



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

Mikania cordifolia* y *Mikania micrantha
(Asteraceae): Especies medicinales nativas de las
Reservas Naturales de Punta Lara e Isla Martín
García, Buenos Aires, Argentina
Anatomía, ensayos fitoquímicos y actividades biológicas

Tesis de Maestría para optar al grado de
Magíster en Plantas Medicinales, UNLP

Ingeniero Agrónomo
Marta Noemí Colares

Directora de Tesis
Prof. Dra. Ana María Arambarri
Co-Directora
Dra. María Adelaida Rosella

Lugar de trabajo:
Cátedra de Morfología Vegetal, Depto. de Ci. Biológicas,
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
Cátedra de Farmacognosia, Depto. de Ci. Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata

2010

Colares, Marta N.

Mikania cordifolia y Mikania micrantha, Asteraceae : especies medicinales nativas de las reservas naturales de Punta Lara e Isla Martín García, Buenos Aires, Argentina : anatomía, ensayos fitoquímicos y actividades biológicas . - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2012.

E-Book.

ISBN 978-950-34-0889-6

1. Tesis de Doctorado. 2. Biología. I. Título.
CDD 570.711

Fecha de catalogación: 07/09/2012

Índice

	Pág.
Agradecimientos	6
1.- Introducción	10
Fundamentos de la elección del tema	16
2.- Antecedentes	17
2.1.- Familia Asteraceae	18
2.1.1.- Distribución geográfica	20
2.1.2.- Antecedentes Botánicos	21
2.1.3.- Antecedentes de Uso en Medicina Tradicional	22
2.1.4.-Antecedentes Fitoquímicos	26
2.2.- Género <i>Mikania</i> Willd.	27
2.2.1.- Distribución geográfica	27
2.2.2.- Antecedentes Botánicos	29
2.2.3.- Antecedentes de Uso en Medicina Tradicional	30
2.2.4.-Antecedentes Fitoquímicos	31
2.3.- <i>Mikania cordifolia</i> (L. f.) Willd.	34
2.3.1.-Distribución y hábitat	35
2.3.2.-Descripción morfológica	35
2.3.3.-Antecedentes de Uso en Medicina Tradicional y Actividades biológicas	36
2.3.4.-Antecedentes Fitoquímicos	36
2.4.- <i>Mikania micrantha</i> Kunth	37
2.4.1.- Distribución y hábitat	38
2.4.2.-Descripción morfológica	38
2.4.3.-Antecedentes de Uso en Medicina Tradicional y Actividades biológicas	39
2.4.4.-Antecedentes Fitoquímicos	40
2.4.5.- <i>Mikania micrantha</i> “Milla por minuto”: Maleza invasora de Asia	40
3.- Objetivos	43
4.- Materiales y Métodos	46
4.1.- Material vegetal	47
4.1.1.- Procedencia	47
4.1.2.- Recolección y acondicionamiento del material vegetal	48
4.1.3.- Determinación taxonómica	48
4.1.4.-Acondicionamiento del material vegetal	48
4.2.- Caracteres anatómicos	48
4.3.- Ensayos fitoquímicos preliminares	51
4.3.1.- Preparación de los extractos	51
4.3.2.- Pruebas químicas	52

4.3.3.- Cromatografía en capa delgada (CDD)	53
4.3.3.1.-Fase estacionaria	53
4.3.3.2.-Fases móviles utilizadas	53
4.3.3.3.-Detección	53
4.3.3.4.-Testigos utilizados	54
4.3.3.5.-Sistemas cromatográficos utilizados para los distintos extractos	54
4.3.4.-Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD)	55
4.4.- Actividades	56
4.4.1.- Actividad farmacológica a nivel gastrointestinal	56
4.4.1.1.-Extractos utilizados	56
4.4.1.2.-Animales y preparados utilizados en los estudios farmacológicos	56
4.4.1.3.-Soluciones empleadas	56
4.4.1.4.-Mediciones y Protocolos Biológicos	57
4.4.1.5.-Tratamiento estadístico de los resultados	58
5.- Resultados	59
5.1.- Caracteres anatómicos	60
5.1.1.- <i>Mikania cordifolia</i>	60
5.2.2.- <i>Mikania micrantha</i>	66
5.2.- Ensayos fitoquímicos preliminares	71
5.2.1.-Rendimiento de los extractos DCM, MeOH y acuoso	71
5.2.2.-Pruebas químicas orientativas	71
5.2.3.-Análisis de las cromatografías en capa delgada (CCD) efectuadas a los extractos acuoso, DCM y MeOH de <i>Mikania</i> spp.	72
5.2.3.1.- Extractos DCM	72
5.2.3.2.- Extractos MeOH	74
5.2.3.3.- Extractos acuosos	77
5.2.4.- Análisis por HPLC-DAD de los extractos DCM y MeOH de <i>Mikania</i> spp.	81
5.3.- Actividad gastrointestinal de los extractos acuosos de <i>Mikania</i> spp.	85
5.3.1.-Del extracto acuoso de <i>M. micrantha</i>	85
5.3.2.-Del extracto acuoso de <i>M. cordifolia</i>	86
5.3.3.-Efectos de <i>M. micrantha</i> sobre las CDR de Ca ⁺²	87
5.3.4.-Efectos de <i>M. cordifolia</i> como agonista	88
6.- Discusión	89
6.1.-Caracteres anatómicos	90
6.2.- Ensayos fitoquímicos preliminares	94
6.3.-Actividad gastrointestinal	101

7.-Conclusiones	104
8.-Resumen	110
9.-Anexos	125
10.- Bibliografía	135

3.- Agradecimientos

Mi agradecimiento:

A las Facultades de Ciencias Agrarias y Forestales y de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por brindarme una formación de excelencia y por permitir la realización de este trabajo.

A la Dra. Etile Spegazzini, Directora del Magíster en Plantas Medicinales, por ocuparse siempre de todo, para que tanto Pablo Ramos como yo, hayamos culminado con éxito el camino emprendido, por su estímulo constante y sus conocimientos transmitidos.

A mi Directora de Tesis, Dra. Ana María Arambarri, por los saberes que generosamente me ha brindado durante tantos años de trabajo juntas, por atender siempre mis ideas e inquietudes y por su apoyo constante desde el comienzo de este proyecto.

A mi Codirectora de Tesis, Dra. María Adelaida Rosella, por la ayuda brindada en todas las instancias de este trabajo, por su paciencia y sus magníficas aptitudes docentes que lograron hacer más sencilla la, a veces, difícil tarea emprendida.

A la Dra. Alicia Consolini por todas las facilidades brindadas para la realización de una parte importante de este trabajo y por transmitir de forma sencilla conocimientos totalmente nuevos para mí. Hago extensivo el agradecimiento a M. I. Ragone y G. Colareda quienes me ayudaron a llevar adelante los experimentos en el laboratorio de Farmacología (Facultad de Ciencias. Exactas, UNLP).

A la Dra. Silvia Debenedetti, quien generosamente me brindó las instalaciones del Laboratorio de Farmacognosia (Facultad de Ciencias. Exactas, UNLP) para realizar

este trabajo, como así también por sus conocimientos y oportunas sugerencias aportadas.

A todos los profesores del Magíster de la Facultad de Ciencias Exactas y Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP y de la Facultad de Farmacia y Bioquímicas de la UBA, por su predisposición para dictar sus materias y transmitirnos sus saberes.

A la Dra. Liliana Katinas, por las sugerencias brindadas.

A Santiago Martínez, por su compañía y colaboración durante los viajes realizados para recolectar el material vegetal.

A todos mis compañeros de las Cátedras de Morfología y Sistemática por su apoyo y estímulo constante y muy especialmente a Nilda González, quien desde el comienzo de este proyecto siempre me escuchó y alentó, aún en los momentos más difíciles.

A Mónica Collado, por la ayuda brindada para realizar los análisis estadísticos, pero principalmente por su amistad.

A María Alejandra Migoya, por la realización de las láminas que ilustran este trabajo.

A Carlos, Iván, Yésica, Silvia, Mariela, Griselda, Teresita, Gogui y Dora, por la calidez con que siempre me han tratado.

A Analía Mugerza, por su colaboración para realizar los ensayos de actividad farmacológica.

Al personal de OPDS: Lic. Raquel Stefanizzi, Sr. Leonardo Cremaschi y a los guardaparques de las Reservas de Punta Lara e Isla Martín García por su predisposición para permitir la recolección del material.

Y MUY ESPECIALMENTE:

A mi familia: Walter, Rocío, Martín y Milagros, porque comprendieron desde el comienzo la importancia que este proyecto significó para mí, brindándome todo su apoyo, su colaboración y paciencia, sin los cuales no hubiera podido culminarlo con éxito.

1.- Introducción



El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempos inmemoriales. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal recurso de que disponían los médicos y sanadores. Esto hizo que se profundizara el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y se ampliara la experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen.

Los primeros textos escritos

Los conocimientos sobre las plantas medicinales, antes del nacimiento de la escritura, se realizaban oralmente. Se sabe que el primer texto escrito sobre el uso de plantas medicinales tiene unos 4000 años de antigüedad y aparece en una tablilla de arcilla en la cultura de los sumerios, un antiguo pueblo que vivía al sur de los ríos Éufrates y Tigris.

Los egipcios utilizaron los principios de las plantas medicinales de una



Papiro de Londres, British Museum

manera sistemática y controlada. Se conocen más de 700 fórmulas en las que aparecen estas plantas. Durante el reinado de Tutankamen (1350 a.C.) se cree que se escribió el llamado papiro de Londres por los sacerdotes del templo de Tebmut, en donde se

describe un recetario médico acompañado de la necesaria magia complementaria para cada tratamiento.

Sin embargo en Asia el empleo de las plantas con fines medicinales es anterior, principalmente en China ya que existen registros que permiten suponer que eran utilizadas desde el año 5000 a.C. En la India el uso de estas plantas, conocido como Medicina Ayurvédica, nos ha dejado referencias escritas del año 800 a.C., donde aparecen descritas unas 800 especies.



Hipócrates (460-370 a C)

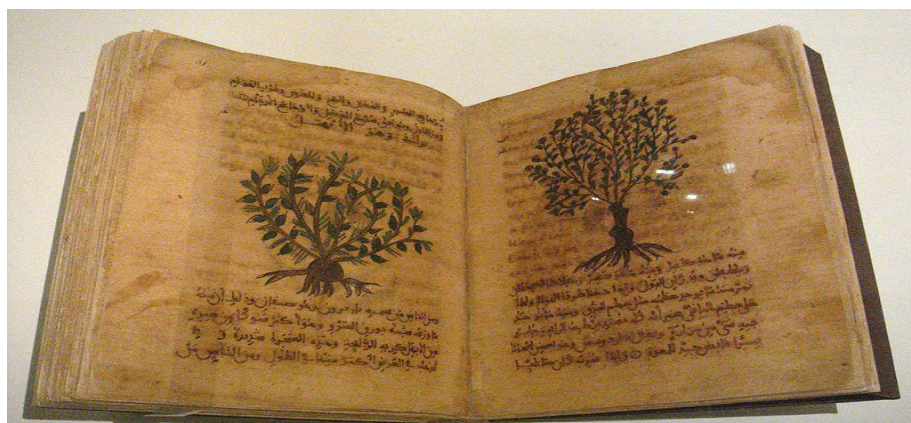
Los griegos y los romanos recogen la tradición de los pueblos de la Mesopotamia y Egipto y hacen uso de las plantas para curar las enfermedades y mantener un buen estado de salud.

Así, por ejemplo el físico griego Hipócrates, considerado el padre de la medicina, otorga extrema importancia a la medicina preventiva, cumpliendo las plantas un papel muy importante, hasta el punto que se considera el autor del siguiente aforismo: "Deja que

la comida sea tu medicina y tu medicina tu comida".

El primer escrito de naturaleza científica en la época clásica es *Materia Médica*, escrita por Dioscórides (40-90 d.C.) en cinco volúmenes.

Este médico griego trabajaba con los romanos como botánico y durante sus viajes estudió las propiedades de más de 1000 plantas y de muchos principios químicos, sirviendo su obra de referencia hasta el siglo XV.



Dioscórides De Materia Médica (fotografía del Museo de Cluny)

Sobre ella se han hecho muchas revisiones y traducciones, siendo la más importante en idioma español “*Plantas medicinales, El Dioscórides renovado*” del farmacéutico Dr. Pio Font Quer (1888-1964), en la cual revisa 682 especies citadas por Dioscórides.

La Edad Media

Durante la Edad Media el estudio de las plantas medicinales estaba en manos de los monjes que en sus monasterios plantaban y experimentaban sobre las especies descritas en los textos clásicos. Ampliamente utilizada era la *mandrágora*, una planta que contiene atropina, una sustancia que administrada en pequeñas dosis adormece, pero por el contrario, en grandes dosis estimula hasta el punto de provocar alucinaciones, por lo cual, en la Edad Media se decía que era una planta que “adormece el primer día y vuelve loco el segundo”.



Animismo en la Mandragora, Tacuinum Sanitatis, 1474

El aporte del Nuevo Mundo

Cuando los colonizadores europeos llegaron a América se vieron sorprendidos por los conocimientos que poseían los nativos del uso medicinal de las plantas.

Estos conocimientos estaban en manos de los chamanes que eran los que tenían el poder de utilizar la magia y las plantas medicinales para curar las enfermedades. Fueron muchas las expediciones posteriores de botánicos y herbalistas que buscaban en estos sacerdotes un mayor conocimiento de las propiedades curativas de las plantas. De esta época data el Códice De la Cruz-



Códice de la Cruz- Badiano

Badiano, considerado el primer libro médico del Nuevo Mundo creado en el siglo XVI en México.

Es así que hasta el S. XIX, las plantas medicinales y sus extractos constituyeron la mayoría de los medicamentos que en aquella época poco se diferenciaban de los remedios usados en medicina popular. Esta tendencia persistió hasta el siglo pasado, cuando se produce un cambio en esa postura debido principalmente al descubrimiento de diversas sustancias tales como los antibióticos, los anestésicos o las sulfamidas que tuvieron un gran impacto en el tratamiento de las enfermedades que afectaban a la población y para las cuales esas plantas y sus extractos exhibían poca eficacia. Sin embargo, las expectativas exageradas en torno de estos productos, por la creencia de que para cada enfermedad existía un medicamento, los efectos colaterales y tóxicos producidos por las mismas, así como la dificultad de buena parte de la población de acceder a éstos, llevaron al resurgimiento de las plantas medicinales como importantes recursos terapéuticos (Carollo, 2008). Así es que en la actualidad, el 25% de las prescripciones médicas en los países industrializados corresponde a plantas medicinales

(Farnsworth & Morris, 1976; Akerete, 1984), mientras que en los países en desarrollo esta cifra llega al 80%.

Las plantas son reconocidas por la capacidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios y por su uso en medicina popular para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades (Cragg *et al.*, 1999). Estos metabolitos son sintetizados por las plantas para diferentes propósitos, que incluyen: regulación del crecimiento, interacciones inter e intraespecíficas, protección contra radiaciones UV y defensa contra predadores e infecciones. La forma de analizar estos productos elaborados por las plantas también ha sufrido grandes transformaciones en los últimos años. Con la aparición de numerosas tecnologías, los métodos de aislamiento, identificación y validación de las actividades biológicas de los compuestos naturales se han vuelto más rápidos y eficaces (Carollo, 2008).

Existe una innumerable cantidad de ejemplos de principios activos naturales utilizados en terapéutica y es cada vez más frecuente el empleo de éstos en las prácticas agrícolas. Un estudio realizado en 1985 que recibió el apoyo de la Organización Mundial de la Salud, daba cuenta de la identificación de 119 sustancias aisladas de 90 especies vegetales que se utilizan en terapéutica y que aún se extraen de las plantas (Rosella, 2008). En nuestro país existen más de 1500 plantas con referencias de uso medicinal o tóxico (Rondina *et al.*, 2003), no obstante lo cual, sólo un pequeño número de éstas han sido estudiadas desde el punto de vista botánico, fitoquímico o farmacológico.

Por todo ello es que el conocimiento farmacognóstico de las especies nativas de Argentina con propiedades medicinales contribuirá a la correcta identificación de las especies, tanto de aquellas actualmente utilizadas, como de las que presentan un potencial uso farmacológico, evitando riesgos de toxicidad en la población que las consume. Del mismo modo, el conocimiento de los principios activos que éstas contienen permitiría abrir nuevos caminos en la investigación para la obtención de estos productos naturales de manera sintética, contribuyendo a la preservación de la flora autóctona y evitando de esa manera la destrucción innecesaria de plantas con el riesgo de ocasionar la extinción de muchas especies (Gatusso *et al.*, 2004).

Fundamentos de la elección del tema

Algunas especies del género *Mikania* (Asteraceae), vulgarmente conocidas como “guaco”, son empleadas tradicionalmente con fines medicinales como antitusivas, expectorantes y alexíteras, entre otros, en gran parte de Latinoamérica, especialmente Brasil, donde algunas son cultivadas con el propósito de utilizarlas en la formulación de diversos medicamentos fitoterápicos conteniendo extractos de “guaco”.

En la provincia de Buenos Aires crecen seis especies de *Mikania* (Cabrera *et al.*, 2000), entre ellas dos con reconocidas propiedades medicinales: *Mikania micrantha* Kunth y *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd. (Sorarú & Bandoni, 1978; Zardini, 1984; Freire & Urtubey, 1999; Rondina *et al.*, 2003), acerca de las cuales existen datos incompletos respecto a su anatomía y acciones biológicas.

Desde el punto de vista taxonómico, el género *Mikania* es considerado estable por presentar caracteres morfológicos florales constantes, pero las especies son de difícil delimitación (Rejane Ritter & Sfoggia Miotto, 2005). Por lo tanto, la identificación de las especies por medio de caracteres morfológicos tradicionales debe ser complementada por la búsqueda de nuevos caracteres diagnósticos para su correcta determinación, especialmente cuando son utilizadas con fines terapéuticos.

Respecto a su composición química, existe una gran variabilidad en cuanto al tipo y proporción de metabolitos secundarios según el hábitat y condiciones de cultivo, aun dentro de la misma especie, tal como asevera A. Carollo (2008).

Por todo ello, resulta especialmente relevante establecer caracteres anatómicos de diagnóstico de *M. micrantha* y *M. cordifolia*, para un eventual control de calidad, así como establecer su composición química y propiedades farmacológicas a fin de asegurar la uniformidad de sus eventuales preparados medicinales, validando el uso tradicional de estas especies y recuperando así saberes ancestrales.

2.- Antecedentes

2.1.- Familia Asteraceae

La familia Asteraceae Bercht. & J. Presl (1820) corresponde al Orden Asterales, Suborden Asteridae, y está caracterizada por sus inflorescencias racimosas en capítulos, con flores individuales epíginas rodeadas de 1-varias hileras de brácteas involucrales, sobre el receptáculo común en que remata el escapo o rama florífera (Weberling, 1989).



Aster novi-belgii L.

Los orígenes de este grupo de plantas se remontan a 300 años a.C. ya que fue Teofrasto (372-288 a.C.) quien las describió en su obra *De Historia plantarum*. No obstante la familia recién fue fundada con el nombre de Compositae (*nom. cons. Etnom. alt.*) por Paul D.



De Historia Plantarum

Giseke en 1792. El Código Internacional de Nomenclatura Botánica permite también el uso del nombre Asteraceae Dumortier (*nom. cons.*), nombre asignado en 1822 y que deriva del género tipo, *Aster*, término que a su vez proviene del griego *ἀστήρ* que significa estrella y hace alusión a la forma de la

inflorescencia (Katinas *et al.*, 2007).

Las contribuciones más importantes al conocimiento y la sistemática de las Asteraceae comienzan con el francés Henri Cassini a través de numerosas publicaciones durante el período 1812-1831 que incluyen descripciones muy detalladas de su morfología. Otro gran contribuyente al conocimiento de la familia fue George Bentham (1873), quien las trató, junto con Joseph Dalton Hooker, en su monumental obra *Genera Plantarum* (1862-1883). Fue Bentham quien estableció 13 tribus, que son las tradicionalmente usadas hoy.

En Argentina, el gran botánico español Angel Lulio Cabrera (1908-1999) fue quien marcó los estudios en esta familia de plantas. Cabrera y autores subsiguientes se basaron en la clasificación de Bentham (1873) para el tratamiento de Asteraceae en las floras locales. En su Clave para la determinación de géneros de Asteraceae de Argentina, Cabrera (1961) considera dos subfamilias: Tubuliflorae y Liguliflorae con las tribus Anthemideae, Arctotideae, Astereae, Calenduleae, Cynareae, Eupatorieae, Helenieae, Heliantheae, Inuleae, Mutisieae, Senecioneae y Vernonieae, para la primera y la tribu Cichorieae para la segunda.



Angel L. Cabrera (1908-

Esta familia incluye una cantidad de especies útiles desde diversos puntos de vista. El uso etnobotánico de muchas de ellas ha ayudado al progreso y sustento de gran número de pueblos en todo el mundo satisfaciendo sus necesidades de alimento, forraje, leña, medicinas, etc. Desde el punto de vista estrictamente económico, unas 40 especies tienen importancia directa en alimentación humana (hortalizas y “semillas” oleaginosas) e indirectamente por productos obtenidos por la industria. Otras especies silvestres tienen potencial nutricional, muchas son de interés tecnológico u ornamental, y centenares rinden metabolitos secundarios de uso farmacéutico o industrial o aportan néctar y polen para la producción apícola, forraje para la producción ganadera, etc. Muchas son pioneras u oportunistas, y gran número resultan malezas de cultivos y/o tóxicas para el ganado. Además, numerosas especies tienen un rol destacado en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas (Vitto & Petenatti, 2009).

2.1.1.-Distribución geográfica

Es la familia de Fanerógamas con mayor diversidad a nivel mundial. Representa 8-10% de la flora global y abarca 22.750 taxones específicos e infraespecíficos, con 1.620 géneros incluyendo algunos de los más numerosos como *Senecio* (c. 1.250 especies), *Hieracium* (c. 1.000) y *Helichrysum* (c. 600). Es de distribución subcosmopolita, pues está representada en todos los continentes excepto la Antártida y el *hinterland* de Groenlandia. Ocupa hábitats diversos, desde el nivel del mar hasta el límite altitudinal de la vegetación. La mayor diversidad se halla en zonas tropicales, subtropicales y templadas; abundan en biomas de montaña y en regiones áridas y semiáridas. (Vitto & Petenatti, 2009) (Fig. 2.1.)

