raíces en estacilla de *Terminalia australis* con 100 ppm. de ANA.



REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

- Alfonso, V. A. y H.G. Richter. (1991). Wood and bark anatomy of *Buchenavia* Eichl. (Combretaceae) IAWA Bull., n.s., 12(2), pp.123-141.
- Alonso, J. R.. (1998). Tratado de Fitomedicina. Bases clínicas y farmacológicas. Editorial ISIS, Buenos Aires, pp. 43, 151, 192, 350–352, 464–466.
- Aller, A. I., *et al.* (2000). Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. Antimicrob. Agents Chemother. 44:1544-1548
- Alwan , A.R. (1983). The taxonomy of *Terminalia* (Combretaceae) and related genera. Unpubl. Thesis, 553 pp..
- Arora, S. *et al* (2003). Bioassay-guided isolation of antimutagenic factors from fruits of *Terminalia bellerica*. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 22, pp. 69-76.
- Backes, A. y M. Nardino (1999). Nomes populares e científicos de plantas do Rio Grande do Sul. Ed. Unisinos, São Leopoldo, Rio Grande do Sul.
- Barth, O. M. y S. A. F. Silva (1965). Catálogo sistemático dos polens das plantas arboreas do Brasil meridional VII Thymelaceae, Lythraceae, Lecythydaceae, Rhizophoraceae e Combretaceae. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 63:pp.255-278.
- Bassène, E. *et al* (1995). Comparaison de l'activité antibactérienne de trois Combretaceae : *Combretum micranthum*, *Guiera senegalensis* et *Terminalia avicennioides*. Fitoterapia 66:pp. 86-87.

- Bassols, G. B. y A. A. Gurni (1998). Posibles adulterantes del poleo (*Lippia turbinata* Griseb., Verbenaceae). Acta Farmacéutica Bonaerense, 17(3) : pp. 191-196.
- Batawila, K, B. *et al.*.(2005) Fitoterapia ,76:pp. 264.
- Bertoni, M. S. (sin año). Las plantas usuales del Paraguay y países limítrofes 31.1. Introd., nomencl. y diccionario de los géneros Botánicos latino guaraní. M. Brossa, Asunción.
- Bessong P. O. *et al.* (2005).*In vitro* activity of three selected South African medicinal plants against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. African Journal of Biotechnology Vol. 3, No. 10 : pp. 555-559.
- Brau, J. (1973). Historia de las drogas, Bruguera, España, 1973.
- Bruneton, J. (1991). Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Ed. Acribia,Zaragoza, 594 pp..
- Bushnell O. A.*et al.*.(1950).The antibacterial properties of some plants formed in Hawai. Pacific SA 4 : pp.267-183.
- Cabrera, A. L. y G. Dawson (1944). La selva marginal de Punta Lara. Rev. Mus. La Plata, Botánica, 5(22) : pp.276-382, 10 lám..
- Cantón Lacasa E. *et al.*(2001).Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. Revista Iberoamericana de Micología.ISBN:84-607, pp. 3.050-6
- Carpano, S.M. *et al.* (1994). Nueva técnica de eliminación de cutina de órganos foliares. Rojasiana, 2:pp. 9-12.

- Carpano, S. M. *et al* (2004); Antifungal activity of *Terminalia australis* .Fitoterapia 7: pp. 294-97.
- Carrillo A.J. *et al* .(1995).Medios de cultivo en Micología médica y veterinaria. Cuadernos de Microbiología .3: pp.2-3.
- Castiglioni, J. A.(1958). El diseño de las maderas. Rev. Invest. Forest., 1(3): pp. 21-44.
- Cercós.1951.Rev.Arg. Agronomía.18, 200.
- Cercós y Rodríguez Berretta. 1953.IDIA.70,1.
- Chattaway, M.M. (1955). Crystals in woody tissues; Part.I. Tropical Woods, 102:pp. 55-74.
- ——(1956) .Cristals in woody tissues; Part II.Tropical Woods.104:pp. 100-124.
- Christensen M. (1981).A synoptic key and evaluation of specie in the *Aspergillus flavus* group.Mycologia 72: pp. 1056-1084.Churchill Livingstone/Elsevier Science, New York, Edinburgh.
- Conti, E. *et al*. (1996, 1998, 1999, 2002). Circumscription of Myrtales and their relationships to other rosids: evidence from rbcL sequence data. American Journal of Botany 83, pp. 221-233.
- Corner, E.J.H. (1976). The seeds of Dicotyledons. 2 Vol. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