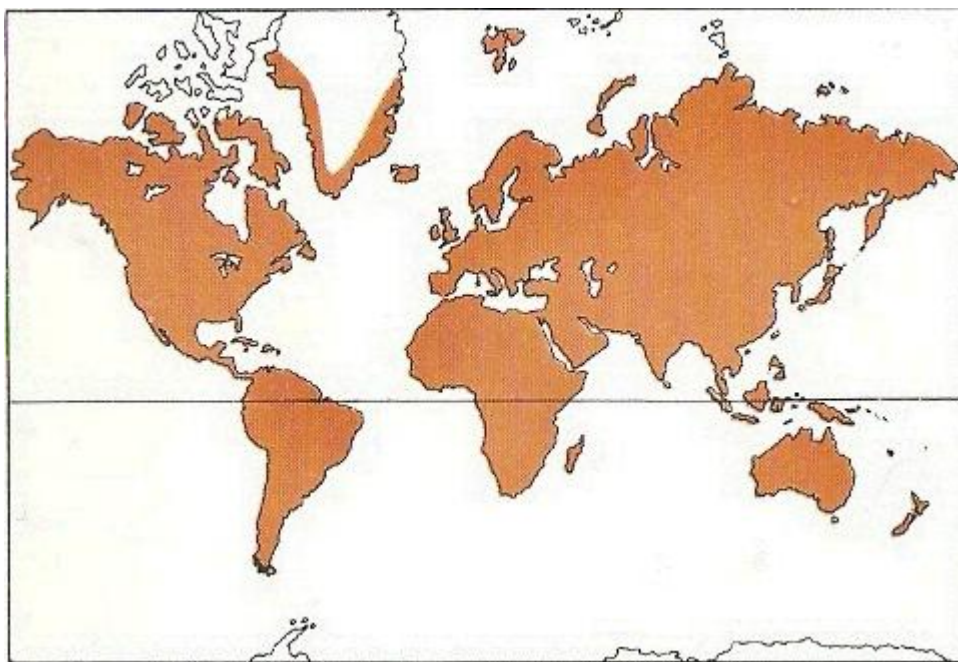


Fig. 2.1. Distribución mundial de la familia Asteraceae (Heywood, 1985)

En Argentina es la más numerosa de las familias de plantas superiores con 1.500 especies y unos 200 géneros, es decir 16% del total de plantas vasculares del país, con 26% de endemismos (Cabrera, 1961; Zuloaga & Morrone, 1999, Zuloaga *et al.*, 1999; Katinas *et al.*, 2007). En sectores andinos y patagónicos constituyen hasta 20% de la flora (Cabrera, 1963; Cabrera, 1976). Interesan tanto por su amplia distribución y abundancia como por la hipótesis que considera la Patagonia como probable lugar de origen de la familia (Katinas *et al.*, 2007; Barreda *et al.*, 2010).

2.1.2.- Antecedentes botánicos

Desde el punto de vista morfológico esta familia se caracteriza por presentar inflorescencias elementales racimosas, pauci a multifloras (raramente unifloras), en capítulos (solitarios o dispuestos en inflorescencias definidas) formados por un receptáculo plano a convexo, a veces cónico, sobre el que se hallan las flores protegidas por un involucre formado por brácteas especializadas (filarias) (Fig. 2.2)

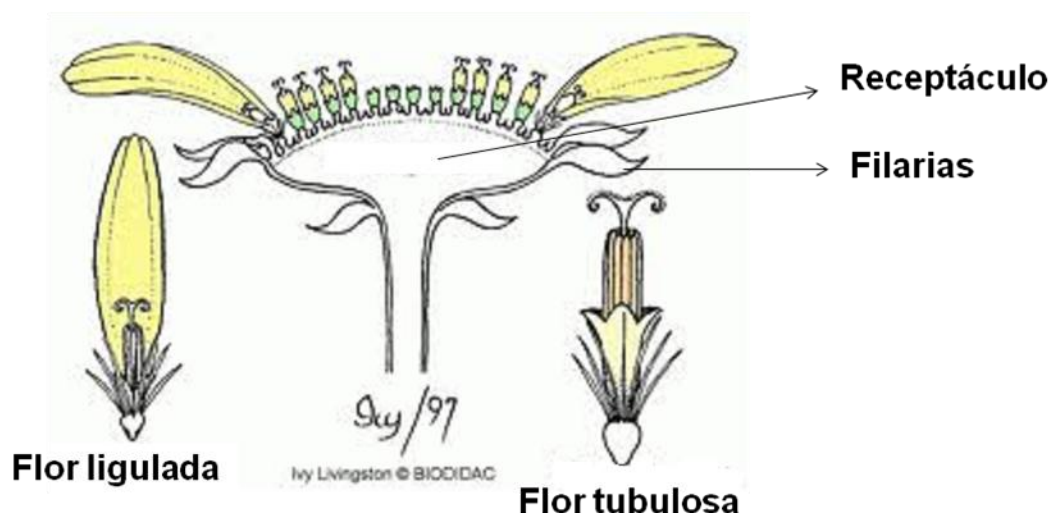


Fig. 2.2 Esquema de un capítulo de Asteraceae

Las flores son epíginas, perfectas, diclinas (pistiladas o estaminadas) o neutras; los sépalos están ausentes o modificados en cerdas, escamas, aristas o pelos simples o ramificados, constituyendo un pappus o vilano; la corola es gamopétala, pentámera,

actinomorfa (tubulosa) o zigomorfa (ligulada, filiforme o bilabiada). El androceo es sinantéreo con cinco estambres epipétalos, el polen es variable y la exina presenta notable esculturación que fija las micrósporas al cuerpo de los polinizadores, aunque en pocos casos están adaptados a la polinización anemófila. El ovario es ínfero, bicarpelar, unilocular, con un solo óvulo anátropo basal, siendo el estilo filiforme, apicalmente dividido en dos ramas estigmáticas papilosas.

Fruto cipsela (aquenio de ovario ínfero), a veces rostrada, a menudo provista de papus persistente o caduco (en aquellos frutos adaptados a la dispersión anemócora), a veces sin él o provista de cerdas espinosas (los adaptados a la dispersión zoócora); semilla no endospermada, con embrión recto y germinación epígea. Plantas herbáceas, o arbustivas, más raramente enredaderas o árboles, con o sin látex. Hojas alternas u opuestas (raramente verticiladas) (Cabrera, 1963).

Desde el punto de vista anatómico Metcalfe & Chalk (1979) caracterizan a la familia por: a) presencia de varios tipos de tricomas glandulares y no glandulares; b) papilas en la epidermis abaxial; c) estomas anomocíticos, anisocíticos y raramente heliocíticos; d) presencia de hidatodos; e) presencia de hipodermis; f) mesofilo homogéneo o heterogéneo y g) haces vasculares con vaina parenquimática compuesta por células grandes. Asimismo, la presencia de cavidades secretoras es de gran interés taxonómico y su ubicación en los distintos órganos de la planta tiene un importante valor diagnóstico (Metcalfe & Chalk, 1950).

2.1.3.- Antecedentes de uso en medicina tradicional.

Muchas especies de esta familia son ampliamente utilizadas en la medicina popular (Amat, 1983). Algunos ejemplos se presentan a continuación (Consolini, 2009):

Bacharis articulata (Lam.) Pers. "carqueja"

- Propiedades farmacológicas: colagogo, hepatoprotector, diurético, antiulceroso, hipocolesterolémico-hipoglucémico, antiséptico de heridas (uso externo).
- Formas de administración: infusión, decocción, extracto fluido.
- Constituyentes químicos: flavonoides



Matricaria recutita L. "manzanilla"

- Propiedades farmacológicas: espasmolítico, demulcente y estomático, antiinflamatorio externo, antiulceroso, ansiolítico, antibacteriano cutáneo y ocular, diurético suave, regulador menstrual.
- Otros usos: quemaduras, bronquitis, úlceras, faringitis, conjuntivitis, ansiedad, hemorroides, acné.
- Formas de administración: infusión, extracto fluido, tintura.



- Constituyentes químicos: apigenina, quercetina, mucílagos, aceites esenciales, bisabolol, bisabolóxido.

Silybium marianum Gaertn. “cardo mariano”

- Propiedades farmacológicas: hepatoprotector, antioxidante, antiinflamatorio-antialérgico.
- Otros usos: alcoholismo crónico, problemas hepáticos.
- Formas de administración: extracto fluido, extracto seco, infusión, tintura
- Constituyentes químicos: silimarina, silibina y flavolignanós.



Echinacea sp. “equinácea”

- Propiedades farmacológicas: Inmunoestimulante, eleva el nivel de interferón, regenerador tisular.
- Constituyentes químicos: polisacáridos de alto PM, compuestos fenólicos, ácido cafeico, ferúlico (cinarina), lactonas sesquiterpénicas, alcaloides, fitoesteroles.



Tanacetum parthenium (L.) Sch.Bip.
“tanaceto”, “migranela”,
“hierba santa”, “altamisa”

- Propiedades farmacológicas: preventivo de la migraña.

- Constituyentes químicos: sesquiterpenos (partenólidos),
esenciales.



flavonoides y aceites

Solidago virgaurea L. “Vara de Oro”

- Propiedades farmacológicas: diurética.
- Formas de administración: infusión.



Cynara scolymus L. “alcaucil”, “alcachofa”

- Propiedades farmacológicas: reduce el colesterol y los triglicéridos.
- Otro usos: colerético, colagogo y protector hepático.
- Formas de administración: extracto fluido, extracto seco.

- Constituyentes químicos: derivados del ácido cafeico (cinarina, clorogénico), flavonoides (apigenina, luteolina) y lactonas sesquiterpénicas.



2.1.4.- Antecedentes fitoquímicos

El conocimiento bioquímico del grupo ha aportado datos relevantes a la taxonomía y ha explicado o facilitado el empleo de las mismas en las actividades económicas (Vitto & Petenatti, 2009). En general, el grupo está caracterizado por la presencia de ácidos iso- y clorogénico, flavonoides, lactonas sesquiterpénicas, alcoholes triterpénicos pentacíclicos, aceites esenciales (con predominio de terpenoides), alcaloides (especialmente pirrolizidínicos, Aniszewski, 2007) y diversos derivados acetilénicos, mientras que carece de taninos verdaderos y de iridoides (Bohlmann, 1977), lo que ubica la familia como una de las más ricas en metabolitos secundarios

Algunos *flavonoides* y *aceites volátiles* (con di- y triterpenos) son comunes a casi todas las especies (Harborne, 1977; Mabry & Bohlmann, 1977; Bohm & Stuessy, 2001) y 2 grupos de sustancias son “marcadores quimiotaxonómicos” de la familia: las *lactonas sesquiterpénicas* y los *compuestos poliacetilénicos* (Bohlmann *et al.*, 1973; Herz, 1977; Mabry & Bohlmann, 1977; Sörensen, 1977; Seaman, 1982).

2.2.- Género *Mikania* Willd.

2.2.1.- Distribución geográfica

Este género de Asteraceae cuenta con alrededor de 450 especies (Holmes, 1996) de distribución pantropical, pero con extensiones en las zonas templadas de América y el sureste de África. Allí hay sólo 7 especies nativas, mientras que en Asia sólo se encuentra *M. cordata* (Burm. f.) B.L. Robinson, la cual se distribuye desde el sudeste de Burma y a través de las zonas tropicales y subtropicales de China. En América del Sur habita en Brasil, Argentina, Paraguay, Uruguay, Bolivia, Perú, Venezuela y Colombia (Cerana, 1997a; Cerana, 1997 b; Rejane Ritter & Sfoggia Miotto, 2005).

Existen dos grandes centros de diversidad del género en América del Sur. El primero, con cerca de 170 especies (150 endémicas), ubicado en Brasil, desde Minas Gerais y Río de Janeiro hasta Paraná y Santa Catarina, extendiéndose a Paraguay, Uruguay y Argentina. El segundo, con cerca de 150 especies (alrededor de 130 endémicas), se encuentra en los países andinos de Colombia a Bolivia (Holmes, 1975). Fuera de estos centros de diversidad, el número de especies se reduce, siendo uno de los pocos géneros de Asteraceae que han logrado el éxito en las tierras bajas de la región amazónica, un área considerada inadecuada para la mayoría de los miembros de la familia (Rejane Ritter & Waetcher, 2004). El hábito predominante es el voluble, pero también se encuentran plantas apoyantes, decumbentes o erectas.

Según estos autores, la función adaptativa del papus en la dispersión del fruto, contribuye al éxito reproductivo de la familia. Los frutos son dispersados por el viento sobre todo, pero también por el agua y los animales. En *Mikania*, la eficiente dispersión de frutos por el viento, sin duda, es uno de los aspectos responsables de la amplia distribución del género en las distintas regiones. Asimismo, se ha observado la dispersión de los frutos a grandes distancias realizada por pájaros, hecho que parece lógico, que por tratarse de un género conocido por su invasión del hábitat de las aves, los árboles, haya aprovechado la oportunidad transportar sus frutos por estos animales (Rejane Ritter & Waetcher, 2004).

En Argentina se encuentra representado por 35 especies que crecen en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Córdoba, Corrientes, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Rioja, Mendoza, Misiones, Salta, San Luis, San Juan, Santiago del Estero, Santa Fe y Tucumán (Katinas *et al.* 2007; Zuloaga *et al.* 2008). En la provincia de Buenos Aires se hallan presentes seis especies (Cabrera *et al.* 2000), de las cuales *Mikania micrantha* Kunth. y *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd. han encontrado un hábitat propicio para su desarrollo en la Reserva Natural Integral de Punta Lara (Moschione & Klimaitis, 1988) y en la Reserva Natural de Uso Múltiple Isla Martín García (Lahitte *et al.*, 1995). (Fig. 2.3)



Fig. 2.3 Ubicación de la Reserva Natural Integral Punta Lara y Reserva Natural de Uso Múltiple Isla M. García

2.2.2.- Antecedentes botánicos



El género *Mikania* es el mayor en cuanto a número de especies de la tribu Eupatorieae y fue descrito por Willdenow en 1804, recibiendo este nombre en homenaje al profesor Joseph Gottfried Mikan. Comprende hierbas perennes o arbustos, generalmente volubles, raras veces erectos, de hojas opuestas

generalmente pecioladas. Capítulos dispuestos en panojas de racimos, de corimbos, de espigas o, rara vez, de cimas, compuestos de 4 flores y un involucre compuesto de 4 filarias que son envueltas por una bráctea subinvolucral. Corolas blancas, rosadas o verdosas amarillentas (Cabrera, 1963). No existen variaciones de esta organización básica y las diferencias entre especies incluyen principalmente la forma de agrupamiento de los capítulos, el porte, la forma de los órganos y la textura de la planta (Holmes, 1975).

Descripciones morfológicas del género se pueden hallar en los trabajos de Cerana, 1996; Freire *et al.*, 1999; Rejane Ritter & Sfoglia Miotto, 2005; Freire *et al.*, 2006, entre otros. En tanto que caracterizaciones anatómicas de los órganos vegetativos de diferentes especies tales como: *M. cordifolia*, *M. glomerata* Spreng. , *M. hirsutissima* DC, *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, entre otras, han sido reportados por diferentes autores, tales como: Oliveira *et al.* 2000, Boeger *et al.*, 2006; Milan *et al.*, 2006; Budel *et al.* 2009; Ceolin *et al.*, 2009; Espíndola Junior *et al.*, 2009.

Cabe destacar que luego de efectuar exhaustivas revisiones bibliográficas, no se han podido encontrar trabajos acerca de las características anatómicas de hojas ni tallos de *M. micrantha*, por las cuales éstas son descritas por primera vez en el presente trabajo.

2.2.3.-Antecedentes de uso en medicina tradicional.

Varias especies del género (incluidas las tratadas en el presente trabajo) son utilizadas en medicina tradicional por parte de la población, especialmente en algunos países de Latinoamérica como Brasil:

- ✓ *Mikania glomerata* y *Mikania laevigata*:

Conocidas vulgarmente como “guacos” son utilizadas por la medicina tradicional brasileña para tratar problemas respiratorios. Ambas especies figuran en la Farmacopea Brasileña: en 1942, en la 1ª Edición escrita por Pio Correa, se recomendaba *Mikania glomerata* para tés y jarabes expectorantes, debido a su riqueza en cumarina. *Mikania laevigata* se describe en el sexto fascículo de la 4ª Edición (Farmacopea Brasileña, 1996). Por esta razón en este país son encontradas en muchas preparaciones de productos fitoterápicos comerciales. Las indicaciones para asma y bronquitis son, probablemente, debidas a sus propiedades broncodilatadoras (Lopes, 1997; Soares, 2002), habiéndose



reportado a *M. glomerata* con actividad analgésica (Ruppelt *et al.*, 1991). También esta especie cuenta con largo uso por parte de los habitantes de la selva. Los indios brasileños la utilizan ancestralmente para las mordeduras de serpiente, preparando un té con las hojas y bebiéndolo o aplicándolo directamente éstas o el jugo del tallo rápidamente sobre la herida. Por esta razón y debido a su historial como remedio antiofídico, se ganó el apelativo de "hierba de la serpiente".

- ✓ *M. cordata* (Burm. f.) BL Robinson:

La decocción de sus hojas es usada en medicina tradicional para el tratamiento de dispepsia, disentería y úlcera gástrica (Carollo, 2008).

✓ *M. periplocifolia* Hook et Arn.:

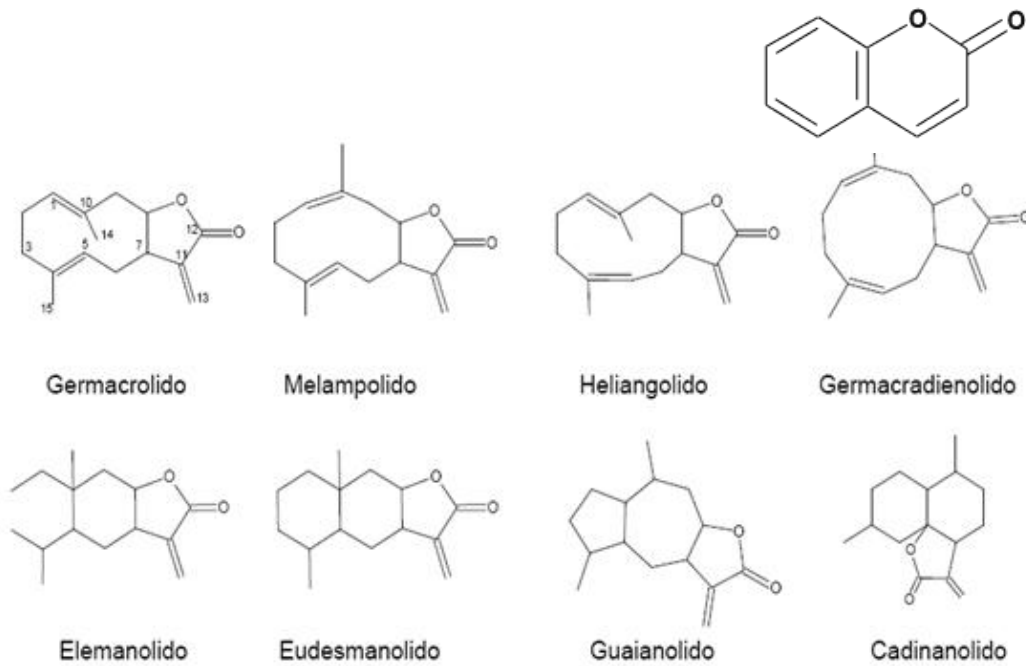
Ha sido usada ancestralmente por los indios guaraníes, en tanto que Hyeronimus en 1882 la citó entre las especies con capacidad antiofídica, siendo ello luego confirmado por otros autores. Popularmente se emplea como expectorante, alexifármaco (frente a mordeduras de víboras y picaduras de insectos), febrífugo, antigotoso, diurético, sedante y antirreumático (Alonso & Desmarcheliers, 2005).

2.2.4.- Antecedentes fitoquímicos

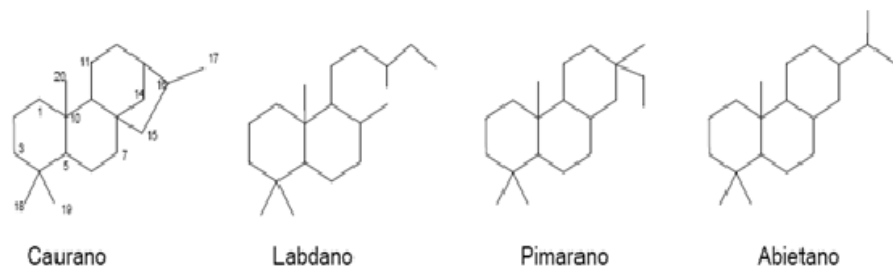
Entre las clases de compuestos químicos encontrados en el género *Mikania* se destaca la presencia de lactonas sesquiterpénicas y diterpenos (Lobitz *et al.*, 1997). Herz (1998), en una revisión sobre el género, refiere la ocurrencia de lactonas u otros terpenos en *Mikania*, destacando las *Mikania*s del complejo *scandens*, donde se encuentran dilactonas sesquiterpénicas de tipo mikanólido, las cuales, además de la lactonización en C-6 o C-8, también poseen una lactonización en C-14. Lactonas de tipo germacrólidos, funcionalizadas en C-14 o C-15 o en ambos, son los metabolitos secundarios típicos de un gran número de especies del género, así como diterpenos con esqueleto caurano. En la mayoría de los estudios efectuados no se observa una gran variación en cuanto a la ocurrencia de estos tipos de compuestos químicos. En *M. saltensis* Hieron. y *M. haenkeana* DC. se encontraron lignanos, un compuesto químico no común en especies de pequeño porte, ya que está asociado a especies leñosas.

Tipos de lactonas sesquiterpénicas y diterpenos encontrados en el género *Mikania*

Lactonas sesquiterpénicas



Diterpenos



Dentro de los compuestos fenólicos se puede hallar la presencia de cumarina (1,2-benzopirona) en varias especies, constituyendo el marcador químico en *M. cordata* y *M. laevigata*.

Los flavonoides, compuestos muy comunes en la familia Asteraceae, también se encuentran presentes en especies del género, en forma de heterósidos.

Otra clase importante de compuestos químicos común en este género, tal como acontece en la familia, son los aceites volátiles. Estos compuestos son reconocidos por su gran importancia dentro de los ecosistemas, donde están relacionados a diversas funciones de regulación: atracción de insectos polinizadores, repelente de herbívoros, alelopatías, protección contra pérdida de agua, entre otros. En *Mikania* estos aceites están presentes en diversas especies y en alguna fueron estudiadas sus actividades biológicas. El aceite volátil de *M. cordata* mostró actividad analgésica y antiinflamatoria, *M. glomerata*, antifúngica y el de *M. micrantha*, alelopática e insecticida. También existen estudios sobre la composición química de estos aceites, los que revelan la presencia en todos ellos de sesquiterpenos y monoterpenos (Carollo, 2008).

2.3. *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd.



***M. cordifolia*, Isla Martín García
(foto S. Martínez)**

Sinónimos

Cacalia cordifolia L. f., *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd. var. *tomentosa*, *Mikania gonoclada* DC. (Zuloaga & Morrone on line)

Nombres vulgares

“guaco”, “erva-de-cobra”, “erva-de-sapo”, “coração de Jesús” (Brasil); “matacampo”, “pompero kocho”, “ysipo kati” (Paraguay); “guaco” (Chaco); “nakoló letaá” (pilagá) (Corrientes); “palotr’oik” (mocoví) (Cerana 1997).

2.3.1.-Distribución y hábitat

Esta especie se extiende desde el sur de los Estados Unidos de América por las regiones tropicales y subtropicales de América. En la República Argentina crece en el norte y centro del país llegando hasta el Delta del Paraná (Isla Martín García y provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, La Rioja, Santiago del Estero, Córdoba, Formosa, Chaco, Santa Fe, Misiones, Corrientes, Entre Ríos y Buenos Aires). Habita bosques, sabanas, parques, bordes de selva, matorrales arbustivos. Se la encuentra frecuentemente a orillas de ríos y arroyos, en alambrados y cercos. Olorosa y fragante, es visitada por abejas. Los registros de floración se ubican entre los meses de marzo y mayo (Cerana, 1997).

2.3.2. Descripción morfológica

De acuerdo con Cerana (1997) esta especie es una enredadera con tallos jóvenes delgados, hexacostados, tomentosos a glabros; los basales gruesos, hasta de 2-3cm de diámetro. Hojas opuestas, pecioladas, con pecíolos de 1,5-5cm long y láminas aovadas o acorazonadas, de ápice agudo, denticuladas, levemente discolores, de 2-12cm long x 1,5-10cm lat. Estípulas setiformes inconspicuas o ausentes. Capítulos ordenados en cimas corimbiformes compuestas, terminales y axilares. Bractéolas pubescentes, angostamente elípticas, de 4,5-5mm long x 1,3-1,5mm lat. Brácteas involucrales lanceoladas, pubescentes, agudas, de 6-9mm long x por 1,5-2mm lat. Flores blancas, bilabiadas, de 4,5-6mm long; tubo de 1,7-2,7mm long y limbo corolino infundibuliforme de 2,8-3,4mm

dividido en lóbulos lanceolados con márgenes ondulados de distinta longitud, los internos de 1,3-2mm y el diente externo, de 1,7-2,5mm. Aquenios laxamente pubescentes, con los bordes ciliados, de 3,5-5mm. Pappus amarillento, ferrugíneo o rosado, formado por 50-70 aristas escábridas, aproximadamente de 4,5mm long.

Existen antecedentes en la bibliografía de descripciones anatómicas de tallos y hojas (Oliveira *et al.*, 2000; Ceolin *et al.*, 2009).

2.3.3.-Antecedentes de usos en la medicina tradicional y actividades biológicas

Mikania cordifolia ha sido utilizada para tratar problemas respiratorios (Carollo, 2008) y desde antiguo es usada por los habitantes de las selvas tropicales de América para tratar mordeduras de serpientes (Mors *et al.*, 2000). También se cita como antiofídica, antirreumática, antiinflamatoria, analgésica y utilizada en lavajes en casos de enfermedades venéreas (Lahitte & Hurrell, 2000). En cuanto a las actividades biológicas descritas para esta especie se pueden incluir antitricomoniásicas, antitrypanosomal e insecticida (Arias *et al.* 1995; Muelas-Serrano *et al.* 2000), como así también actividad antiinflamatoria (Pelusso *et al.*, 1995).

2.3.4.-Antecedentes fitoquímicos

Desde el punto de vista químico se ha señalado en esta especie la presencia de diterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanoides. En trabajos recientes, (Carollo *et al.*, 2007; Carollo, 2008) se han identificado como compuestos mayoritarios en las fracciones polares derivados fenilpropanoicos, destacándose el ácido fertárico, mientras que en las fracciones apolares fue verificada la presencia de triterpenos. Lactonas sesquiterpénicas con esqueleto melampólido también fueron aisladas.

2.4. *Mikania micrantha* Kunth



***M. micrantha*, Reserva Punta Lara
(foto P. Ramos)**

Sinónimos

Mikania glechomaefolia Sch. Bip. ex Baker, *Mikania orinocensis* Kunth, *Mikania scandens* (L.) Willd. var. *subcymosa*, *Mikania scandens* (L.) Willd. var. *umbellifera*, *Mikania subcrenata* Hook. & Arn., *Mikania subcymosa* Gardner, *Mikania umbellifera* Gardner (Zuloaga & Morrone on line).

Nombres vulgares

“Pompero kocho” (Paraguay); “charrúa,” bejuco” (Buenos Aires); “isipó” (Misiones) (Cerana, 1997).

2.4.1.-Distribución y hábitat

Especie ampliamente distribuida en la América tropical y subtropical desde Norteamérica (excluyendo Florida, USA) hasta el norte y noreste de la República Argentina (Ciudad Autónoma de Buenos Aires y provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Corrientes, Chaco, Misiones, Jujuy, Salta y Tucumán). Asimismo, es la única especie del género de origen americano introducida y naturalizada en las zonas tropicales del Viejo Mundo, excepto África. En nuestro país habita bosques en galería, selvas, matorrales, bordes de montes, orillas de ríos y embalsados. Con flores fragantes, florece y fructifica de manera esporádica durante todo el año, preferentemente en los meses de marzo a mayo (Cerana 1997).

2.4.2.-Descripción morfológica

Es esta especie una enredadera perenne, con tallos multiestriados glabrescentes. Hojas opuestas, pecioladas, con pecíolos de 1,5cm long y láminas aovado-acorazonadas, de base hastada o hastado-acorazonada, sagitada o sagitado-acorazonada, ápice acuminado, mucronado, margen regularmente crenado de 2-10cm long x 1,5 a 8cm lat; aparentemente glabras o glabrescentes. Estípulas foliáceas reducidas y caedizas. Capítulos en cimas compuestas corimbiformes, axilares y terminales. Bractéolas linear-lanceoladas o angostamente elípticas, agudas, enteras, glabras o ligeramente pubescentes de 2,8-3,5

mm long x 0,8-1mm lat y brácteas glabras, oblongas u oblanceoladas, agudas, de 4-5mm long x 1 mm lat. Flores blancas de 2,5-3,5mm long con el limbo de la corola campanulado, dividido en dientes triangulares de aproximadamente 5mm, con diminutos pelos glandulares esparcidos. Aquenios glandulosos de 1,5-2,2mm long, provistos de papus blancuzco o blanco, con 35-40 aristas escábridas .

A diferencia de *M. cordifolia*, , no se han podido encontrar en la literatura reportes acerca de las características anatómicas de las hojas o los tallos de esta especie, como ya ha sido mencionado en párrafos anteriores.

2.4.3. Antecedentes de usos en la medicina tradicional y actividades biológicas

Componentes aislados de extractos de *M. micrantha* son usados en la medicina popular por su actividad antibacteriana (Facey *et al.*, 1999) y antifúngica (Lentz *et al.*, 1998). También son empleados para contrarrestar el efecto del veneno en los casos de accidentes ofídicos (Castro *et al.*, 1999). Los órganos utilizados son especialmente los tallos y las hojas, los cuales se preparan en forma de infusión, decocción o tinturas. En Brasil son ampliamente utilizados para el tratamiento de diversos tipos de afecciones por sus propiedades antirreumática, antiespasmódica, diaforética, antiinflamatoria y como un bálsamo para las vías respiratorias por ser un eficaz expectorante y broncodilatador, constituyendo un medicamento popular bastante empleado, sobre todo en Río Grande do Sul. En la Guayana Francesa su decocción es usada contra la viruela y antiguamente fue intensamente utilizada en Cuba para combatir el cólera (Corrêa, 1984; Ferriani *et al.*, 2007).

2.4.4. Antecedentes fitoquímicos

En trabajos realizados acerca de la composición química de esta especie se mencionan la presencia de compuestos fenilpropanoicos, destacándose el ácido 3,5 dicafeoilquínico, además de flavonoides sulfatados aislados en las fracciones polares, en tanto que en las fracciones apolares fue verificada la presencia de derivados del ácido caureonico. También fueron encontradas lactonas sesquiterpénicas con esqueleto micranólido (Cuenca *et al.*, 1988; Carollo, 2008). En un trabajo más reciente, But *et al.* (2009), aislaron nuevos compuestos, entre los que se destaca mikanian 3 sulfato de potasio, el cual exhibe actividad inhibitoria contra el virus tipo 3 de la parainfluenza.

2.4.5. *Mikania micrantha* “milla por minuto”: maleza invasora de Asia

Mikania micrantha, conocida como “milla por minuto” está considerada una de las 10 peores malezas de Asia y figura en la lista dentro de las 100 especies exóticas más invasivas del mundo según el Grupo de Especialistas en Especies de la UICN (Lowe *et al.*, 2001)

Esta especie fue introducida en el sur de Asia inicialmente para ser usada como camuflaje de los aeródromos durante la Segunda Guerra Mundial. Así sus semillas se han propagado a muchas otras islas de la región, incluyendo las Filipinas, Hong Kong y las Islas de Indonesia, al oeste de Isla Mauricio y de allí a Papúa, Nueva Guinea. En 1998, la maleza fue descubierta en Queensland, Australia, encontrándose ahora en matorrales, zonas ribereñas, regiones perturbadas, bosques naturales, plantaciones y zonas húmedas de países tropicales y subtropicales.

Una eficiente reproducción sexual y la multiplicación vegetativa a través de sus tallos han favorecido su expansión e invasividad. Así, las semillas pueden ser dispersadas por animales o por el viento, y una vez germinadas, los brotes pueden, crecer hasta 8-9 cm por día, lo que es alarmantemente rápido, de allí su nombre coloquial. Una sola planta es capaz de cubrir 25 metros cuadrados en unos pocos meses y puede producir hasta 40000 semillas anualmente.



http://www.brother.com/library/websites/www.com/en/eco/biodiversity/img/bio_img_07.jpg

Removing *Mikania micrantha* at Qiushuishan Park (China)

Al reproducirse vegetativamente la descendencia también tiene un vigoroso crecimiento. Las condiciones óptimas para ello son humedad, luz solar, la materia orgánica, el nivel de nutrientes y humedad del suelo. Los tallos se entrelazan a cualquier soporte vertical: cercas, paredes y árboles, ahogando a las plantas, mediante el desarrollo de capas de hojas alrededor de las ramas que compiten con su hospedante por luz, agua y nutrientes. También liberan inhibidores del crecimiento que afectan a otros arbustos y árboles, reduciendo así la competencia, afectando en gran medida las comunidades microbianas del suelo (Hongjuan *et al.*, 2009). Ha estado presente en el sur de China desde 1980 y ha causado impactos negativos en la producción agrícola de muchas zonas de Asia. Así se ha convertido en la India en una de las peores malezas para el té, ha dañado las plantaciones de caucho en Malasia, de coco en Samoa, causando también con frecuencia problemas en el banano, cacao y plantaciones de palma aceitera.

Los herbicidas siguen siendo el método más confiable para su erradicación, pero es un candidato ideal para el control biológico con enemigos naturales introducidos, ya que rara vez es maleza en su lugar de origen, donde se considera que éstos ejercen una presión significativa sobre la presencia y abundancia de la especie. En ese sentido, los primeros ensayos fueron efectuados usando un trip, *Liothrips mikaniae*, el cual, desafortunadamente falló en su establecimiento en el campo. Sin embargo los hongos patógenos, tal como la roya *Puccinia spegazzini* de Toni, también han sido investigados como agentes de control biológico, empleándose para el control de *Mikania micrantha* en India en cultivos de te, con resultados positivos (Ellison *et al.*, 2008).



Hojas de *Mikania micrantha* infectadas con *P. spegazzinii*

3.- Objetivos

3.1.- Objetivo general

El trabajo de investigación se encuentra dirigido al estudio anatómico y farmacognóstico de *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd y *Mikania micrantha* Kunth, dos especies de Asteraceae nativas, que se hallan distribuidas en varias provincias de la República Argentina, entre ellas Buenos Aires, donde crecen abundantemente en la Reserva Natural Integral de Punta Lara y en la Reserva Natural de Uso Múltiple Isla Martín García. Estas especies tienen reconocidas propiedades medicinales siendo usadas en medicina popular, lo que las hace potencialmente útiles para la elaboración de medicamentos fitoterápicos, tal como ocurre en otros países latinoamericanos, por ejemplo Brasil. Por ello resulta de interés establecer las características macro y micromorfológicas que aseguren su identificación botánica, así como la definición de perfiles cromatográficos para el reconocimiento de su composición química.

El **objetivo general** es validar el uso tradicional de estas especies, de modo de contribuir a la revalorización de la flora autóctona argentina, para su mejor aprovechamiento medicinal o alimenticio.

3.2.- Objetivos específicos

- Efectuar estudios anatómicos del tallo, lámina y pecíolo de ambas especies.
- Determinar, mediante técnicas histológicas, caracteres micrográficos con valor diagnóstico que permitan su identificación cuando la droga se comercializase en polvo.
- Efectuar el estudio fitoquímico de las partes aéreas de ambas especies, tratando de caracterizar grupos de compuestos que permitan justificar su uso tradicional y desarrollar métodos analíticos para su control de calidad.

- Definir perfiles cromatográficos para el reconocimiento de su composición química.
- Evaluar la actividad biológica (a nivel gastrointestinal) de los extractos a fin de establecer su potencial como fuente de nuevas moléculas activas o su utilización como fitoextractos.
- Analizar en base a los resultados obtenidos su posible utilización como materia prima en la elaboración de medicamentos fitoterápicos seguros y eficaces.

4.- Materiales y métodos

4.1.1.- Procedencia

Las plantas de *M. micrantha* fueron recolectadas entre los meses de noviembre de 2008 y febrero de 2009 en la Reserva Natural Integral de Punta Lara, Partido de Ensenada, Provincia de Buenos Aires, en tanto que los ejemplares de *M. cordifolia* se recolectaron en la Reserva Natural de Uso Múltiple Isla Martín García, Partido de La Plata, Provincia de Buenos Aires en el mes de diciembre de 2009.



Punta Lara (Foto P.Ramos)



Isla Martín García
(Foto S. Martínez)

4.1.2.- Recolección y acondicionamiento del material vegetal

Para el desarrollo del trabajo se utilizó material fresco consistente en tallos tiernos con hojas. Un ejemplar de cada especie fue herborizado y depositado en el Herbario (LPAG) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, UNLP (Holmgren *et al.*, 1990).

4.1.3.- Determinación taxonómica

El material vegetal recolectado fue determinado en el Área de Botánica de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP.

4.1.4.- Acondicionamiento del material vegetal

Para el estudio de la anatomía, el material fresco se fijó en FAA (solución de formalina: ácido acético glacial: alcohol etílico 50%, 5:5:90).

Para los estudios fitoquímicos, el material recolectado fue secado en estufa con convección forzada de aire a 40° C y molido a polvo grueso.

4.2.- Caracteres anatómicos

Se emplearon hojas en completo estado de desarrollo. La exomorfología foliar fue examinada con un microscopio estereoscópico Wild M8. Los estudios epidérmicos fueron hechos sobre ambas caras de la lámina, en la parte media del semilimbo y sobre ambos lados de la vena media, empleando las hojas transparentes obtenidas aplicando la técnica de diafanización de Dizzeo de Stritmatter (1973) de acuerdo al siguiente protocolo:

1. El material previamente fijado en FAA, se colocó en un vaso de precipitado con alcohol 96° y se llevó a ebullición 10 minutos.

2. Transcurrido ese tiempo se pasó a una solución de alcohol 96° y NaOH al 5% en partes iguales. Se llevó a ebullición durante un minuto.
3. Se efectuaron varios lavados hasta que el agua quedó totalmente limpia.
4. Se pasó el material lavado a agua destilada y se efectuaron dos cambios.
5. El material se introdujo en una solución de NaClO al 50% y se dejó hasta tornarse transparente.
6. Se pasó a agua destilada y se efectuaron 5 cambios de 3 minutos cada uno.
7. El material se colocó en Hidrato de Cloral (5 gr en 100 ml de agua destilada) el tiempo necesario hasta quitarle opacidad.
8. El material transparente de hoja fue lavado, coloreado con solución alcohólica de safranina O al 80% y montado con gelatina glicerina.

Estos preparados permitieron analizar la distribución de estomas y tricomas en la parte media y sobre ambas caras de la lámina y establecer sus dimensiones. Las medidas de los estomas (longitud x latitud) y longitud de los tricomas (tomados al azar) se obtuvieron en la parte media del semilimbo, haciendo uso de un microscopio Nikon equipado con ocular micrométrico. Las medidas producto de 50 repeticiones son expresadas en micrómetros (μm).

Los recuentos de células epidérmicas, estomas y células en empalizada permitieron establecer los valores numéricos proporcionales correspondientes a los índices de estomas (Salisbury, 1927) y de empalizada (Zorning & Weiss, 1925). Por último se realizó la descripción de la vascularización siguiendo a Hickey (1974). Los dibujos semiesquemáticos fueron realizados con tubo de dibujo empleando la simbología de Metcalfe & Chalk (1950).

Determinación de valores numéricos o magnitudes proporcionales

Determinación del índice de estomas

Salisbury (1927) definió al índice de estomas como la relación existente ente el número de estomas y el número total de células por unidad de superficie.

$$\text{Índice de estomas} = \frac{n^{\circ} \text{ de estomas}}{n^{\circ} \text{ de estomas} + n^{\circ} \text{ de células epidérmicas}} \times 100$$

Se trabajó sobre 10 muestras de hojas diafanizadas en completo estado de desarrollo de *M. cordifolia* y 10 de *M. micrantha*, en 10 campos distintos y seleccionados en ambas caras de la lámina, en la parte media del semilimbo y sobre ambos lados de la vena media. Los campos observados fueron dibujados mediante el tubo de dibujo. En el recuento de las células epidérmicas y estomas, aquellos ubicados en el borde del área de observación y con menos de la mitad dentro del área, no fueron considerados.

Determinación del Índice de empalizada

$$\text{Índice de empalizada} = \frac{n^{\circ} \text{ células empalizada}}{4 \text{ células epidérmicas}} \times 100$$

Esta magnitud representa el promedio de células en empalizada que aparecen por debajo de cada célula epidérmica. Se obtiene contando el número de células en empalizada que se encuentran debajo de cuatro células epidérmicas y dividiendo por cuatro.

Se efectuaron observaciones microscópicas sobre la cara adaxial de la hoja, de 4 campos tomados en la mitad del limbo y a ambos lados de la vena media de 10 hojas diafanizadas de cada especie. De esta manera, las células en empalizada aparecen como pequeños círculos por debajo de las células epidérmicas.

Todos los valores obtenidos de cada parámetro se expresaron en rangos, promedio, moda (Mo) y desviación estándar (s).

Para el estudio de las estructuras de tallo, lámina y pecíolo, se efectuaron cortes transversales y longitudinales con micrótopo rotativo Minot; la inclusión en parafina se

realizó según Johansen (1940) y se utilizó coloración metacromática con violeta de cresilo (D'Ámbrogio de Argüeso, 1986).

También fueron realizados cortes a mano alzada. En este caso, las secciones logradas fueron decoloradas con hipoclorito de sodio al 50% y lavadas para seguir dos caminos: (1) una parte de las secciones decoloradas se montaron en gelatina-glicerina incolora; (2) otra parte de las secciones se colorearon con safranina O en solución alcohólica al 80% para luego montarlas en gelatina-glicerina.

4.3.- Ensayos fitoquímicos preliminares

4.3.1.- Preparación de los extractos

* **Extracción con solventes de polaridad creciente** (Sharapin, 2000)

El material (tallos tiernos con hojas) seco y molido (115 g de *M. micrantha* y 580 g de *M. cordifolia*), fue extraído a temperatura ambiente con diclorometano (DCM), durante 48 horas con agitación frecuente. Luego de este tiempo se repitió el procedimiento. Los extractos se filtraron por papel y se reunieron.

El marco de la extracción anterior se dejó secar a temperatura ambiente y se volvió a extraer con metanol (MeOH) como segundo solvente de extracción, procediendo de igual manera que con el solvente anterior. Los solventes utilizados fueron solventes Merck grado analítico.

Los solventes fueron evaporados a presión reducida en un evaporador rotatorio Heidolph y el rendimiento fue calculado en gramos de extracto/100 gramos de planta seca.

Con los extractos así obtenidos se efectuaron los ensayos químicos y cromatográficos preliminares.

* **Extracción acuosa**

100g de material seco y molido de ambas especies, fueron extraídos con agua, mediante una decocción durante 15 minutos. El extracto acuoso así obtenido se liofilizó

en un equipo liofilizador L-T4 Rificor. Sobre este liofilizado se efectuaron ensayos químicos y cromatográficos preliminares y los ensayos de actividad gastrointestinal.

4.3.2.- Pruebas químicas

Alícuotas de los extractos DCM, MeOH y acuoso obtenidos en 4.3.1 fueron retomados con sus correspondientes solventes y sometidos a una serie de ensayos químicos destinados a poner de manifiesto la presencia de grupos fitoquímicos (Domínguez, 1973; W. H. O., 1998).

* Caracterización de flavonoides: (aplicadas a los extractos acuoso, DCM y MeOH)

- Reacción de Shinoda
- Reacción con Cl_3Fe al 2% en EtOH y observación visible
- Reacción con Cl_3Al al 2% en EtOH y observación visible y UV366
- Reacción con H_3BO_3 al 2% en EtOH y observación visible y UV366
- Reacción con KOH al 1% en EtOH y observación visible y UV366

* Caracterización de alcaloides: (aplicadas a los extractos acuoso, DCM y MeOH)

- Reacción de Dragendorff (yodo-bismutito de potasio)
- Reacción de Mayer- Valser (solución acuosa de tetra-yodomercuriato de potasio)
- Reacción de Bouchardat (solución acuosa de yodo en yoduro de potasio)
- Reacción de Marmé (yoduro de cadmio en solución acuosa de yodo en yoduro de potasio)
- Reacción con ácido pícrico al 1%
- Reacción con ácido tánico al 1%
- Reacción con SO_4H_2 al 10%

4.3.3.- Cromatografía en capa delgada (CCD)

(Bodok *et al.*, 2005)

4.3.3.1.- Fase estacionaria

A. Cromatofolios de silicagel 60 GF 254, 0,25 mm, Merck (Alemania)

4.3.3.2.- Fases móviles utilizadas

Las mismas se visualizan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Fases móviles utilizados para CCD del extracto diclorometánico (DCM), metanólico y acuoso.