- Corrêa, M.P. (1984). Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Vol. 1, Ministério da Agricultura Inst. Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro.
- Cristiani, L.Q. (1962). Iconografía anatómica de maderas Argentinas secciones transversales por 15 aumentos. Rev. Del Inst. Municipal de Botánica 11: pp.87-181, 17 láms..
- Cristiani, L. Q. (1973). Rev. Farm.2: pp. 5-8.
- Dahlgren, R. y R. F. Thorne (1984). The order Myrtales: Circumscription, variation, and relationships. Ann. Missouri Bot. Gard. 71: pp. 633-699.
- Devoto, E. y M. Rothkugel (1942). Indice de la flora leñosa Argentina. Minist. Agr. , Publ. Misc. (140): pp. 53...
- Dignani, MC *et al* (2003) . Medical Mycology. 1ª Ed., Churchill Livingstone.
- Domsch ,K.H. *et al* , (1980). Compendium of Soil .
- Elegami, A.A., *et al.*(2002). Antimicrobial activity of some species of the family Combretaceae, Phytot. 16(6): pp.555-561.
- Erdtman, G. (1952). Pollen Morphology and Plant taxonomy, Angiospermae. Almquist and Wiksell, Stockholm.
- Escalante, M.G. y S.M. Carpano (1977). Acción antibiótica de plantas argentinas silvestres y cultivadas. Revista Farmacéutica, 10: pp.109-113.

- Evans, W. C. (1991). Trease y Evans. Farmacognosia. Interamericana, México, 901 pp..
- Exell, A.W. (1939). The "*Combretaceae*" of Argentina. Lilloa, 5:123-130,7 lam..
- —and Reitz, R. (1967). *Combretáceas*. In : Flora Ilustrada Catarinense I (fasc. COMB). Edited by P.R. Reitz. Itajaí, Sta. Catarina pp. 1-26.
- Fabris, H. A.(1965). Combretaceae .Flora de la Provincia de Buenos Aires , A. L. Cabrera (Dir.) Tomo IV, Parte IV, Colección Científica del INTA, Bs. As. .
- Fernández Fernández, M y A. Crespo Irizar (1999). Cap. 15. Taninos. "Farmacognosia General", A.M. Villar del Fresno (ed.). Ed. Sintesis, Madrid.
- Fleming A.(1929). "On the Antibacterial Action of Cultures of *Penicillium*, with Special Reference to their use in Silation of *H influenzae*". British Journal of Experimental Pathology. 10: 226
- Gautier E. y Gerber F.(1958).Investigación de la actividad antibacteriana de plantas de Córdoba. Bol. Soc. Arg. de Bot., vol VIII,1:pp.1-8.
- Griffiths, M. E., (1959). A revision of the African species of *Terminalia*. J. Linn. Soc. Bot., 55(364): pp. 818-907.
- Guaglianone, E. R., (1999a). Combretaceae. En: "Flora Fanerogámica Argentina", A.T. Hunziker (Ed.), 58: pp.1-8.

- Guaglianone, E. R. (1999b). Combretaceae. En: "Catálogo de las Plantas Vasculares de la Rep. Argentina II. Acanthaceae-Euphorbiaceae (Dicotyledoneae)", Zuloaga, F.O. y O. Morrone (Eds.). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, vol. 74, pp. 621.
- Guaglianone, E. R. y Novara, L. J. (1998). Combretaceae. Aportes Botánicos de Salta- Ser. Flora, 6(1): pp.1-7.
- Hieronymus, J. (1882). *Plantae Diaphoricae florae argentinae* ó revista sistemática de las plantas medicinales, alimenticias ó de alguna otra utilidad y de las venenosas, que son indígenas de la República Argentina ó que originarias de otros países, se cultivan ó se crían espontáneamente en ella. Bol. Acad. Nac. Ciencias Córdoba, IV. pp. 199-598.
- Hollande. C. R. (1944). Acad. Sc., 221: pp. 361.
- Hollande. C. R. (1947) Acad. Sc., 224: pp. 1.534.
- Hollande. C. R. (1949) Acad. Sc., 228: pp.1.758.
- Howes, F. N. (1949). *Vegetable gums and resins*. Chronica Botanica Company of Waltham, Mass., USA, 188 pp.
- IAWA Committee,(1989). IAWA. List of microscopic features for hardwood identification . IAWA Bull. 10(3): pp. 219-332.
- Jordanoff A. (1927). Jb.Univ.Soffia.Vet.Med.Facultat.3: pp. 55.
- Junikka, L. (1994). Survey of english macroscopic bark terminology. IAWA Journal, 15(1): pp. 3-45.