Fase	Solventes	Proporción
I	Tolueno/ Éter etílico saturado en Ácido acético al 10%	1:1
II	Tolueno/ Acetato de etilo	7:3
III	Tolueno/ Acetato de etilo	9:1
IV	Diclorometano/ Metanol	99:1
V	Diclorometano/ Metanol	95:5
VI	Cloroformo/ Metanol	95:5
VII	Acetato de etilo/ Ácido fórmico/ Ácido acético/ Agua	100:11:11:26
VIII	Acetato de etilo/ Metanol/ Agua	100:13:10
IX	Tolueno / Acetato de etilo / Dietilamina	70: 20: 10
X	Cloroformo / Dietilamina	90: 10

4.3.3.3.- Detección

Los reveladores utilizados en las CCD fueron:

- i.- Observación a la luz ultravioleta de 254nm y 366 nm + vapores de NH₃
- ii.- Pulverización con reactivo de productos naturales (éster del ácido 2-amino etil difenil bórico al 1% en metanol)+ calor y posterior observación al visible y al UV 366
- iii.- Pulverización con Anisaldehído sulfúrico y calentamiento en estufa a 120°C durante 5 minutos. Observación al visible.
- iv.- Pulverización con Hidróxido de potasio al 5%
- v.- Pulverización con solución diclorometánica al 1% de β-caroteno. -Observación al visible a tiempo 0, 30 y 60 minutos.
- vi.- reactivo de Dragendorf. Observación al visible

4.3.3.4- Testigos utilizados

Para el análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) se utilizaron con fines comparativos los compuestos:

Flavonoides: rutina (Rt), quercetina (Q)

Fenil propanoides: Acido clorogénico (Cl)

Alcaloides: clorhidrato de pilocarpina (Merck)

Los testigos de flavonoides y fenilpropanoides fueron gentilmente provistos por la Dra. Silvia Debenedetti (Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Ciencias. Exactas, UNLP)

4.3.3.5.- Sistemas cromatográficos utilizados para los distintos extractos

Los sistemas cromatográficos utilizados para examinar los extractos obtenidos, surgen de la combinación de fases estacionarias, fases móviles y sistemas de detección descriptos en los ítems anteriores.

Se detallan en las siguientes tablas:

Tabla 4.2. Sistemas cromatográficos utilizados para CCD del extracto diclorometánico

Sistemas cromatográficos	Fase estacionaria	Fase móvil	Revelador
1	A	I	i, ii, iii,iv
2	A	II	i, ii, iii
3	A	III	i, iii, vi
4	A	IV	i, iii vi
5	A	IX	i, vi
6	A	X	i, vi

Tabla 4.3. Sistemas cromatográficos utilizados para CCD del extracto metanólico

Sistemas cromatográficos	Fase Estacionaria	Fase Móvil	Revelador
5	A	I	i, iv
6	A	III	i, iii

7	A	VII	i, ii
5	A	IX	i, vi
6	A	X	i, vi

Tabla 4.4. Sistemas cromatográficos utilizados para la CCD del extracto acuoso

Sistemas cromatográficos	Fase Estacionaria	Fase Móvil	Revelador
8	A	VII	i, ii
9	A	II	i
10	A	V	i
5	A	IX	i, vi
6	A	X	i, vi

4.3.4.- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD):

Se realizaron en un cromatógrafo Waters 2695, con detector de arreglo de diodos 996 (HPLC-DAD).

Los cromatogramas se registraron a 280 nm. El UV de los compuestos se midió entre 205-400 nm (PDA)

Fase estacionaria: columna pre-empacada analítica Phenomenex Luna C18 (2) (250 x 4,6 mm, 3 μ m)

Fase móvil: **A:** H₂O con ácido fórmico al 0,5%, pH 2,43; **B:** Acetonitrilo.

Sistema de gradiente lineal: 95:5 a 0:100 en 58 minutos. El sistema permanece en equilibrio con 100% de la fase A, durante 8 min antes de cada inyección.

Flujo: 0,50 ml/min

Volumen de inyección: 5 μ l

Detector: UV λ_{\max} 280 nm con arreglo de fotodiodos.

Análisis de los extractos por HPLC-DAD:

Muestras (5 μ l) de los extractos diclorometánico y metanólico al 1% en MeOH al 70%, de parte aérea de *M. micrantha* y *M. cordifolia*, se cromatografiaron por HPLC con arreglo de fotodiodos, en las condiciones descritas anteriormente.

Los Rt y espectros UV de cada pico, fueron analizados en forma comparativa, cotejándolos con datos bibliográficos, a fin de tener un panorama orientativo preliminar acerca de los grupos fitoquímicos presentes.

4.4.- Actividades

4.4.1.-Actividad farmacológica a nivel gastrointestinal

4.4.1.1.- Extractos utilizados

A partir del material vegetal seco y molido de ambas especies, se efectuaron sendas decocciones al 20% (Farmacopea Argentina VII Ed., 2003), las cuales se liofilizaron y a partir de ellos se prepararon las diluciones utilizadas para los ensayos farmacológicos (concentraciones de 30, 100 y 300 mg de liofilizado/mL solución acuosa).

4.4.1.2.-Animales y preparados utilizados en los estudios farmacológicos

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 200-250 g. mantenidas en el bioterio de la cátedra de Farmacología de la Facultad de Ciencias Exactas de UNLP, bajo condiciones controladas con 12 horas de ayuno y agua ad libitum. Los animales anestesiados con éter etílico se sacrificaron y se aislaron los íleons, cortados en trozos de 2 a 3 cm de longitud. Éstos se colocaron en cubas de doble camisa termostatizadas a 37°C, que contenían 20 mL de solución Tyrode y burbujeo constante de aire, determinándose un pH 8.2.

4.4.1.3.- Soluciones empleadas

- Solución Tyrode (Livingstone, 1970): NaCl 8 g/l, KCl 0.2 g/l, MgSO₄.7H₂O (10%) 2.6 mL/l, NaH₂PO₄.2H₂O (5%) 1.3 mL/l, glucosa 1g/l, NaHCO₃ 1g/l, CaCl₂ (1 M) 1.8mL/l)
- Acetilcolina bromhidrato (Ach) (Sigma, USA) fue preparada en una escala de concentraciones de 1, 2, 7, 20, 70, 200, 700, 1000 µg/mL de solución acuosa.
- Atropina (Sigma, USA) 10 ug/mL de solución acuosa.

- Cloruro de calcio anhidro (Mallinckrodt, USA-Canadá) fue preparado en una escala de concentraciones de 0.882, 1.764, 5.3, 18.5, 53.0, 185.22 y 530 mg/mL de solución acuosa.

Las drogas se agregaron a razón de 0.2 mL en 20 mL de cuba.

4.4.1.4.-Mediciones y protocolos biológicos

Se registró la tensión desarrollada por los trozos de íleon mediante transductores de fuerza isométricos acoplados a un preamplificador TBM-4M de WPI, con detección analógica-digital mediante tarjeta μ DAQ-lite y el programa de adquisición Eagle (USA).

Los preparados fueron sometidos a una precarga de 1g y estabilizados durante al menos 30 minutos, con cambios periódicos del medio.

Se realizaron los siguientes protocolos:

a) *Curvas dosis-respuesta (CDR) de acetilcolina (Ach):* agregando secuencialmente 0,2 mL de cada concentración sucesiva de la escala de Ach hasta obtener el efecto máximo (E_{max} : considerado 100%). En cada preparado se realizaron 2 CDR control, seguidas de 3 sucesivas CDR en presencia de una concentración única del extracto (agregada 5 minutos antes), en orden creciente (0,3 - 1 y 3 mg liofilizado/mL de cuba)

b) *Curvas dosis-respuesta (CDR) de calcio (Ca^{2+}):* se reemplazó el Tyrode de las cubas por un Tyrode-0 Ca^{2+} , y se agregó 0,6 mL de solución de KCl 10% para obtener un medio de Tyrode-80 mM K^+ . Luego se agregaron secuencialmente 0,2 mL de cada concentración sucesiva de la escala de Ca^{2+} hasta obtener el efecto máximo (E_{max} : considerado 100%). En cada preparado se realizaron 2 CDR control, seguidas de 3 sucesivas CDR en presencia de una concentración única del extracto (agregada 5 minutos antes), en orden creciente (0,3, 3, 0,6 y 1 mg liofilizado/mL de cuba)

c) *Curvas dosis-respuesta (CDR) del extracto de *M. cordifolia*:* agregando secuencialmente 0,2 mL de cada concentración sucesiva de la escala (10, 20, 70 y 200 mg/mL de extracto en solución acuosa) hasta obtener el efecto máximo (E_{max} , que se

comparó con el obtenido por Ach en el mismo preparado). En cada preparado se realizaron 2 CDR control de Ach, seguidas de una CDR del extracto de *M. cordifolia* y de otra CDR del extracto en presencia de una concentración única de atropina (0.1 µg/ml cuba, agregada 5 minutos antes), empleada como posible antagonista.

Se calcularon los siguientes parámetros: pD2 = log CE50 (agonista, en M) CE50 (concentración efectiva al 50%) del extracto como agonista y CI50 (concentración inhibitoria al 50%) del extracto como antagonista, ambos por extrapolación a partir de las CDR de cada experimento individual.

4.4.1.5. Tratamiento estadístico de los resultados

Los datos obtenidos fueron analizados usando el programa Graph Pad Prisma versión 4.1.

El método estadístico para comparar las respectivas CDR fue el ANOVA de dos vías (variables: tratamiento y log [agonista]) seguido de comparaciones pareadas a posteriori a las respectivas log[agonista] por el test de Bonferroni.

Los datos de pD2, CE50 y CI50 se expresaron como media ± ESM a partir de los n datos obtenidos (n= 4 a 8).

En todas las comparaciones estadísticas se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$.

5.- Resultados

5.1.- Caracteres anatómicos

5.1.1. *Mikania cordifolia*

HOJA

Arquitectura foliar

La venación es actinódroma basal, con cinco venas primarias que divergen radialmente de un punto único en la base de la hoja y convergen en el ápice de la misma. El desarrollo es perfecto reticulado, ya que las ramificaciones de las venas laterales cubren más de 2/3 del área de la lámina, pero no alcanzan el margen. Las venas secundarias, de tamaño moderado, forman arcos prominentes. La venación terciaria es reticulada y la cuaternaria está orientada al azar. La venación marginal es incompleta (las vénulas terminan libres adyacentes al margen) y la areolación está bien desarrollada (Fig. 5.1).

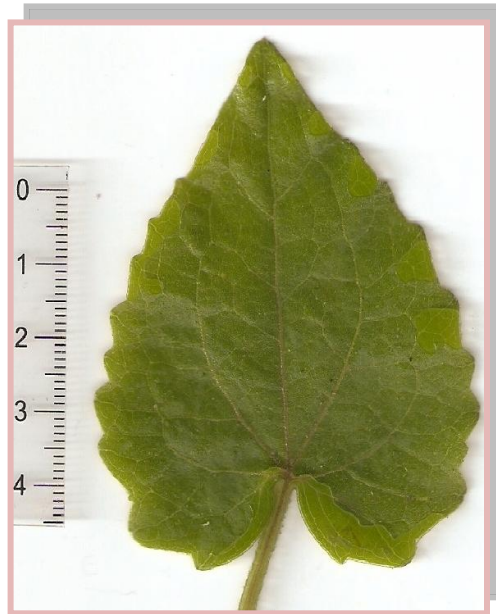


Fig.5.1. *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd.

Epidermis vista en superficie (VS)

La epidermis **adaxial** presenta células con paredes anticlinales rectas a ligeramente curvadas, mientras que en la epidermis **abaxial** son curvadas u onduladas, delgadas en ambos casos, no habiéndose observado ningún tipo de ornamentación cuticular.

La hoja de *M. cordifolia* presenta estomas de tipo anomocítico y anisocítico (predominando los primeros) (Fig. 5.2.A). Se encuentran distribuidos en toda la superficie de la cara abaxial, caracterizando a la hoja como hipostomática, hallándose elevados con respecto a las demás células epidérmicas (Fig. 5.2. B)

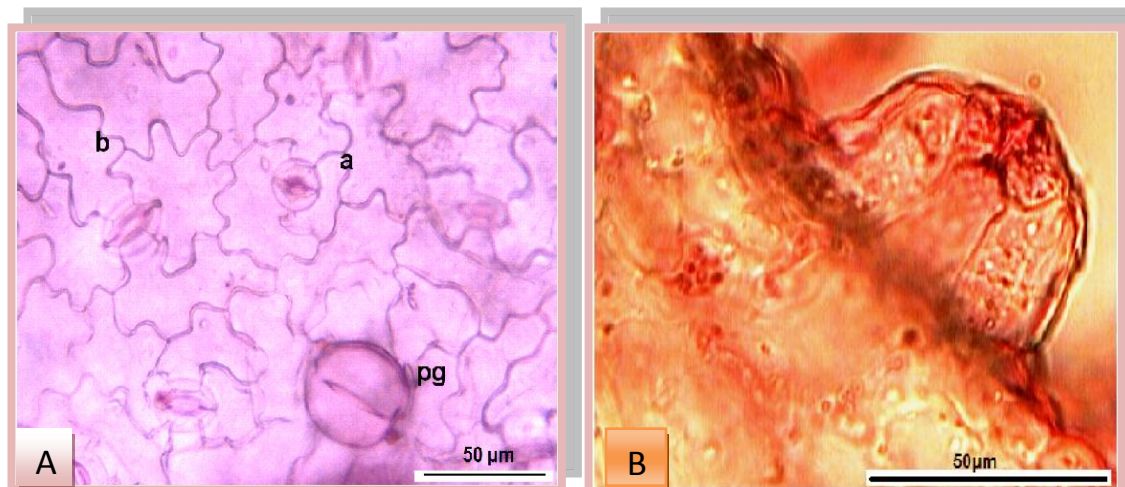


Fig. 5.2. *Mikania cordifolia*. A. Epidermis abaxial (VS): a. estoma anisocítico; b. anomocítico; pg: pelo glandular B. Epidermis (CT): estoma elevado

Los tamaños de estomas (longitud y latitud), así como los índices calculados (estomático y de empalizada) se pueden observar en la Tabla 5.1:

Tabla 5.1. Tamaño de estomas e índices (magnitudes cuantitativas)

	Rango	Promedio	Moda
Longitud (µm)	20-35	28,1 (±3,8)	30
Latitud (µm)	15-20	20,1 (± 1,8)	20
Índice estomático	10,83-14,43	12,1	13,4
Índice empalizada	6–12	8,2	8

En ambas caras de la hoja, se presentan **tricomas** de dos tipos: eglandulares y glandulares:

- Los **eglandulares** son pluricelulares, simples y están compuestos por 2-8 células, presentando cutícula lisa y delgada en toda su extensión. La longitud varía en relación al número de células que los forman y va de 200 μm a 680 μm , con un promedio de 287,8 μm (Fig.5.3.)

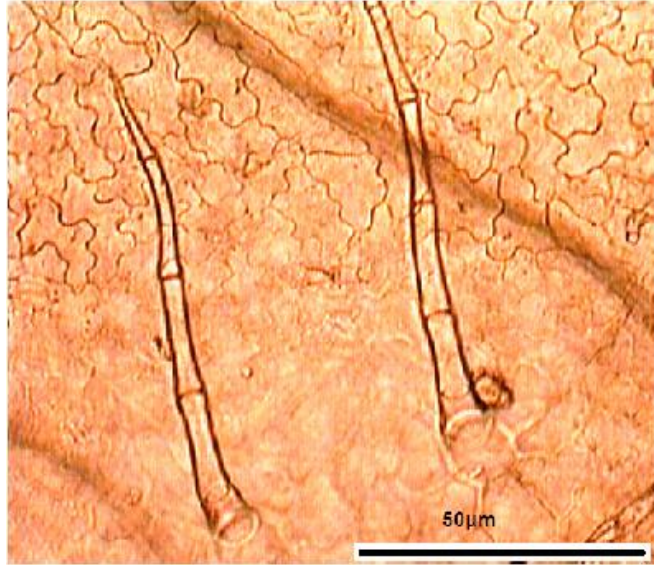


Fig. 5.3. *Mikania cordifolia*. Epidermis abaxial (VS) con tricomas eglandulares

- Los **glandulares** se diferencian por sus características en dos subtipos:
 - a) tricomas constituidos por un pie simple provisto de 3-4 células y cabeza unicelular secretora de forma esférica (Fig. 5.4. A)
 - b) tricomas peltados que constan de un pie corto (1-2 células) y cabeza bicelular, ubicados en depresiones de la epidermis (Fig. 5.4 B).

La **densidad de tricomas** promedio es de 23,4 tricomas/ mm^2 en el haz y 73 tricomas/ mm^2 en el envés.

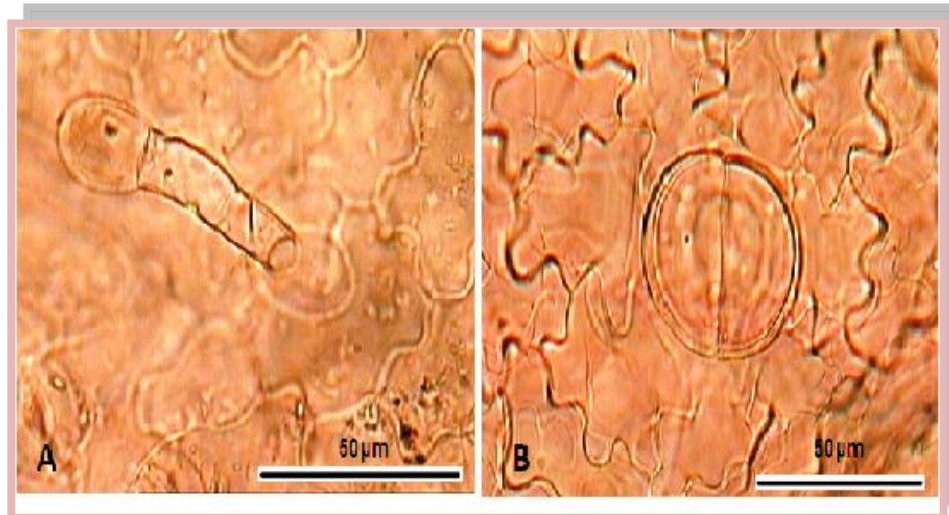


Fig. 5.4. *Mikania cordifolia*. Epidermis abaxial (VS) con tricomas glandulares

Lámina en corte transversal (CT)

Presenta una epidermis unistrata de células rectangulares con cutícula lisa y delgada. El mesofilo es de tipo dorsiventral constituido por 1(2) capa de parénquima empalizada de células cortas y anchas y 1 (2) capas de parénquima esponjoso laxo. La vena media es biconvexa. El sistema vascular está formado por tres haces colaterales dispuestos en forma de arco rodeados por parénquima, sin esclerénquima. Se observan conductos secretores esquizógenos con epitelio unistrato de más de cuatro células, ubicados frente al xilema de los haces vasculares. En posición subepidérmica hay colénquima angular, el cual está formado por 3-4 capas celulares hacia la cara adaxial y 1 (2) capas hacia la cara abaxial. (Fig. 5.5.)

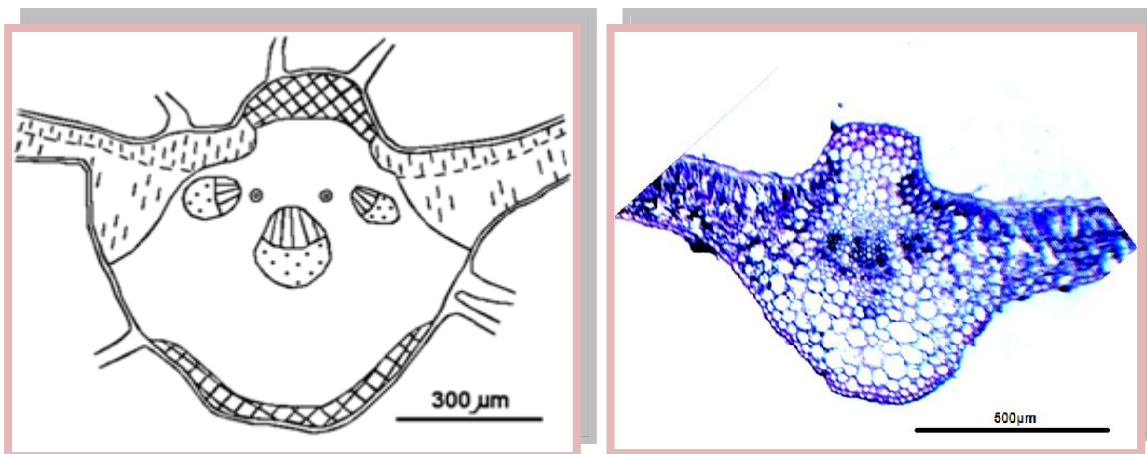


Fig. 5.5. *Mikania cordifolia*. CT de la vena media

Pecíolo en corte transversal (CT)

En la sección transversal el contorno es redondeado, con la cara abaxial convexa y con la cara adaxial plana, con dos lóbulos prominentes. La epidermis es unistrata y está formada por células cuadrangulares con cutícula delgada y densamente pubescente. Los estomas están elevados (en algunos casos, en columna). La corteza está formada por colénquima angular discontinuo, ubicado en la cara ventral y en los lóbulos, alternando con clorénquima. El tejido vascular es un arco de haces colaterales reduciendo su tamaño desde la cara abaxial hacia los lóbulos adaxiales. En los radios medulares que comunican la médula con la corteza se visualizan los conductos secretores esquizógenos, los que presentan un único estrato epitelial de más de cuatro células (Fig. 5.6.)

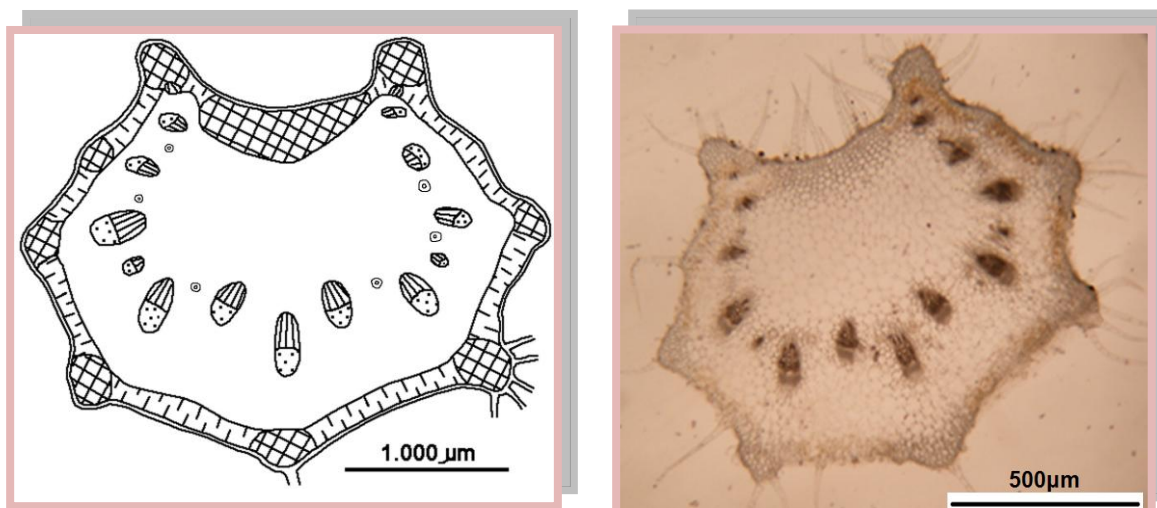


Fig.5.6. *Mikania cordifolia*. CT del pecíolo

TALLO EN CORTE TRANSVERSAL (CT)

Un corte transversal por la zona media de un entrenudo joven de aproximadamente 2,5 mm de diámetro, muestra un tallo hexacostado, con la siguiente organización interna (Fig. 5.7. A):

Epidermis unistrata, con células rectangulares de paredes periclinales delgadas y cutícula lisa, también delgada y densamente pubescente en tallos jóvenes, con tricomas eglandulares y glandulares (como los de la hojas) y estomas elevados con respecto a las células epidérmicas. La corteza está formada por 7-10 capas de colénquima angular en las

costillas y una a dos capas de colénquima laminar en las zonas intercostales, seguido por parénquima cortical. La última capa de éste desarrolla un anillo esclerenquimático, que en tallos de mayor diámetro está acompañado por esclereidas. El cilindro vascular corresponde a una eustela con haces vasculares colaterales separados por radios medulares esclerificados. Cada haz vascular muestra un casquete de fibras floemáticas a la altura de las costillas, mientras el xilema forma un anillo por la presencia de fibras interxilemáticas. La médula es parenquimática y en tallos de mayor diámetro se desintegra, es decir se vuelven fistulosos. En la médula periférica, que persiste aun en tallos fistulosos, se observan conductos secretores esquizógenos con epitelio unistrato de más de cuatro células (Fig. 5. 7. B).

En ninguno de los órganos analizados fueron encontrados *crisales*.

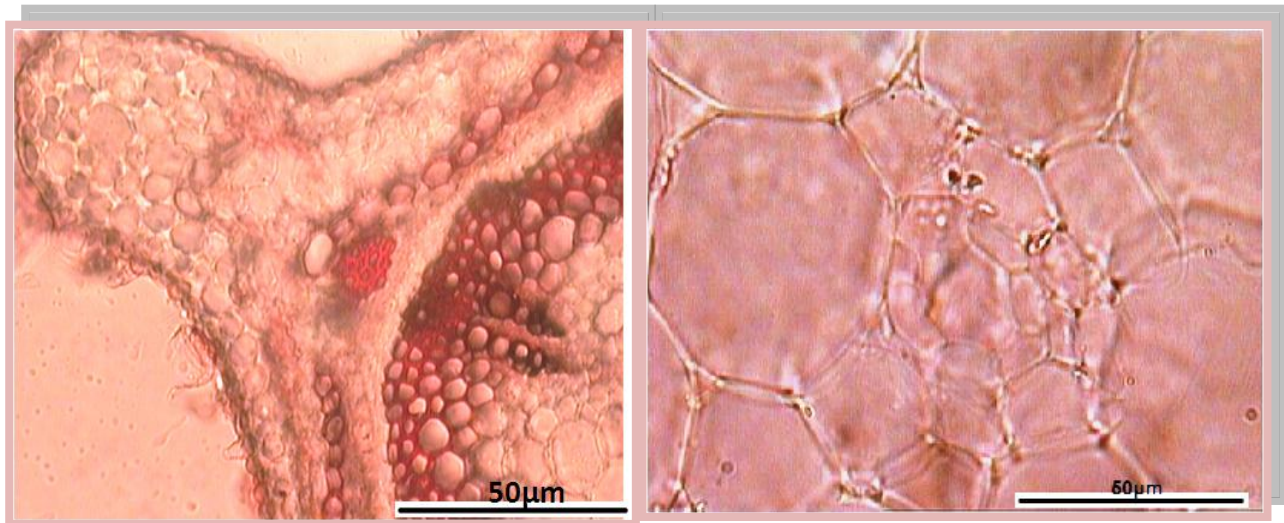


Fig. 5.7. *Mikania cordifolia*. A: CT del tallo; B: Conducto secretor esquizógeno en médula

5.1.2. *Mikania micrantha*

HOJA

Arquitectura foliar

La venación es actinódroma basal, con cinco venas primarias que divergen radialmente de un punto único en la base de la hoja y convergen en el ápice de la misma. El desarrollo es perfecto reticulado, ya que las ramificaciones de las venas laterales cubren más de 2/3 del área de la lámina pero no alcanzan el margen. Las venas secundarias, de tamaño moderado, forman arcos prominentes. La venación terciaria es reticulada y la cuaternaria está orientada al azar. La venación marginal es incompleta (las vénulas terminan libres adyacentes al margen) y la areolación está bien desarrollada (Fig. 5.8)



Fig.5.8. *Mikania micrantha* Kunth

Epidermis vista en superficie (VS)

La epidermis vista en superficie presenta en la cara **adaxial** células con paredes anticlinales rectas a ligeramente onduladas y en la cara **abaxial** sinuosas, delgadas en ambos casos. En el envés de la hoja se observa una cutícula levemente estriada radialmente alrededor de las células oclusivas. Se encontraron **estomas** anomocíticos (no habiéndose observado anisocíticos como en *M. cordifolia*) distribuidos en toda la

superficie de la cara abaxial, caracterizando a la hoja como hipostomática y ubicados al mismo nivel que las demás células epidérmicas o ligeramente elevados.

Los tamaños de estomas (longitud y latitud), así como los índices calculados (estomático y de empalizada) se pueden observar en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Dimensiones de los estomas y magnitudes cuantitativas

	Rango	Promedio	Moda
Longitud (μm)	30-40	35,3 ($\pm 3,8$)	35
Latitud (μm)	20-25	21,9 ($\pm 2,4$)	20
Índice estomático	10,7-13,6	9,2	11,7
Índice empalizada	7-23	15,1	17

Con respecto a los **tricomas**, en esta especie se hallaron en ambas caras de la hoja tricomas de dos tipos: eglandulares y glandulares:

- Los **eglandulares** son pluricelulares, simples y están compuestos por 2-6 células, presentando cutícula lisa y gruesa en toda su extensión, siendo la célula apical pronunciadamente aguda. La longitud de los mismos varía según el número de células que los forman, entre 60 μm y 220 μm , con un promedio 133,2 μm (Fig. 5.9).

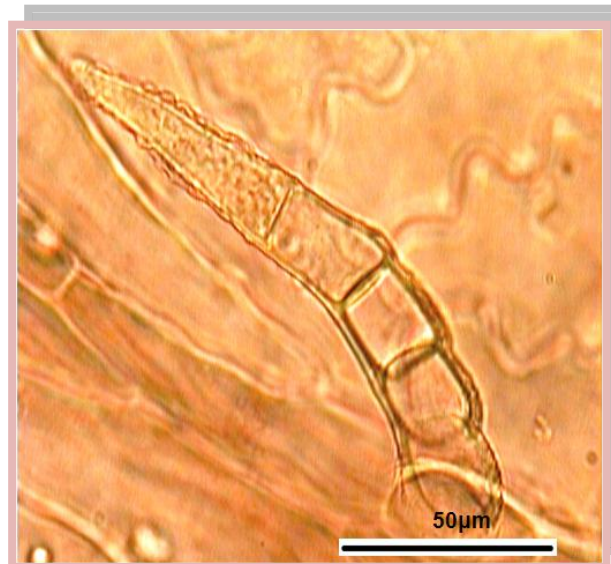


Fig. 5.9. *Mikania micrantha*. Epidermis adaxial (VS) con tricoma eglandular

- Los **glandulares** se diferencian por sus características en dos subtipos:
- a) tricomas constituidos por un pie simple provisto de 3-4 células y cabeza unicelular secretora oblonga con pared celular muy delgada;
 - b) tricomas peltados que constan de un pie corto (1-2 células) y cabeza bicelular, ubicados en depresiones de la epidermis (Fig. 5.10.).

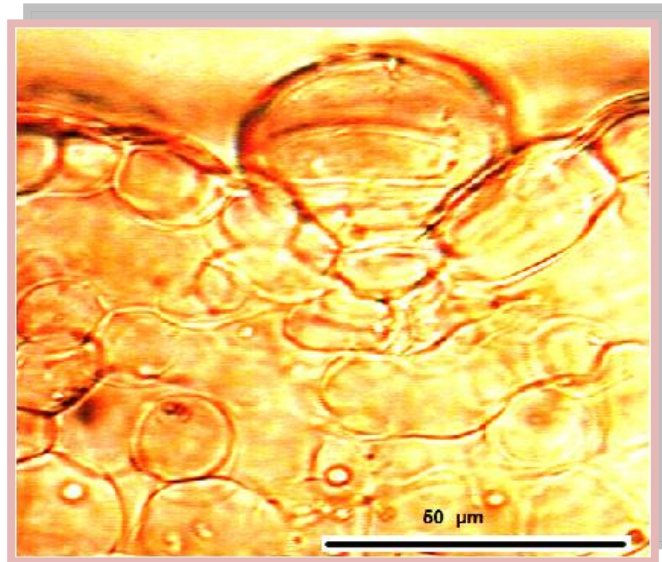


Fig. 5.10. *Mikania micrantha*. CT: Tricoma glandular peltado ubicado en depresiones de la epidermis de la lámina en CT

La **densidad de tricomas** es de 9,2 tricomas/mm² en el haz y 48 tricomas/mm² en el envés.

Lámina en corte transversal (CT)

Presenta una epidermis unistrata de células rectangulares con cutícula delgada y estriada. El mesofilo de tipo dorsiventral está constituido por 1(2) capa de parénquima en empalizada de células cortas y anchas y 2-4 capas de parénquima esponjoso laxo (Fig. 5.11). La vena media es biconvexa. El sistema vascular está formado por tres haces colaterales dispuestos en forma de arco rodeados por parénquima, sin esclerénquima. Conductos secretores esquizógenos con epitelio unistrato de 4 células se hallan ubicados

en los radios medulares. En posición subepidérmica hay colénquima angular, el cual está formado por 2-3 capas celulares hacia la cara adaxial y 1 (2) capas hacia la cara abaxial.

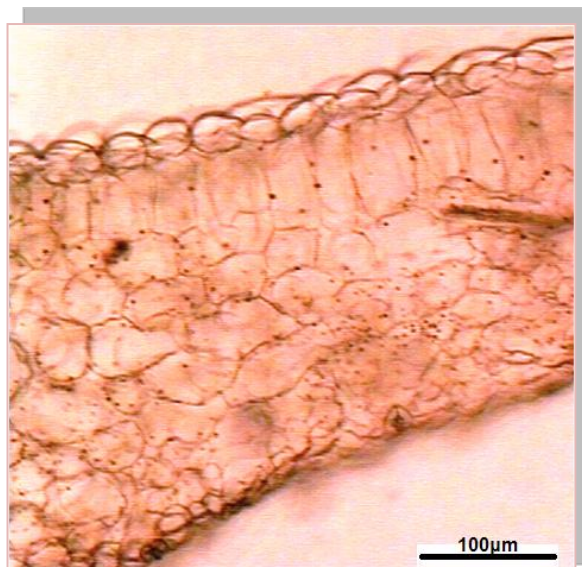


Fig. 5.11. *Mikania micrantha*. CT.; Lámina con mesofilo dorsiventral

Pecíolo en corte transversal (CT)

En la sección transversal el contorno es redondeado, con la cara abaxial convexa y con la cara adaxial plana, bilobada con los lóbulos poco marcados. La epidermis es unistrata y está formada por células cuadrangulares con cutícula delgada y escasamente pubescente. La corteza está formada por 2-3 capas de colénquima angular discontinuo, ubicado en la cara ventral y en los lóbulos. El tejido vascular es un arco de haces colaterales reduciendo su tamaño desde la cara abaxial hacia los lóbulos adaxiales. En los radios medulares que comunican la médula con la corteza se visualizan los conductos secretores esquizógenos, los que presentan un único estrato epitelial de cuatro células.

TALLO EN CORTE TRANSVERSAL (CT)

Un corte transversal por la zona media de un entrenudo joven de aproximadamente 2,5 mm de diámetro, muestra un tallo hexalobado con la siguiente organización interna (Fig. 5. 12 A): Epidermis unistrata, con células rectangulares de paredes periclinales delgadas y cutícula gruesa y estriada, glabrescente, con estomas a

nivel de las restantes células epidérmicas. La corteza está formada por un anillo continuo de 2-3 capas de colénquima angular, el cual se vuelve más grueso en los lóbulos, seguido por varias capas de parénquima aerenquimático. La capa más interna de la corteza está representada por una capa endodermoide cuyas células desarrollan banda de Caspary, no observándose, en cambio, la presencia de un anillo esclerenquimático como el hallado en *M. cordifolia*. El cilindro vascular corresponde a una eustela con haces vasculares colaterales abiertos separados por radios medulares, en donde se hallan ubicados a nivel interfloemático, conductos secretores esquizógenos con un epitelio unistrato de 4 células (Fig. 5.12. B). Esto marca una diferencia con lo observado en *M. cordifolia*, donde los conductos se hallaron en la zona periférica de la médula. Cada haz vascular muestra un casquete de fibras floemáticas (más prominente en coincidencia con los lóbulos), mientras el xilema forma un anillo por la presencia de fibras interxilemáticas. La médula en su parte central se desintegra aún en tallos jóvenes, es decir que se vuelven fistulosos. Del mismo modo que en *M. cordifolia*, no se hallaron **crisales** en ninguno de los órganos analizados.

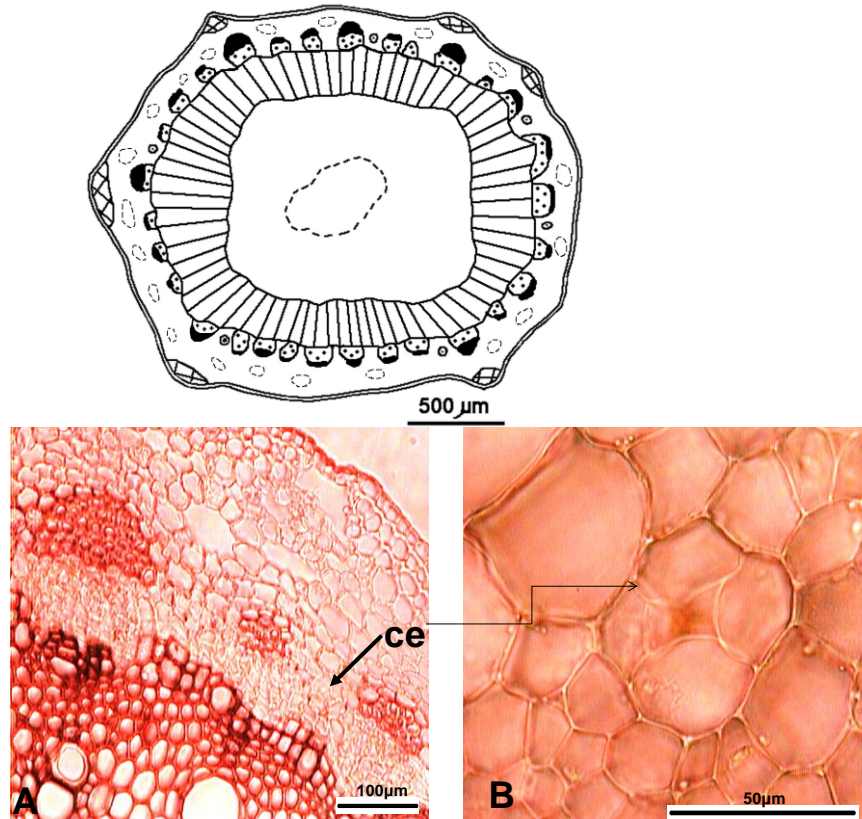


Fig. 5.12. *M. micrantha*. C.T. A:Tallo; B: detalle de conducto esquizógeno interfloemático

5.2.- Ensayos fitoquímicos preliminares

5.2.1.- Rendimiento de los extractos de *Mikania spp.* calculado en % (g extracto/100 g material vegetal seco) (Tabla 5.3)

Tabla 5.3. Rendimientos

	<i>M. cordifolia</i>	<i>M. micrantha</i>
Extracto DCM	3,09	2,82
Extracto MeOH	6,71	10,76
Extracto acuoso (cocimiento)	6,23	5,89

5.2.2.- Pruebas químicas orientativas efectuadas a los extractos acuoso, diclorometánico y metanólico de *Mikania spp.* (Tabla 5.4)

Tabla 5. 4. Pruebas químicas orientativas

Reacción	DCM		MeOH		Acuoso	
	<i>M. micrantha</i>	<i>M. cordifolia</i>	<i>M. micrantha</i> *	<i>M. cordifolia</i>	<i>M. micrantha</i> *	<i>M. cordifolia</i>
Shinoda	-	-	++	+	+	++
Cl ₃ Fe	-	-	-	+	+ verde	+ verde
Cl ₃ Al	-	-	+ Celeste (UV 366)	++ amarilla (UV366)	+ Amarillo (UV 366)	+ Amarillo (UV366)
H ₃ BO ₃	-	-	+	+ Amarillo (UV 366)	++ celeste (UV 366)	+ celeste (UV366)
KOH	-	-	++ Amarillo (UV 366)	+ Amarillo (UV 366)	+ Amarillo (visible)	+ Amarillo (vis y UV366)
Reactivo de Dragendorf	ND	ND	+ ppdo	+ ppdo	+ ppdo	+
Reactivo de Mayer	ND	ND	-	+	-	-
Reactivo de Marme	ND	ND	-	+	-	-
Acido pícrico al 1%	ND	ND	+	+	+	+
Reactivo de Bouchardat	ND	ND	-	+	-	-
Acido Tánico al 1%	ND	ND	-	+	+	+

* Estos extractos poseían fluorescencia celeste al UV366 antes de agregar los reactivos.

ND: no determinado

5.2.3.- Análisis de las cromatografías en capa delgada (CCD) efectuadas a los extractos diclorometánico, metanólico y acuoso de *M. micrantha* y *M. cordifolia*

5.2.3.1.- Extracto diclorometánico (DCM)

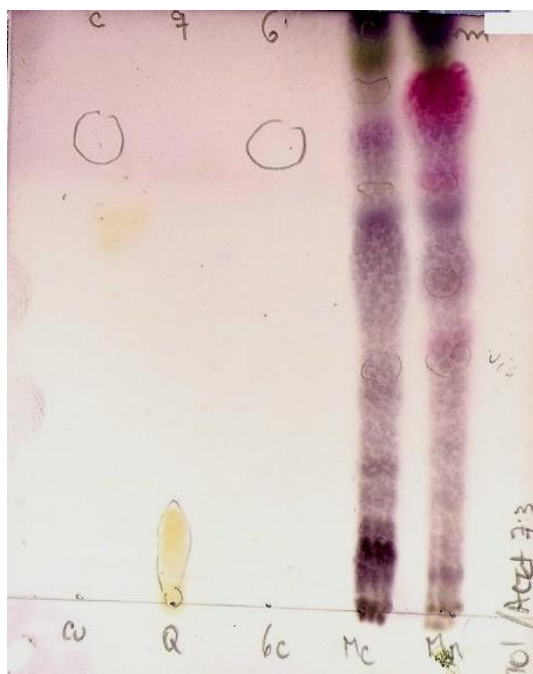
De todos los sistemas cromatográficos ensayados para los extractos diclorometánicos (1 a 6), los que tuvieron la mejor resolución fueron 1 y 2 (ver Materiales y Métodos, Tabla 4.2)

Las CCD realizadas en el sistema sistema 1 (Tolueno/AcOEt 7:3) y sistema 2 (Tolueno/Eter etílico 1:1 saturado en Acido acético 10%) en presencia de cumarina (1,2

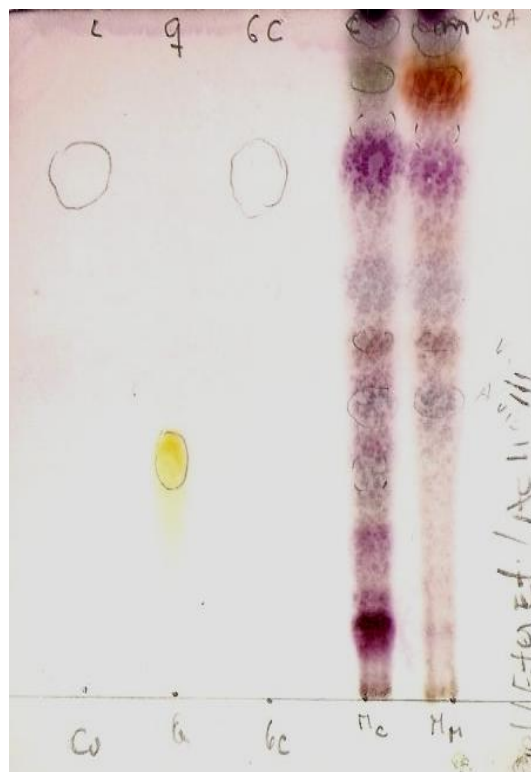
benzo pirona) como sustancia de referencia, permite apreciar, tanto por observación al visible, como al UV 254nm y 366 nm, antes y después el revelado con KOH 5% en EtOH, la presencia de 14 y 12 bandas en los extractos DCM de *M. cordifolia* y *M. micrantha* respectivamente.

La sustancia de referencia, cumarina, se aprecia por una banda oscura en el tercio superior de la placa ($R_f \sim 0,70$) observada al UV 254. La misma banda, exhibe intensa fluorescencia celeste al UV 366, sólo luego del revelado con KOH (ver Fig. 5.13). Puede observarse además, que ninguna de las bandas presentes en el extracto DCM de las especies en estudio se corresponde en R_f , y características de color y fluorescencia con la sustancia de referencia

Fig. 5.13. CCD de los extractos diclorometánicos de *M. cordifolia* y *M. micrantha*



F.M.: Tolueno/ Acetato etilo 7:3.
Siembra: solución metanólica de Cumarina (Cu), quercetina (q), 6-metil cumarina (6c), Extracto DCM de *M. cordifolia* (M.c.), *M. micrantha* (M. m.)
Revelado: Anisaldehído Sulfúrico



F.M.: Tolueno/ Eter etílico 1:1 saturado con AcOH 10%
Siembra: solución metanólica de Cumarina (Cu), quercetina (q), 6-metil cumarina (6c), Extracto DCM de *M. cordifolia* (M.c.), *M. micrantha* (M. m.)
Revelado: Anisaldehído sulfúrico

El revelado con anisaldehído sulfúrico permite apreciar que los extractos DCM de ambas especies presentan un perfil similar, en cuanto a número y características de las bandas presentes. Sin embargo, se destacan dos bandas rojo violáceas, una en el primer cuarto de la placa presente sólo en *M. cordifolia*; otra muy notable, en el cuarto superior de la placa (Rf 0,80) presente sólo en *M. micrantha*.

El revelado con reactivo de productos naturales (ver Materiales y métodos) y posterior observación al UV366, permite observar en el extracto DCM de *M. micrantha*, la presencia de una banda de fluorescencia celeste (Rf ~0,50) que no se halla presente en el extracto DCM de *M. cordifolia*.