- Khan M. R. *et al* .(2002). Antimicrobial activity of *Terminalia complanata* and *Flacourtia zippelii*. 73(7-8): pp. 737-40.
- Klich, M.A. y J.L Pitt, (1985). *Advances in Penicillum and Aspergillus Systematic*. Ed. Samsom R. A. and Pitt J.I. Plenum Press. New York.
- Klucking, E.P. (1991). Leaf venation patterns. Vol. 5. Combretaceae. J. Cramer, Berlin'Stuttgart.
- Koneman, E.W. y Roberts G. D. (1995). *Micología Práctica de Laboratorio*. Bs. As. Ed. Médica Panamericana. 3° ed. .Cap. 3: pp.47-63, Cap. 4: pp. 63-73.
- Lahitte, H. B. y J. A. Hurrell (1997 b). *Las plantas de la Medicina popular de la Isla Martín García*. Comisión de Investigaciones Científicas, Prov. Bs. As., serie Informes 50. pp. 1-246.
- Larone, D. H. (1995). *Medically Important Fungi - A Guide to Identification*, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Leonardis, R. F. J. (1976). *Libro del Árbol*. T. II, 2da. ed. Celulosa Argentina, Bs. As.
- Linares R., *et al* . (2001). *Microbiology & Infection* Volume 7 Issue 4 :pp. 218 .
- Lombardo, A.(1964). *Flora arbórea y arborescente del Uruguay*. Dir. Pas. Publ., Montevideo.
- Lopez R., *et al* . (1987). *Arboles comunes del Paraguay*. Cuerpo de Paz, Colección e Intercambio de Información, pp. 425.

- Lorenzi , H. (1995).Árvores Brasileiras. Manual de Identificao e Cultivo de Plantas Arbóreas nativas do Brasil. Plantarun Ltda., Nova Odessa, Brasil.
- Lorenzi, H. (1995). Árvores Brasileiras. Plantarun, San Pablo.
- Maheu, J. y R. Weitz (1935). A propos des graines de Combrétacées vermifuges de Madagascar. Bull. Sc. Phamacol. , 42: pp. 202-210.
- Mantell, C.L. (1947). The water-soluble gums. Reinhold Publishing Corporation, New York, USA, pp. 279.
- Markgraf, V. y H. L. D'Antoni (1978). Pollen Flora of Argentina. The Univ. Arizona Press, Tucson, Arizona.
- Martini N y Eloff J (1998). The preliminary isolation of several antibacterial components from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). J. Ethnoph 62 : pp. 255-263.
- Martino,V. S, et al (2004).Two ellagitannins from the leaves of *Terminalia triflora* with inhibitory activity on HIV-1 reverse transcriptase. Phytotherapy , Volume 18, Issue 8 : pp.667 – 669.
- Masika P. J. et al.. (2003).An ethnobotanical study of plants used for the treatment of Livestock diseases in the Easter Cape, Province south Africa. Pharmaceutical Biology vol 18(1),pp. 16-21.
- Metcalfe, C. R. y L. Chalk (1957) Anatomy of the Dicotyledons, Vol 1, Ed. Clarendon Press, Oxford.
- Miller M. J. et al.(1998). A Guide to Specimen Management in Clinical

- Microbiology.A.S.M Press, 1998, American Society for Microbiology. Washington DC.
- Mitscher L *et al.* (1972 a,b,c). Antimicrobial agents from higher plants. *Lloydia* 35: pp. 157–166.
- Moshi M. J., *et al* (2005).Antimicrobial and brine shrimp lethality of extracts of *terminalia mollis* laws *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, Vol. 3, No. 3: pp. 59-69.
- Muñoz, J. *et al.* (1993). Flora indígena del Uruguay. Arboles y arbustos ornamentales. Hemisferio Sur, Montevideo.
- Muschietti L. *et al.*(1994) 5,7,5' Trihydroxy-3,6,2',4' tetramethoxyflavone from *Eupatorium buniifolium*, *Phytochemistry* 36 (1994), pp. 1085–1086.
- Muschietti L., *et al.* (2005)In vitro antifungal assay of traditional argentine medicinal plants.*Journal of ethnopharmacology*.102, 2 pp. 233-238.
- NCCLS, National Committee for Clinical and Laboratory Standards.(2002a). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard, 2nd ed., NCCLS document M 27-A2, vol. 22, No. 15, NCCLS, Wayne, PA, pp. 1–29.
- NCCLS, National Committee for Clinical and Laboratory Standards,(2002b). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Approved Standard, 2nd ed., NCCLS document M 38-A, vol. 22, No. 16, NCCLS, Wayne, PA, pp. 1–29.

- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards.(1998). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi; proposed standard. M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, USA.
- Niembro Rocas, A. (1989). Semillas de plantas leñosas. Morfología comparada. Limusa, México.
- Ortega Torres, E. R. *et al.* (1989). *Terminalia triflora* (Griseb.)Lillo. En: "Flora del Paraguay", R. Spichiger (Dir.) Serie Especial N° 3. Conservatoire et Jardin Botanique, Ville de Genève, Missouri Bot. Garden .pp.66-67.
- Perrot, E. (1943/44). Matieres premieres usuelles du Regne Vegetal. V. II, Masson et Cie, Paris.
- Philcox , D. (1995). Combretaceae. En: " A revised Handbook to the Flora of Ceylon" , M.D. Dassanayake (ed.gral). Smithsonian Inst. & The National Science Foundation, Washington, D.C., Amerind Publishing Co.Put.Ltd., New Delhi.9: pp.28-46.
- Pitt J. I. and Hocking A. D. (1985). Fungi and Food Spoilage Academic press. New York.
- Punt, W; S.*et al* .(1994). Glossary of pollen and spore terminology.LPP Foundation, Laboratory of Palaeobotany and palynology, University of Utrecht, LPP Contributions Series (1): pp. 72.
- Rao, P.S.P. (1972). Wood anatomy of some Combretaceae. J. Jap. Bot., 47: pp.358-377.

- Ratera, E. y Ratera., N. (1980). Plantas de la flora Argentina empleadas en medicina popular. Editorial Hemisferio Sur, Argentina, pp. 135.
- Record, S. J. (1936). Classifications of various anatomical features of Dicotyledonous woods. Trop. Woods, 47:pp.12-27.
- Roth, I. (1969). Estructura anatómica de la corteza de algunas especies arbóreas de Combretaceae. Acta Botánica Venezuelica, 4:pp.227-239.
- Roux E.(1890). Lyon méd.,64: pp.745.
- Salisbury, E. J. (1927).On the causes and ecological significance of stomatal frequency with special reference to the woodland flora. Phil. Trans. Roy. Soc. London 216 B: pp 1-65.
- Samsom, J. (1990): Candidiosis bucales: Epidémiologie, diagnostic et traitement. Rev Mens Suisse Odontostomatol. 100: pp. 548-559.
- Scala, A. C.(1912). Manual de manipulaciones de Botánica. Rev. de Difusión Científica del Museo de La Plata, 3: pp. 1-244.
- Schönenberger, J. and Conti, E..(2001,2003). Molecular phylogeny and floral evolution of Penaeaceae, Oliniaceae, Rhynchocalycaceae, and Alzateaceae (Myrtales) (Filogeni molekul dan evolusi flora...). American Journal of Botany. 90: pp.293-309.
- Schulz, V. *et al.*(1998). Rational Phytotherapy, Springer Verlag, Berlin, pp. 167-173.
- Silva O.*et al.* (1997) Antimicrobial activity of *Terminalia macroptera* root. J. Ethnopharmacology;57(3): pp.203-7.

- Silva O. *et al* (2002). In vitro anti-*Neisseria gonorrhoeae* activity of *Terminalia macroptera* leaves. *Microbiology Letters*, 211(2) : pp 203 .
- Stace, C. A. (1965).The significance of the leaf epidermis in the taxonomy of the Combretaceae. *J. Linn. Soc. (Bot.)*, 59: pp. 229-252.
- Steinbach WJ, *et al* .(2004).*Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: pp.2166.
- Stoll *et al* .(1928).*Helv. Chim. Acta.*,31:pp.189.
- Sutton, D. A., A. W. Fothergill, and M. G. Rinaldi (ed.). (1998). *Guide to Clinically Significant Fungi*. Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Taylor R. S. *Et al.*.(1996). Antimicrobial activities of southern Nepalese medicinal plants.;50(2): pp. 97-102.
- Tortorelli, L. A. (1956). *Maderas y bosques argentinos*. Acme, Bs. As..
- Tuset, R. y F. Durán (1970). Descripción y clave macroscópicas de maderas comerciales en Uruguay. *Bol. Fac. Agron., Montevideo*, 114: pp.1-63.
- Van Vliet, G.J.C.M. (1978). The vestured pits of the Combretaceae. *Acta Bot. Neerl.* 27: pp. 273-285.
- Van Vliet , G.J.C.M. (1979). Wood anatomy of the Combretaceae. *Blumea*, 25: pp.141-223.
- Verhoeven, R. L. & H. P. Van der Schijff .(1975).Anatomical aspects of Combretaceae in South Africa. *Phytomorphology*, 24:pp.158-164.

- Villalobos, C. y J. Villalobos (1947). Atlas de colores. Ed. El Ateneo, Bs. As.
- Vincent J.(1948). Produits. Pharmaceut. , 3: pp. 341-391.
- Werker, E. (1997). Seed Anatomy. Borntraeger, Berlin-Stuttgart.
- Wilson J. (2004).The aetiology,diagnosis and management of ... Intern J Oral Maxillof Implant ; pp.19:295 ..
- Wodehouse, R.P. (1935). Pollen grains . Mc. Graw-Hill, New York.63: pp.451-470
- Zomig, H. y G. Weiss (1925). Beiträge Zur Anatomie des Laubblattes offzineller und pharmäzeutisch gebräuchlicher Compositen-Drogen.Archiv der Pharmazie, Berlin 263: 451-470.