Las bandas amarillentas al visible, de Rf 0,40 presentes en ambos extractos, se observan de color marrón al UV 366, luego del revelado, siendo el resto de ambos perfiles de gran similitud.

En ningún sistema se aprecian bandas cuyas características se correspondan con los testigos de quercetina, cumarina y 6-metil cumarina ensayados.

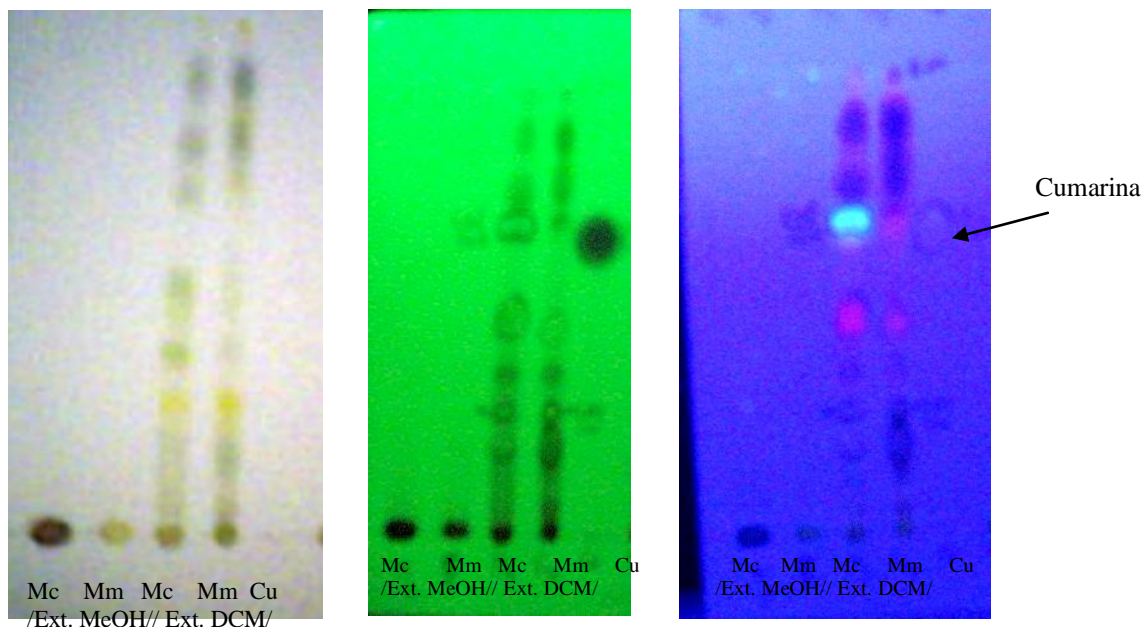
5.2.3.2.- Extracto metanólico (MeOH)

Las CCD realizadas en el sistema 2 (Tolueno/Eter etílico 1:1 saturado en Ácido acético 10%) en presencia de cumarina (1,2 benzo pirona) como sustancia de referencia, permite apreciar, tanto por observación al visible, como al UV 254nm y 366 nm, antes (Ver Fig. 5.14) y después del revelado con KOH 5% en EtOH, que ninguno de los componentes del extracto MeOH de las especies en estudio, presenta una buena resolución en este sistema cromatográfico, permaneciendo todos ellos en el punto de siembra. Sin embargo, el sistema resulta adecuado para la sustancia de referencia, cumarina, cuya presencia se pone de manifiesto por una banda oscura en el tercio superior de la placa (Rf ~ 0,70) observada al UV 254. La misma banda, exhibe intensa fluorescencia celeste al UV 366, sólo luego del revelado con KOH. (Ver Fig.5.15).

Como se ve, la banda correspondiente a la sustancia de referencia no coincide con ninguno de los componentes del extracto MeOH de *M. micrantha* ni de *M. cordifolia*.

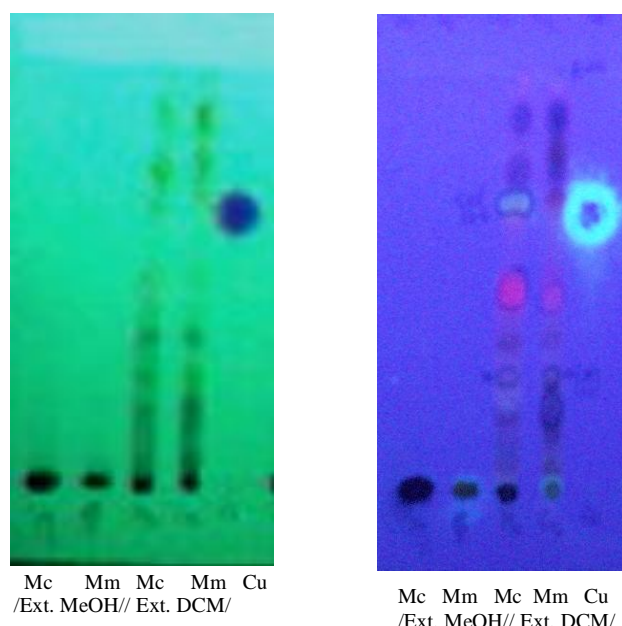
Las CCD en otros sistemas de solventes, tales como el tolueno / AcOEt 7:3 arrojan resultados similares con respecto a la presencia de 1,2 benzopirona.

Fig. 5. 14. CCD de los extractos MeOH y DCM de *Mikania* spp.



FM: Tolueno/Eter etílico 1:1 saturado en Acido acético 10%
 Siembra: extractos metanólicos (Ext. MeOH) y diclorometánicos (Ext. DCM) de *M. cordifolia* (Mc) y *M. micrantha* (Mm), Solución metanólica de cumarina (Cu)
 Obs. Visible, UV 254, UV 366 respectivamente

Fig. 5.15 CCD de los extractos MeOH y DCM de *Mikania* spp

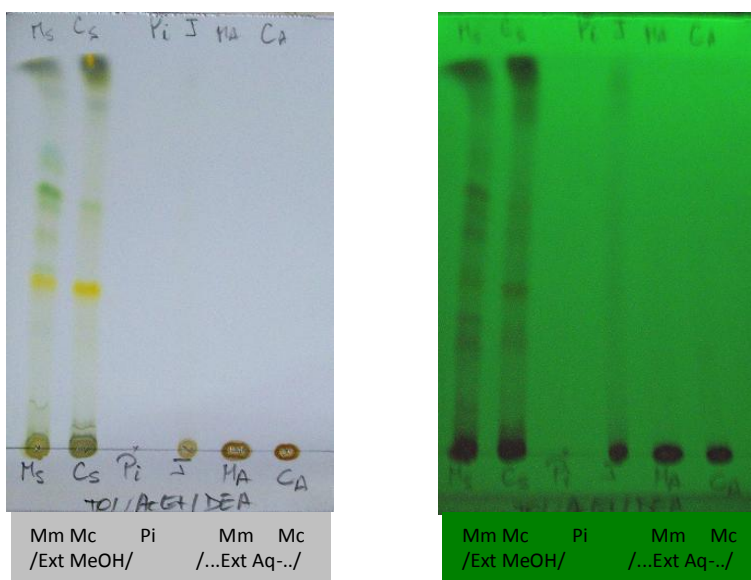


FM: Tolueno/Eter etílico 1:1 saturado en Acido acético 10%
 Siembra: extractos metanólicos (Ext. MeOH) y diclorometánicos (Ext. DCM) de *M. cordifolia* (Mc) y *M. micrantha* (Mm)
 Solución metanólica de cumarina (Cu)
 Revelado KOH 5% en EtOH + Obs. UV 254 y UV 366 respectivamente

Las CCD destinadas a poner de manifiesto la presencia de alcaloides se llevaron a cabo utilizando los sistemas 5 (FM: Tolueno/AcOEt/Dietilamina 70:20:10) y 6 (Cloroformo/Dietilamina 90:10), utilizando pilocarpina como sustancia de referencia, siendo el sistema 5 el de mejor resolución.

En este sistema se puede apreciar para el extracto MeOH de *M. micrantha* la presencia de una débil banda, en la mitad de la placa ($R_f \sim 0,50$) que reacciona con el reactivo de Dragendorf, en tanto en el extracto MeOH de *M. cordifolia* se observan claramente dos bandas, una a $R_f \sim 0,50$ y otra más intensa en el tercio inferior de la placa ($R_f \sim 0,30$) que dan coloración con el reactivo de Dragendorf. Ninguna de estas bandas se corresponde con la banda amarilla (Obs. Visible) a $R_f \sim 0,40$ de fluorescencia marrón al UV366 (ver Fig. 5.16) que aparece en ambos extractos.

Fig. 5.16 CCD de los extractos MeOH y Acuoso de *Mikania* spp.



FM: Tolueno/AcOEt/DEA 70:20:10

Siembra: Extractos MeOH (Ext. MeOH) de *M. micrantha* (Mm) y *M. cordifolia* (Mc)

Extractos acuosos (Ext aq) de *M. micrantha* (Mm) y *M. cordifolia* (Mc)

Sustancia de referencia: Pilocarpina (Pi)

Revelado: Obs. Visible y UV 254

5.2.3.3.- Extracto acuoso (decocción)

Para las CCD realizadas a los extractos acuosos, la mejor resolución para los extractos acuosos se observó en los sistemas 8 (AcOEt/AcOH/Fórmico/H₂O 100:11:11:26) y 11 (AcOEt/MeOH/H₂O 100:13:10).

En el sistema 8, el extracto acuoso de *M. cordifolia* presenta, al UV 366 luego de revelar con reactivo de productos naturales, 9 bandas principales, 7 de las cuales (Rf: 0; 0.11; 0.20; 0.28; 0.35; 0.44 y; 0.51) se hallan en la primera mitad de la placa, exhibiendo tres de ellas (Rf 0.28, 0.35 y 0.44) fluorescencia celeste al UV 366.

En el tercio superior de la placa, aparecen dos bandas más, de fluorescencia azul-celeste al UV 366.

El extracto acuoso de *M. micrantha*, presenta en este sistema 8 bandas cuyos Rf y características de color y fluorescencia determinan un perfil diferente al de *M. cordifolia*. La primera mitad de la placa presenta 4 banda principales, 3 de las cuales coinciden con las de *M. cordifolia*. En la segunda mitad de la placa, aparecen dos bandas de fluorescencia celeste en las condiciones de revelado que no están presentes en *M. cordifolia*, en tanto que las de Rf 0.91 y 0.96 son coincidentes (ver Fig. 5.17 y Tabla 5.5). No se observan bandas cuyas características coincidan con las sustancias de referencia Rutina y Kanferol.

Fig. 5.17. CCD de los extractos acuosos de *Mikania spp.*



FM: AcOEt/AcOH/Fórmico/H₂O
Siembra: Extractos de *M. cordifolia* (Mc) y
M. micrantha (Mm)
Solución MeOH 1% de Rutina (R) y
Kamferol (K)
Revelado: RPN + Obs. UV366

En el sistema 11, el extracto acuoso de *M. cordifolia* presenta 9 bandas, de las cuales, las más destacables son dos próximas al origen de intensa fluorescencia naranja, y una a Rf 0.80 de fluorescencia celeste al UV 366 luego del revelado con reactivo de productos naturales.

M. micrantha exhibe en este sistema un perfil cromatográfico diferente, con un total de 10 bandas, 9 de las cuales se concentran en los primeros dos tercios de la placa.

Las primeras 4 bandas (entre Rf 0 y 0,25) de fluorescencia amarillo-verdosa al UV 366, una de las cuales no está presente en *M. cordifolia*, y hacia la mitad de la placa una banda de intensa fluorescencia celeste que tampoco está presente en *M. cordifolia*. (Ver Fig. 5.18 y Tabla 5.5)

Fig. 5. 18. CCD de los extractos acuosos de *Mikania spp.*



FM: AcOEt/MeOH /H₂O (100:13:10)
Siembra: Extractos de *M. cordifolia* (Mc) y
M. micrantha (Mm)
Revelado: RPN + Obs. UV366

Tabla 5.5. Perfiles cromatográficos de *Mikania* spp en distintos sistemas

Sistema 8		Sistema 11	
<i>M. cordifolia</i>	<i>M. micrantha</i>	<i>M. cordifolia</i>	<i>M. micrantha</i>
0 Naranja	0 Amarilla	0 Marrón amarillento	0 Marrón amarillento
0.11 Amarilla	0.11 Amarilla	0.10 Naranja	0.10 Amarillo-verdoso
0.20 Naranja intensa	---	---	0.15 Amarillo-verdoso
0.28 Celeste	0.28 Celeste	0.20 Naranja débil	0.20 Amarillo-verdoso
0.35 Celeste	---	0.25 Naranja débil	0.25 Amarillo-verdoso
0.44 Celeste	0.44 Celeste	---	0.28 Amarillento
0.51 Naranja débil	---	---	0.30 Amarillento
---	0.60 Celeste	0.40 Amarillento	0.40 Amarillento
---	0.77 Celeste	---	0.51 Celeste
0.91 Azul	0.91 Amarillo intenso	0.55 Amarillento	---
0.96 Celeste	0.96 Celeste	0.60 Amarillento	---
		0.74 Celeste	---
		0.76 Amarillento	---
		---	0.90 Amarillento

Los datos se refieren a valores Rf y características de fluorescencia al UV 366 luego del revelado con RPN

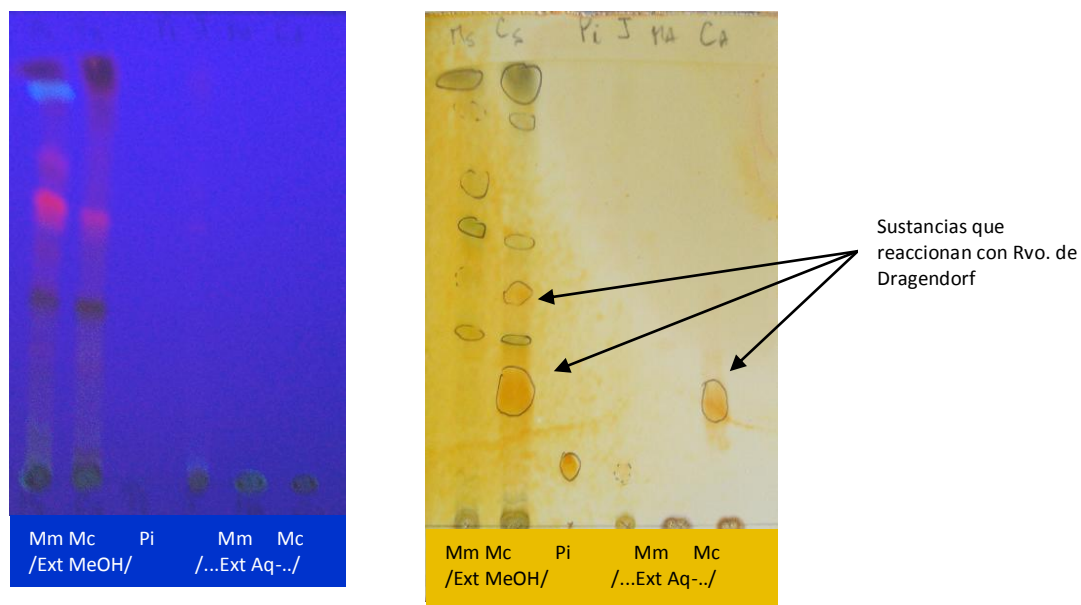
Al igual que para el extracto MeOH, se realizaron CCD destinadas a poner de manifiesto la presencia de alcaloides, siendo el sistema 5 el de mejor resolución.

En este sistema se puede apreciar para el extracto acuoso (decocción) correspondiente a *M. micrantha* que su perfil no presenta ninguna sustancia que reaccione con el reactivo de Dragendorf, en tanto que para *M. cordifolia* se observa una sola banda en el primer tercio de la placa (Rf ~0,30) (ver Fig. 5.19)

Las CCD destinadas a poner de manifiesto la presencia de alcaloides permiten apreciar para el extracto MeOH de *M. micrantha* la presencia de una débil banda, en la mitad de la placa ($R_f \sim 0,50$) que reacciona con el reactivo de Dragendorf, en tanto en el extracto MeOH de *M. cordifolia* se observan claramente dos bandas, una a $R_f \sim 0,50$ y otra más intensa en el tercio inferior de la placa ($R_f \sim 0,30$) que dan coloración con el reactivo de Dragendorf. Ninguna de estas bandas se corresponde con la banda amarilla (Obs. Visible) de $R_f \sim 0,40$ de fluorescencia marrón al UV366.

Respecto a los extractos acuosos (decocción), el correspondiente a *M. micrantha* no presenta ninguna sustancia que reaccione con el reactivo de Dragendorf, en tanto que para *M. cordifolia* se observa una sola banda en el primer tercio de la placa ($R_f \sim 0,30$).

Fig. 5.19. CCD de los extractos MeOH y Acuoso de *Mikania* spp.



FM: Tolueno/AcOEt/DEA 70:20:10

Siembra: Extractos MeOH (Ext. MeOH) de *M. micrantha* (Mm) y *M. cordifolia* (Mc)

Extractos acuosos (Ext aq) de *M. micrantha* (Mm) y *M. cordifolia* (Mc)

Sustancia de referencia: Pilocarpina (Pi)

Revelado: UV 366 y Reactivo de Dragendorf

5.2.4.- Análisis de la Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD) efectuada a los extractos de *M. micrantha* y *M. cordifolia*

HPLC-DAD de los extractos diclorometánicos

En los siguientes gráficos se presentan los cromatogramas correspondientes a los extractos diclorometánicos y metanólico de las partes aéreas de *M. cordifolia* y *M. micrantha* (Fig. 5.20).

Se ha prestado especial atención a los picos mayoritarios.

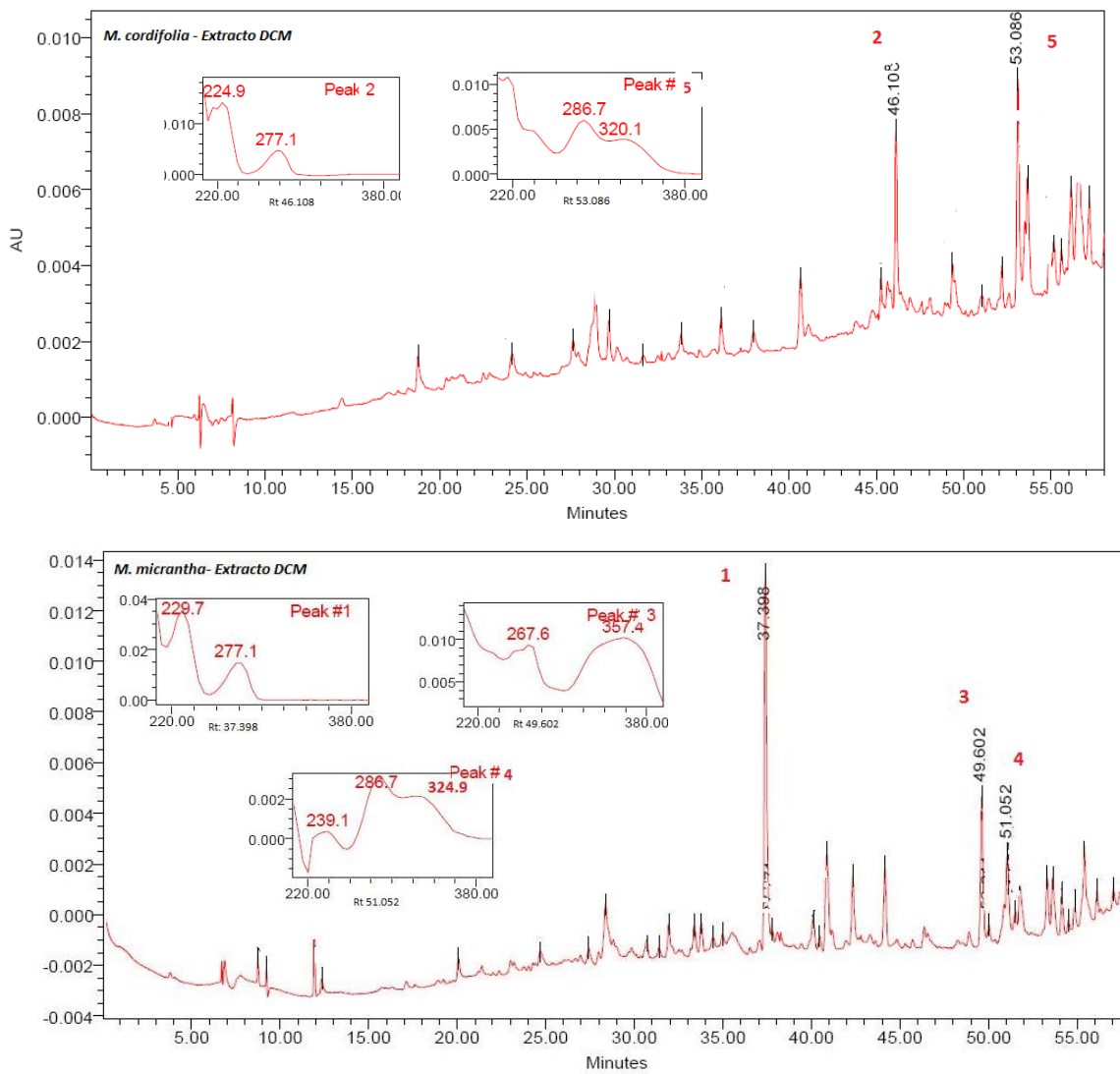


Fig. 5.20 HPLC-DAD de los extractos DCM de *Mikania* spp.

Puede observarse en los extractos DCM de *M. cordifolia* y *M. micrantha*, la presencia de un pico a Rt 46,108 y 37,398 min respectivamente (**Picos 2 y 1**), cuyo espectro UV presenta dos bandas principales a 229.7 y 277.1 nm.

En *M. cordifolia*, a Rt 53,086 min, aparece otro pico (**pico 5**) cuyo espectro UV exhibe dos bandas principales a 286.7 y 320.1 nm, con un “hombro” a ca. 240 nm-

En *M. micrantha* aparecen otros dos picos principales: **pico 3** a Rt 49,602 min, con un espectro UV que exhibe dos bandas principales (267.6 y 357.4 nm) y un hombro ca. 250 nm; y **pico 4** (Rt 51,052 min) con tres bandas a 239.1, 286.7 y 324.9 nm.

HPLC-DAD de los extractos metanólicos

En la Fig. 5.21 se presentan los cromatogramas correspondientes a los extractos metanólicos de *M. cordifolia* y *M. micrantha*.

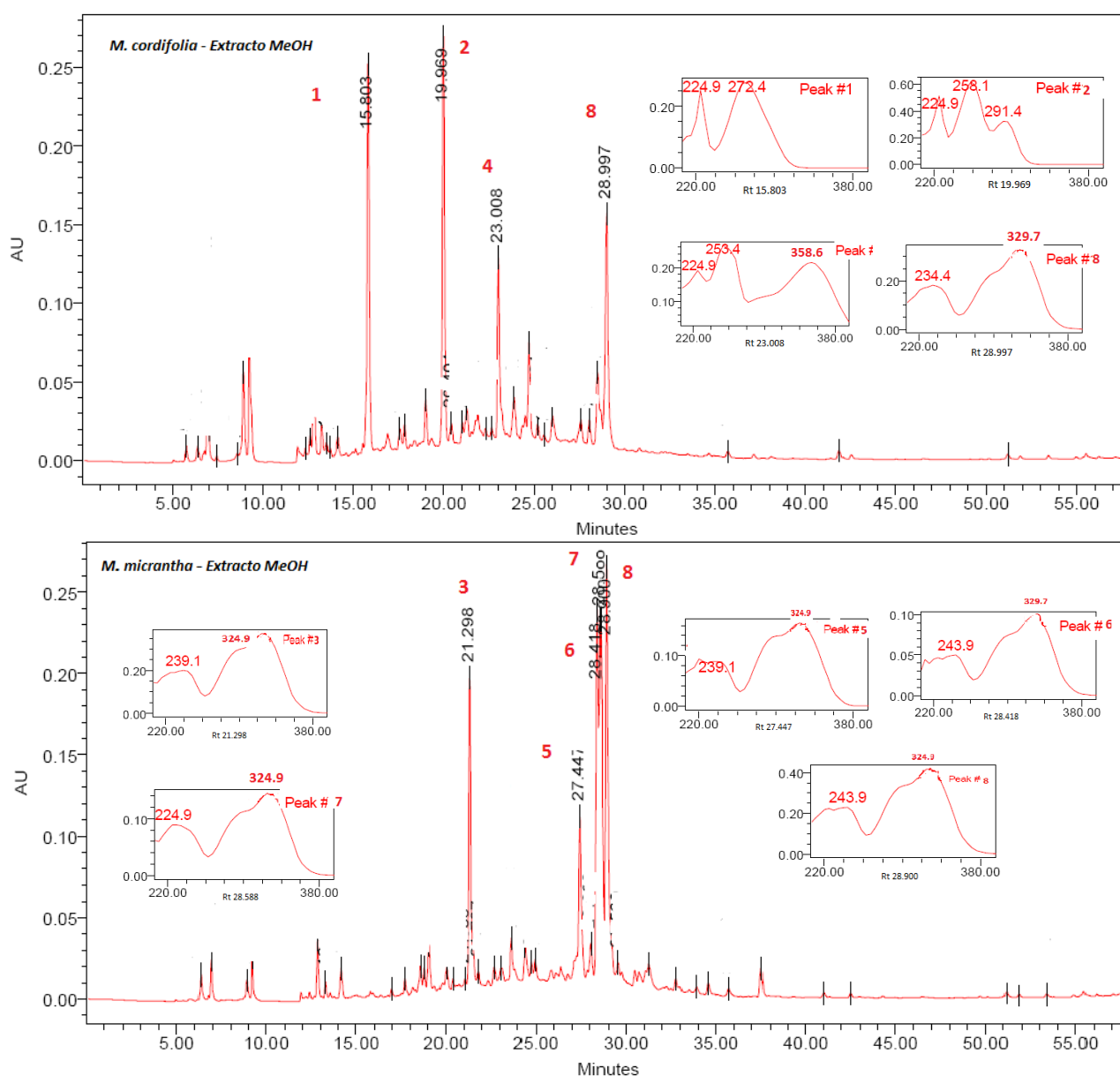


Fig. 5.21. HPLC-DAD de los extractos MeOH de *Mikania* spp.

En el extracto MeOH de *M. cordifolia* puede apreciarse la aparición de 4 picos principales, cuyos espectros UV presentan las siguientes características:

Pico 1 (Rt 15,803 min) con dos bandas principales a 224.9 y 272.4 nm

Pico 2 (Rt 19.969 min) con dos bandas a 258.1 y 291.4 nm

Pico 4 (Rt 23,008 min) con dos bandas principales a 253.4 y 358.6 nm, y un hombro a *ca.* 300 nm.

Pico 8 (Rt 28,997 min) con tres bandas a 234.4 y 329.7, con un hombro a *ca.* 300 nm.

En el extracto MeOH de *M. micrantha*, los picos mayoritarios son cinco y las características de sus espectros UV son muy similares:

Pico 3 (Rt 21,298 min) con dos bandas principales a 239.1 y 324.9 nm y un hombro a *ca.* 290 nm

Pico 5 (Rt 27,447 min) con dos bandas principales a 239.1 y 324.9 nm y un hombro a *ca.* 290 nm

Pico 6 (Rt 28,418 min) con dos bandas principales a 243.9 y 329.7 nm con un hombro a *ca.* 300 nm

Pico 7 (Rt 28,558 min) con dos bandas principales a 239.1 y 324.9 nm y un hombro a *ca.* 290 nm

Pico 8 (Rt 28,900 min) con dos bandas principales a 243.9 y 329.7 nm con un hombro a *ca.* 300 nm

5.3.-Actividad gastrointestinal de los extractos acuosos de *Mikania spp.*

5.4.1. Del extracto acuoso de *M. micrantha*

El extracto acuoso de *M. micrantha* produjo una inhibición no-competitiva de la CDR de Ach dependiente de la concentración en el rango de 0,3 a 3 mg de liofilizado/mL, en la que se obtuvo inhibición completa (Fig. 5.22). La concentración inhibitoria 50%(CI50) de *M. micrantha* fue de $0,54 \pm 0,05$ mg/mL, n= 6 (Fig. 5.23).

Mikania micrantha en CDR Ach íleon de rata

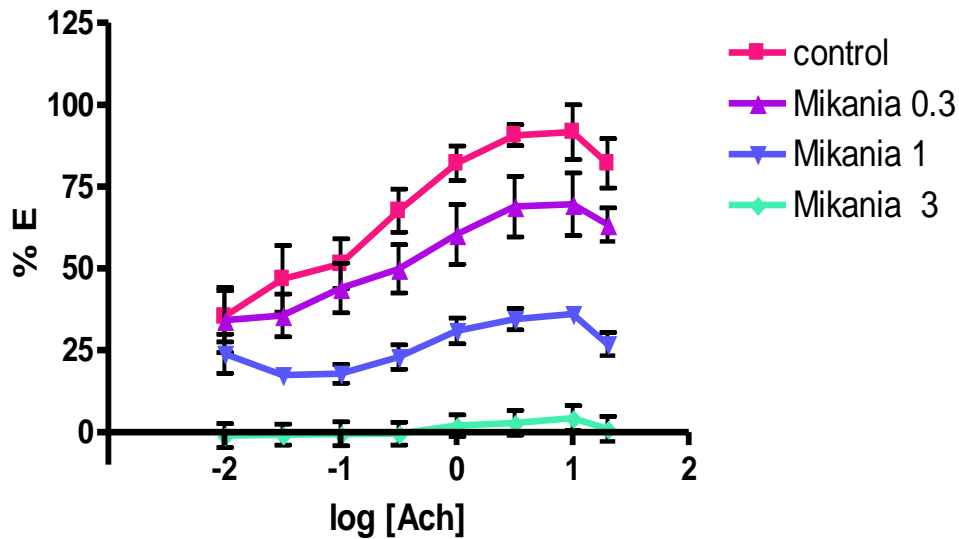


Fig. 5.22. Efecto del extracto de *M. micrantha* (en mg/mL) sobre las CDR de Ach (n= 6 experimentos). pD_2 Ach: $6,66 \pm 0,28$

Inhibición de la CDR de Ach en íleon de rata

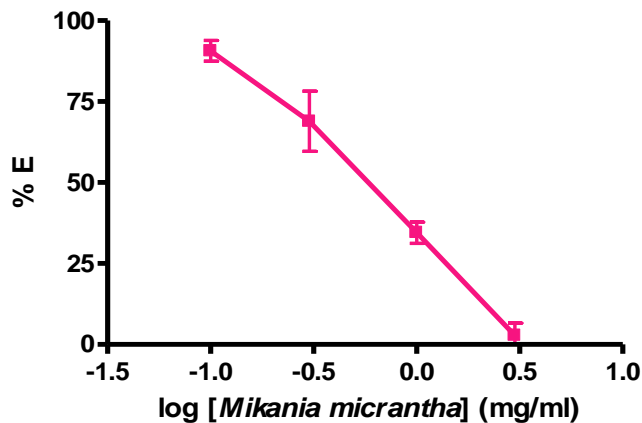


Fig. 5.23.: Curvas de inhibición y cálculo de la concentración inhibitoria 50% del extracto de *M. micrantha* (CI50: $0,54 \pm 0,05$ mg/mL) frente a Ach en el intestino de rata aislada.

5.4.2. Del extracto acuoso de *M. cordifolia*

El extracto acuoso de *M. cordifolia* produjo un efecto dual sobre la CDR de Ach: a bajas [Ach] (0,01 µg/mL) sinergizó la contracción, mientras a mayores [Ach] (1-1000 µg/mL) la antagonizó (Fig. 5.24). La concentración inhibitoria del 50% en el rango de altas [Ach] (100 µg/mL) resultó CI 50: $2,04 \pm 0,06$ mg/mL, n=6 (Fig. 5.25).

Mikania cordifolia en CDR Ach íleon de rata

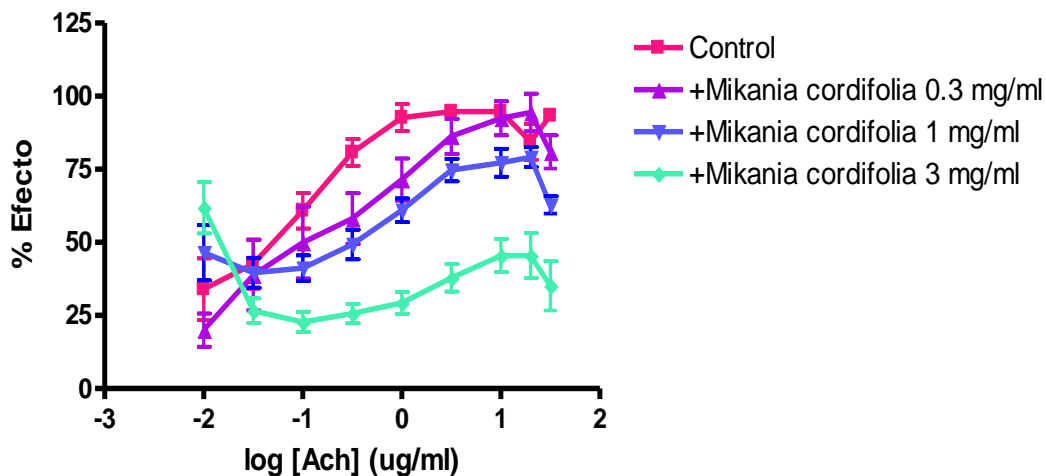


Fig. 5.24. Efecto del extracto de *M. cordifolia* sobre las CDR de Ach en el intestino de rata aislada (n= 6) pD2 Ach: $6,69 \pm 0,21$

Inhibición de la CDR de Ach en íleon de rata

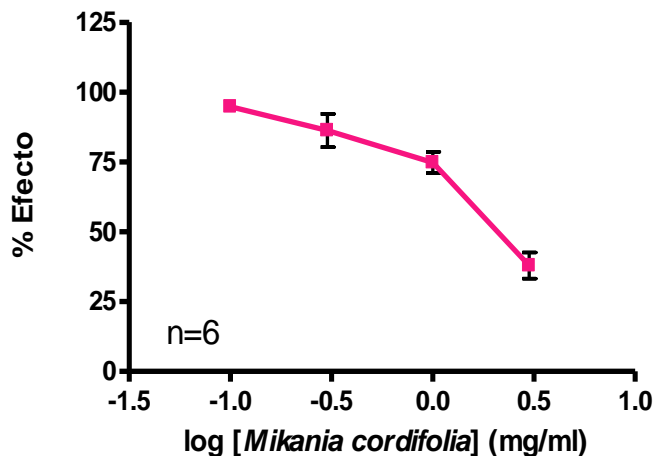


Fig. 5.25. Curvas de inhibición y cálculo de la concentración inhibitoria 50% del extracto de *M. cordifolia* (CI 50: $2,04 \pm 0,06$ mg/mL) frente a Ach en el intestino de rata aislada.

5.4.3. Efectos de *M. micrantha* sobre las CDR de Ca^{+2}

Para evaluar si los efectos de *M. micrantha* eran debidos a inhibición de canales de Ca^{+2} se ensayó su efecto sobre las CDR de Ca^{+2} (Fig. 5.26 a). La Fig. 5.26 b muestra que *M. micrantha* inhibió no-competitivamente las CDR de Ca^{+2} , con una CI_{50} de $0,51 \pm 0,06$ mg/mL, logrando completa inhibición a la concentración de 1 mg liofilizado/mL cuba.

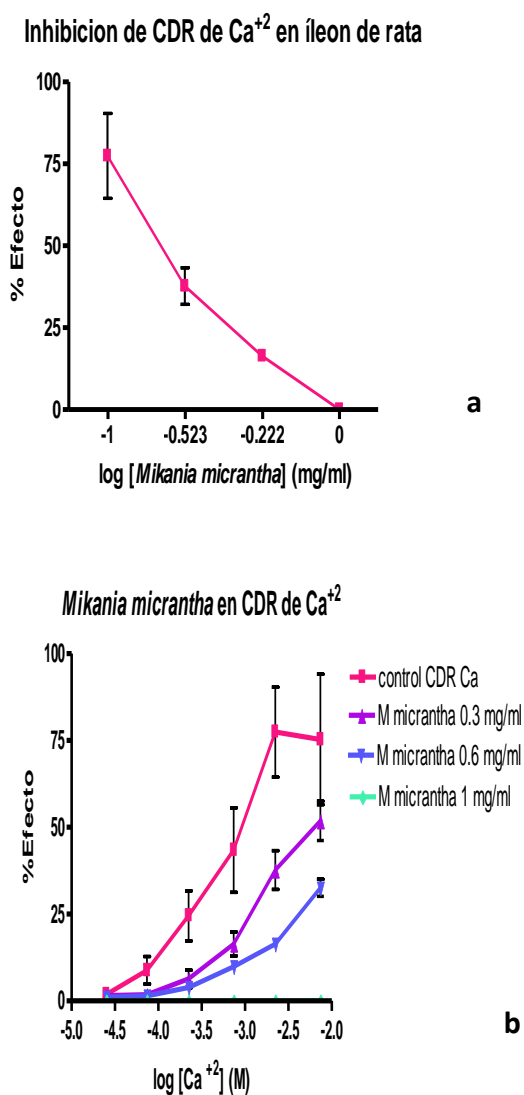


Fig. 5.26: Efectos del extracto de *M. micrantha* sobre la CDR de Calcio (a) y cálculo de la CI_{50} ($0,51 \pm 0,06$ mg/mL (b)). Notar que desplazó no competitivamente al calcio.

5.4.4. Efectos de *M. cordifolia* como agonista

Para evaluar si *M. cordifolia* actúa como agonista muscarínico, se realizó una CDR del extracto en comparación con la CDR de Ach realizada en el mismo preparado. La Fig. 5.27 muestra que *M. cordifolia* tiene actividad agonista parcial (αE : 63,5%) de potencia (calculada al 50% del Emax de Ach) menor (3×10^4 veces) que la de Ach, y su efecto fue totalmente inhibido por atropina.

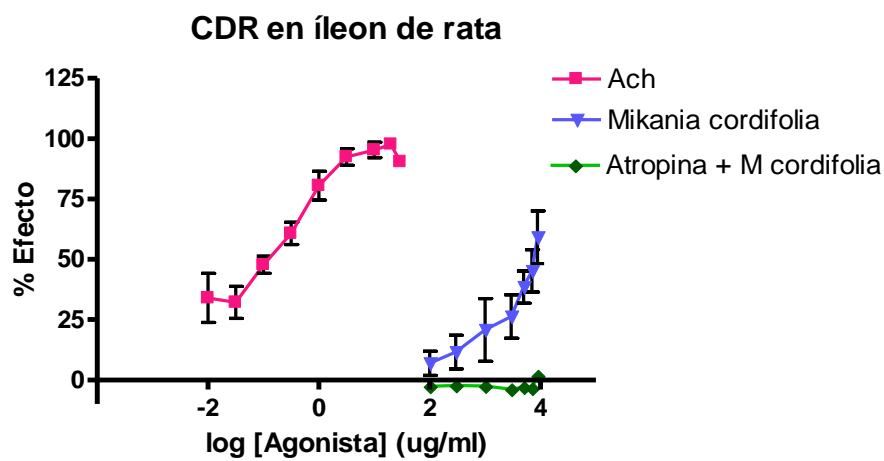


Fig. 5.27. Efectos del extracto de *M. cordifolia* como agonista en comparación con Ach, y en presencia de atropina $0.1 \mu\text{g/ml}$, (CE_{50} Ach: $0,14 \pm 0,06 \text{ mg/ml}$, $n=4$). La CE_{50} de *M. cordifolia* ($4,168 \pm 1.94 \mu\text{g/ml}$, $n=4$) fue totalmente inhibida por atropina.

6.-Discusión

6.1. Caracteres anatómicos

En este trabajo se presenta por primera vez la descripción anatómica del tallo, lámina y pecíolo de *Mikania micrantha*, de igual manera que las magnitudes proporcionales (tamaño de estomas expresado como latitud y longitud, índice estomático e índice de empalizada) de ambas especies.

Tanto los caracteres anatómicos como los valores de los índices, se analizan en forma comparativa.

Arquitectura foliar

El sistema vascular descrito siguiendo la terminología de Hickey (1974) se corresponde con Rejane Ritter & Sfoggia Miotto (2005), quienes caracterizan a las hojas de las dos especies estudiadas como quinquenervias.

Epidermis

Se encontraron en ambas especies estomas de tipo anomocítico, mientras que en *M. cordifolia* también fueron observados de tipo anisocítico en menor proporción, tal lo enunciado por Metcalfe & Chalk (1950) como característicos de la familia Asteraceae. Ambas presentan hojas hipostomáticas, lo que ha sido observado en otras especies, tales como, *M. glomerata* Spreng. (Neves & Sá, 1991; Oliveira *et al.*, 2005), *M. hirsutissima* DC (Oliveira *et al.*, 2005) y *M. laevigata* Sch Bip. ex Baker (Budel, 2009).

En *M. cordifolia* los estomas se hallan elevados con respecto a las demás células epidérmicas tanto en la lámina, el pecíolo como en el tallo, como ocurre en *M. urticifolia* (Cerana, 1997), mientras que en *M. micrantha* se hallan a nivel o ligeramente elevados, tales como los reportados por la misma autora para *M. hirsutissima* y *M. glomerata*.

Indices

Constituyen una herramienta que complementa el estudio de los parámetros cualitativos y pueden ser de utilidad para el control de calidad de materia prima para

elaboración de fitoterápicos (Albretch *et al.*, 2005), además han mostrado ser caracteres estables, en especial el índice de empalizada y los resultados muestran que éste es un carácter diagnóstico de interés, concordando con las observaciones de Zorning & Weiss (1925) y más recientemente Spegazzini (1999), Gatelli (2005) y Colares & Arambarri (2008). En este sentido, en el presente trabajo, se han encontrado diferencias significativas entre las dos especies, tanto en el índice de estomas como en el de empalizada, por lo que podrían constituir un carácter a ser tenido en cuenta al momento de diferenciarlas.

Tricomas

La descripción de los tricomas es una característica de importancia en el diagnóstico de las drogas, sobre todo cuando éstas se presentan fragmentadas o pulverizadas (Oliveira *et al.*, 1993). En este trabajo se han encontrado en ambas especies tricomas eglandulares y glandulares tanto en el haz como en el envés de la lámina, pecíolo y tallo.

Los eglandulares simples y pluricelulares hallados se corresponden con tricomas semejantes descritos para varios géneros de Asteraceae como de tipo cónico (Freire *et al.*, 2005), en tanto que Rodrigues *et al.* (1996) y Oliveira *et al.* (2000) los describen para *M. cordifolia* como uniseriados pluricelulares terminados en punta.

Con respecto a los tricomas glandulares, en este trabajo se han encontrado dos tipos: simples, pluricelulares con cabeza unicelular secretora, como los hallados en *M. urticifolia* por Cerana (1997) y peltados con cabeza bicelular ubicados en depresiones de la epidermis, como los reportados por Budel (2009) para *M. laevigata*.

La densidad de tricomas por mm² no permite establecer diferencias marcadas entre ambas especies, sin embargo a simple vista la mayor densidad de tricomas en ambas superficies de la hoja es evidente solo en *M. cordifolia*.

Mesofilo

En ambas especies se ha encontrado un mesofilo dorsiventral, característico de las Asteraceae (Metcalf & Chalk, 1950), y también coincide con lo reportado por varios autores para diversas especies del género (Neves & Sá, 1991; Alice *et al.*, 1995; Rodrigues

et al., 1996; Cerana, 1997; Oliveira *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2005).

En las dos especies estudiadas se ha encontrado similitud en cuanto a la forma biconvexa de la vena media, a la disposición de los haces vasculares colaterales, a la presencia de colénquima angular y de conductos secretores. Estas características han sido mencionadas por Oliveira *et al.* (2000) para *M. cordifolia*.

Pecíolo

En ambas especies se ha encontrado similitud en cuanto a la disposición de los tejidos, si bien la diferencia más notoria está dada por la sección del mismo, ya que en *M. cordifolia* se presenta con dos lóbulos prominentes, en tanto en *M. micrantha* estos son poco prominentes. Otra característica que puede diferenciar ambas especies es la pubescencia que presenta *M. cordifolia*, siendo glabro *M. micrantha*. Por último, al igual que en la lámina y el tallo, los conductos secretores esquizógenos permiten la diferenciación entre ambas especies teniendo en cuenta el número de células que forman el estrato epitelial de los mismos (cuatro células en *M. micrantha* y más de cuatro células en *M. cordifolia*).

Similares características han sido reportadas en los trabajos de Oliveira *et al.*, 2000 para *M. cordifolia* y Budel *et al.*, 2008 para *M. laevigata*.

Tallo

El tallo de *M. cordifolia* muestra un contorno hexacostado, tal como ha sido observado por diferentes autores (Cerana, 1997; Oliveira *et al.*, 2000), en tanto el de *M. micrantha* presenta un contorno lobulado, el que previamente había sido descrito por Cerana (1997) como multiestriado. La zona cortical muestra características diferentes en ambas especies estudiadas, ya que mientras que los tallos analizados de *M. micrantha* presentaron un parénquima aerenquimático, esto no fue observado en *M. cordifolia*, constituyendo un carácter diferencial entre ambas especies.

Con respecto a la parte más interna de la zona cortical, Oliveira *et al.* (2000), observaron que los tallos de las especies trepadoras de *Mikania* pueden presentar en la región cortical un anillo esclerenquimático, lo que coincide con lo observado en este trabajo en *M. cordifolia*, no así en *M. micrantha*, el cual presenta en la zona interna de la corteza una capa endodermoide con células con banda de Caspary, siendo éste un carácter presente en otras especies de *Mikania* (Cerana, 1997).

Conductos secretores han sido hallados en las dos especies en estudio. La diferencia entre ambas radica en la localización, ya que mientras que en *M. micrantha* se hallan en los radios medulares a nivel interfloemático, en *M. cordifolia* se hallan en la zona periférica de la médula. Esta observación concuerda con lo descrito para *M. laevigata* por Budel (2009), no así con Oliveira *et al.* (2000) quien no los halló en *M. cordifolia*.

Cristales

En ninguno de los órganos analizados de las dos especies estudiadas fueron hallados cristales. La ausencia de éstos parece ser una característica del género (Neves & Sá, 1991; Rodrigues *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2005).

6.2. Ensayos fitoquímicos preliminares

6.2.1.- Pruebas químicas orientativas y CCD

Extractos Diclorometánicos:

Los ensayos con reactivos de Shinoda y soluciones alcohólicas al 2% de Cl_3Al , Cl_3Fe , H_3BO_3 , KOH dieron negativos para ambas especies, lo cual, atento al resultado que se obtuvo para los extractos metanólicos, nos hace pensar que de existir flavonoides, éstos se encontrarían mayoritariamente bajo la forma de heterósidos, de baja solubilidad en DCM y solubles en agua y soluciones hidroalcohólicas.

Las CCD realizadas a estos extractos permite determinar perfiles cromatográficos característicos y distintivos para cada una de las dos especies estudiadas. El color y características de las bandas luego del revelado con anisaldehído sulfúrico, es propio de sustancias de naturaleza terpenoide.

Dentro de este grupo fitoquímico, diversos autores citan la presencia en *Mikania* spp. de lactonas sesquiterpénicas: tales como derivados de tipo guayanolido (mikanolido, digidromikanolido, deoximikanolido) en *M. micrantha* (Huang et al., 2009); elemanolido (micocordilina y sus derivados en *M. cordifolia*, Herz et al., 1977); germacranolidos en *M. mendocina* (Bardón et al., 1996).

Las CCD destinadas a poner de manifiesto la presencia de cumarina (1,2 benzopirona), condujeron a resultados negativos, por lo cual esta sustancia no se hallaría presente en los extractos DCM de las especies en estudio.

Extracto Metanólico:

Los ensayos con reactivos de Shinoda y soluciones alcohólicas al 2% de Cl_3Al , Cl_3Fe , H_3BO_3 , KOH dieron positivos en diferentes grados para los extractos metanólicos de ambas especies. La coloración al visible y la fluorescencia al UV366, se corresponden con lo esperado para compuestos del grupo fitoquímico flavonoides (reacción de Shinoda), con al menos dos $-\text{OH}$ fenólicos adyacentes (reacciones con Cl_3Al , Cl_3Fe , KOH) y la presencia de un $\text{C}=\text{O}$ en posición 4 asociado a un $-\text{OH}$ en C5 del núcleo flavonoide A

(reacción con H_3BO_3) (Domínguez, 1973). Es de hacer notar que aun antes del agregado de los reactivos, el extracto de *M. micrantha* presenta fluorescencia celeste, propia de derivados cafeoil quínicos.

Respecto a las reacciones generales de alcaloides, el resultado es positivo con todos los reactivos ensayados, para el extracto metanólico de *M. cordifolia* en tanto, que para *M. micrantha* solo resultó positiva la reacción en presencia de ácido pícrico.

Las reacciones generales para alcaloides suelen ser consideradas inespecíficas (Domínguez, 1973) y, aunque las Asteraceae pueden presentar estos compuestos entre sus componentes (Aniszewski, 2007), en general no es considerada como una familia productora de alcaloides de importancia terapéutica como es el caso de otras tales como Loganiaceae, Rubiaceae, Papaveraceae, Apocynaceae, Solanaceae, etc.

En el caso de las especies del género *Mikania*, como ocurre para *M. cordata*, existen reportes de la presencia de una “fracción alcaloidal” a la cual se atribuye la acción antiulcerogénica (Rabin *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 2001).

En otras especies de este género, como *M. glomerata* y *M. laevigata*, también se cita la presencia de alcaloides en las partes aéreas (Oliveira *et al.* 1984), si bien otros autores discrepan con esta afirmación (Bighetti *et al.*, 2005).

Otros, al estudiar la composición química de *Mikania* spp, se centran en la presencia o ausencia de compuestos tales como cumarinas, lactonas sesquiterpénicas, terpenoides y flavonoides, sin asignar importancia a la investigación de la presencia o ausencia de alcaloides.

Los resultados obtenidos en los ensayos generales de alcaloides, sumados a las CCD realizadas (ver más adelante) nos permiten tener una buena presunción acerca de la existencia de estos compuestos en el extracto MeOH de las especies estudiadas.

Se utilizó una CCD propuesta por Marinoff *et al.* (2005) para determinar la presencia de cumarina en el extracto MeOH de alfalfa (*Medicago sativa* L.). Este autor propone un sistema cromatográfico destinado a lograr que de los componentes presentes

en dicho extracto, sólo tenga buena resolución para cumarina, que así resulta aislada de los demás.

Aplicado dicho procedimiento a los extractos MeOH de *M. cordifolia* y *M. micrantha*, resulta que no se observa la presencia de cumarina en ninguno de ellos. Lo mismo ocurre al analizar los extractos DCM.

Este resultado está en aparente contradicción con lo informado por Fierro *et al.* (1999), Bighetti *et al.* (2005), Yatsuda *et al.* (2005), entre otros, quienes reportan la presencia de cumarina en *Mikania* spp., atribuyéndole en algunos casos la actividad biológica (Bighetti *et al.*, 2005), si bien otros investigadores no relacionan necesariamente el tenor de cumarinas presente en los extractos con las actividades de *Mikania* spp. (Aboy *et al.*, 2002).

También es reconocida la gran variabilidad, en cuanto a la composición química y producción de metabolitos secundarios, que exhibe una misma especie del género *Mikania* según las condiciones de su hábitat (Catalán *et al.*, 1988; Aguinaldo *et al.*, 2003;), especialmente la luminosidad (Carollo, 2008).

En nuestro caso, esto podría explicar el hecho de que en los extractos de *M. micrantha* y *M. cordifolia* provenientes de los lugares donde han sido recolectadas (Punta Lara e Isla Martín García) no se detecte la presencia de cumarina, siendo que para las mismas especies recolectadas en otros hábitats (distintas regiones de Brasil) este compuesto se encuentra presente (Carollo, 2008).

Extracto acuoso:

Los ensayos con reactivos de Shinoda y soluciones alcohólicas al 2% de Cl_3Al , Cl_3Fe , H_3BO_3 , KOH dieron positivos en diferentes grados para los extractos acuosos de ambas especies. La coloración al visible y la fluorescencia al UV366, se corresponden con lo esperado para compuestos del grupo fitoquímico flavonoides (reacción de Shinoda), con al menos dos $-\text{OH}$ fenólicos adyacentes (reacciones con Cl_3Al , Cl_3Fe , KOH) y la presencia de un $\text{C}=\text{O}$ en posición 4 asociado a un $-\text{OH}$ en C5 del núcleo flavonoide (reacción con H_3BO_3) (Domínguez, 1973). Como ocurría para el extracto MeOH, aun antes del agregado

de los reactivos, el extracto acuoso de *M. micrantha* presenta fluorescencia celeste, propia de derivados cafeoil quínicos (Wagner & Bladt, 1995).

El hecho de que esta serie de ensayos fuera positivo en los extractos MeOH y acuoso, estaría indicando que los compuestos de naturaleza flavonoide se hallan predominantemente bajo la forma de heterósidos.

Las CCD realizadas, reveladas con el reactivo de productos naturales, permite obtener un perfil cromatográfico donde se aprecia la presencia de posibles derivados flavónicos y cafeoilquínicos en concordancia con lo observado en las pruebas químicas orientativas.

Respecto a las reacciones generales de alcaloides, el resultado es positivo con los reactivos de Dragendorf, ácido pícrico y ácido tánico para el extracto acuoso de *M. cordifolia*.

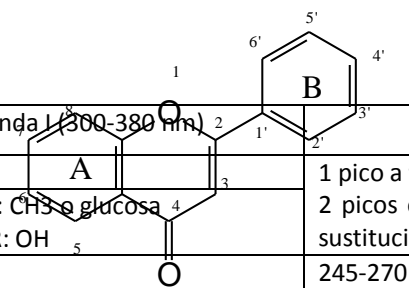
Los resultados obtenidos en los ensayos generales de alcaloides, sumados a las CCD realizadas nos permiten tener una buena presunción acerca de la existencia de estos compuestos en las decocciones de una de las especies estudiadas.

6.2.1.- HPLC-DAD de los extractos DCM y MeOH de *Mikania* spp.

Según Mabry *et al.* (1970) y Harborne & Mabry (1982), el espectro UV de los compuestos del grupo fitoquímico de los flavonoides presenta características distintivas que lo convierten en una útil herramienta a la hora de identificarlos.

Si bien la determinación estructural de estos compuestos, no puede basarse solamente en el análisis de su espectro UV, debiendo efectuarse y analizarse un conjunto de estudios ($^1\text{HNMR}$, $^{13}\text{CNMR}$, EIMS, Comportamiento del espectro UV en presencia de distintas sustancias: BO_3H_3 , Cl_3Al , etc.), luego de aislarlos a partir de un extracto, el análisis del perfil cromatográfico obtenido por HPLC-DAD y la comparación del espectro UV de cada pico con los datos bibliográficos, nos permite realizar una primera aproximación acerca de la naturaleza de los grupos fitoquímicos presentes en un extracto determinado.

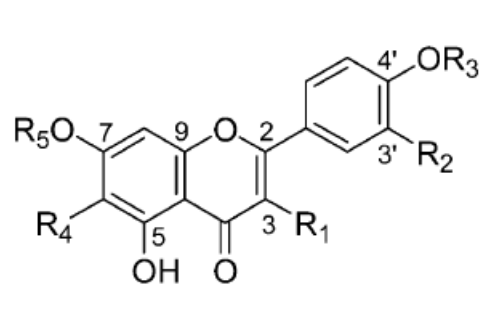
En líneas generales, podemos decir que los flavonoides, presentan dos bandas de absorción al UV: Banda I a λ 300-380 nm que refleja las características del anillo B; y Banda II a λ 240-280 nm, que refleja las características del anillo A.



	Banda I (300-380 nm)	Banda II (240-280 nm)
Flavonas	304-350	1 pico a ~270: Monosustitución en B
Flavonoles O-R en C3	328-357 R: CH ₃ e glucosa 352-385 R: OH	2 picos o 1pico +sh (258, sh272): di o tri O-sustitución en B
Isoflavonas	300-380	245-270 Intensa A veces sh ~260
Flavanona	300-380	270-295
Dihidroflavonoles	300-380	270-295
Chalconas	340-390 (la banda mas importante)	220-270 (banda menor)
Auronas	370-430	

Dentro de estas regiones, cada subgrupo presenta una zona de absorción particular, dependiendo de su estructura general, patrón de oxigenación y la presencia de distintos sustituyentes. A continuación se presenta un cuadro resumen de las bandas de absorción de distintos subgrupos y algunas interpretaciones posibles.

Diversos flavonoides, así como sus espectros UV, han sido citados para *Mikania micrantha* en el trabajo de Wei et al. (2004), tales como:



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	OH	H	Me	OMe	Me
2	OH	H	H	OMe	Me
3	H	OH	H	OMe	H
4	OGlc	H	H	OMe	H
5	H	OH	H	H	H

1.- **Mikanina** UV (MeOH) λ_{max} (log e) 270.6 (4.27), 360 (4.23) nm

2.- **Eupatilina** UV (MeOH) λ_{max} (log e) 270 (4.35), 360 (4.34)

3.- **Eupafolina** UV (MeOH) λ_{\max} (log e): 259 (4.12), 273(4.03), 347 (4.09) nm

4.- **3,4',5,7-tetrahidroxi-6-metoxi-flavona 3-O-b-d-glucopyranoside**

UV (MeOH) λ_{\max} (log e): 270 (4.22), 343 (4.26) nm

5.- **Luteolina** UV (MeOH) λ_{\max} (log e): 242 (s) (4.04), 254 (4.11), 292 (s) (3.85), 348 (4.20)

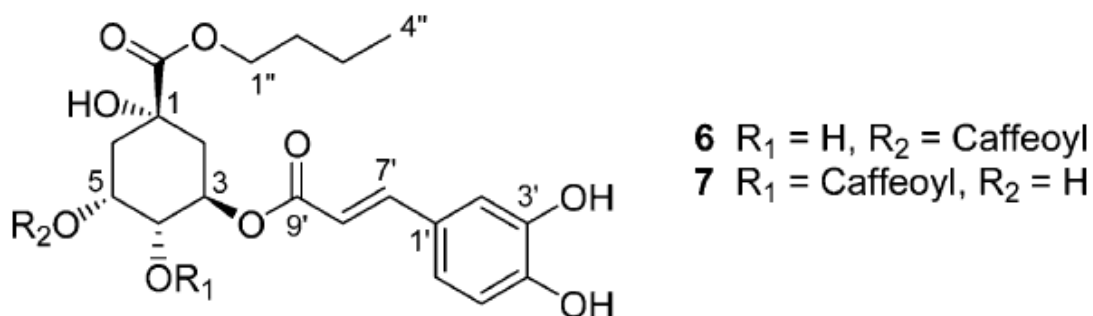
Estos mismos autores citan para esta especie la presencia de **derivados dicafeoilquinicos**, tales como:

6.- **n-butil ester del ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico**

UV (MeOH) λ_{\max} (log e): 329.5, 241, 219.5 nm. (Peng et al, 2000)

7.- **n-butil ester del ácido 3,4-Di-O-caffeoylquinico**

UV (MeOH) λ_{\max} (log e): 242 (log ' 4.29), 300 sh (4.39), 331 (4.52) nm (Um et al., 2002)



Basándonos en los trabajos de los autores anteriormente citados, y comparando los datos obtenidos con los de la bibliografía, podemos efectuar un análisis preliminar de los HPLC-DAD realizados para los extractos DCM y MeOH de *Mikania cordifolia* y *M. micrantha*, a fin de obtener una primera aproximación sobre la naturaleza de los grupos fitoquímicos presentes, así como detectar la existencia de compuestos similares en las especies estudiadas.

Las características de los espectros UV de los picos presentes en los extractos DCM guardan similitud con las de los derivados dicafeoilquinicos (pico 5) en *M. cordifolia*, y la flavona eupafolina (pico 3) en *M. micrantha*.

En el extracto MeOH de *M. cordifolia*, los espectros UV de los picos presentes guardan similitud con los correspondientes a una flavona trisustituida (pico 2), otra flavona, la luteolina (pico 4) y derivados dicafeoilquinicos (pico 8).

En el caso del extracto MeOH de *M. micrantha*, los espectros UV de sus picos principales (picos 3, 5, 6, 7, 8) parecen guardar similitud con el de los derivados dicafeoilquinicos citados por Peng *et al.* (2000), Um *et al.* (2002) y Wei *et al.* (2004).

Estas observaciones concuerdan con los resultados de las pruebas químicas orientativas y CCD realizadas.

Respecto a la presencia de lactonas, los datos aportados por el HPLC-DAD son insuficientes para poder efectuar un análisis preliminar de la presencia de estos compuestos en las especies ensayadas. Este tipo de compuestos absorben en general a λ 205-225 nm las α,β insaturadas, en tanto las saturadas no absorben por encima de λ 200 nm (Dominguez, 1973).

No obstante, no podemos descartar su presencia, especialmente en los extractos DCM, dado que la CCD de los mismos evidencia la presencia de compuestos que reaccionan con el anisaldehído sulfúrico, si bien se necesitaría realizar su aislamiento y otros ensayos, tales como la determinación de su espectro IR, para poder verificar su existencia.

6.3. Actividad gastrointestinal

El extracto acuoso de *Mikania micrantha* presenta un efecto antiespasmódico, evidenciado por un antagonismo no-competitivo de la curva dosis-repuesta de Ach, con una CI50 de 0,54 mg/mL (ver Fig. 5.23). Este comportamiento se pone de manifiesto analizando las curvas dosis-respuesta de Ach dependiente de la concentración (ver Fig.5.22), en las que se observa una disminución del efecto máximo (Emax) con

concentraciones crecientes del extracto de *M. micrantha*, hasta llegar a una inhibición completa a concentraciones de 3 mg extracto/mL de cuba.

De esta manera su actividad se corresponde con la exhibida por un antagonista no competitivo, puesto que inhibe parcial o totalmente (dependiendo de la dosis) el efecto de los agonistas, para el rango usual de concentración. En consecuencia, no compite con ellos ni puede ser desplazado a mayores concentraciones, ya que no actúa en el mismo receptor que el agonista, sino en algún otro punto de la cascada intracelular que conduce al efecto del mismo (Kenakin, 1984).

El antagonismo no-competitivo sugiere un efecto directo del extracto sobre el músculo liso (Goodman & Gilman, 2005). La evaluación de los efectos de concentraciones crecientes del extracto sobre las curvas dosis-respuesta de Ca^{+2} , en medio despolarizante de alta $[\text{K}^+]_o$, demuestra que dicho comportamiento está asociado al antagonismo del influjo de calcio a través de canales, por una vía no competitiva (ver Fig.5.26).

El comportamiento mostrado por el extracto de *M. cordifolia* fue diferente. Analizando las curvas dosis-respuesta de Ach (ver Fig. 5.24), se puede observar una potenciación del efecto contráctil a bajas $[\text{Ach}]_o$ (0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$), seguido de un antagonismo a altas $[\text{Ach}]_o$ (desde 0,1 a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ambos dependientes de la concentración del extracto de *M. cordifolia* (entre 0,1 y 1 mg/mL). Este comportamiento sugiere la presencia de un componente que actúa como agonista.

El efecto agonista muscarínico de *M. cordifolia* fue finalmente comprobado mediante las curvas dosis-respuesta realizadas en comparación con las curvas dosis-respuesta de Ach, en las que se obtuvo para *M. cordifolia* una CE_{50} de 4,16 mg/mL , y el bloqueo total por el pretratamiento con atropina (ver Fig. 5.25), típico antagonista competitivo de los receptores muscarínicos. La potencia agonista de *Mikania cordifolia* fue mucho menor (3×10^4 veces) que la de Ach.

Por otra parte, a concentraciones más altas de Ach el extracto acuoso de *M. cordifolia* produjo una disminución del efecto máximo de las curvas dosis-respuesta de Ach, dependiente de la concentración. Dichas curvas se corresponden con una actividad

antagonista no competitivo del extracto de *M. cordifolia*, con una CI50 de 2,04 mg/mL (ver Fig.5.25).

La *potencia* de ambas especies de *Mikania* como antagonista no-competitivo de la Ach, es cercana a la del cedrón, *Aloysia citriodora* Palau (Verbenaceae), otra conocida planta antiespasmódica, que presenta una CI50 de 1,34 mg/mL (Ragone *et al.*, 2007). Más específicamente, la potencia de *M. micrantha* es aproximadamente el doble de la de cedrón, mientras que la de *M. cordifolia* es la mitad.

Luego de efectuar una revisión exhaustiva de la bibliografía disponible (Science Direct, Base de datos NAPRALERT, MedLine Plus, etc.), podemos decir que hasta el momento no se han comunicado resultados de trabajos referentes a la actividad gastrointestinal de extractos de las especies en estudio.

Sin embargo, existen en la literatura reportes de actividad antidiarreica de *M. glomerata* en ratones (Salgado *et al.*, 2005) y de actividad antiespasmódica de extractos de *M. glomerata* en intestino aislado de rata, que según Aboy *et al.* (2002) se debería a una inhibición no competitiva en las CDR de Ach y de histamina.

Si bien estos últimos autores no determinan el mecanismo subyacente a dicho efecto, sí desestiman que el mismo sea debido a la presencia de cumarinas.

La novedad del presente trabajo, es que los efectos que exhiben los extractos acuosos de *M. micrantha* y *M. cordifolia*, se producen, respectivamente, por inhibición del influjo de Ca⁺² y por la presencia de componentes con actividad agonista, no encontrados en *M. glomerata*.

Respecto a esto último, no son frecuentes los compuestos con actividad colinérgica provenientes de los vegetales, a excepción de algunos alcaloides como pilocarpina, arecolina o derivados de la colina. Los datos que arrojaron los ensayos para el extracto de *M. cordifolia* condujeron a realizar ensayos químicos destinados a poner en evidencia la presencia de compuestos similares.

Los resultados obtenidos para los test preliminares de alcaloides, reacciones generales y cromatografía en capa delgada, (ver ítem 5.2.), constituyen una buena

aproximación respecto a la presencia de alcaloides en la decocción de *M. cordifolia*, a los que podría deberse la actividad colinérgica que muestra dicho extracto.

Por otra parte, los efectos antagonistas no-competitivos de Ach de los dos extractos acuosos ensayados y el antagonismo no-competitivo de Ca^{+2} de *M. micrantha* son compatibles con la presencia de flavonoides, evidenciados por los resultados obtenidos en los ensayos con el reactivo de Shinoda y soluciones alcohólicas al 2% de Cl_3Al , Cl_3Fe , KOH y H_3BO_3 , (Dominguez, 1973) y en las correspondiente CCD.

Acerca de este punto, existen muchos reportes acerca de la actividad antagonista cálcica de flavonoides (Martino, 2000; Ghayur *et al.*, 2006; Bukhari *et al.*, 2007; Ragone *et al.*, 2007). Por ello se puede estimar que la actividad evidenciada por los extractos acuosos de ambas especies de *Mikania* ensayadas puede ser debida a la presencia de estos tipos de metabolitos secundarios.

7.- Conclusiones

1) Anatomía

En el presente trabajo se describen por primera vez las características anatómicas de los órganos vegetativos (utilizados en la medicinal popular) de *Mikania micrantha*, así como las dimensiones de los estomas y el índice estomático y de empalizada para *M. cordifolia* y *M. micrantha*.

Asimismo, después de efectuar las observaciones morfo-anatómicas del tallo, lámina y pecíolo de las mismas, se concluye que éstas pueden diferenciarse por distintos caracteres, los cuales se ven reflejados en la tabla que se presenta a continuación:

	Caracteres	<i>Mikania cordifolia</i>	<i>Mikania micrantha</i>
TALLO	Contorno e Indumento	hexacostado pubescente	lobulado glabrescente
	Aerénquima cortical	ausencia	presencia
	Esclerénquima pericíclico	presencia	ausencia
	Capa endodermoide	ausencia	presencia
	Casquete de fibras floemáticas	en los haces vasculares a la altura de las costillas	en todos los haces vasculares
	Conductos secretores esquizógenos	en la médula periférica	en los radios medulares (interfloemáticos)

TALLO Y HOJA	Epitelio del conducto secretor	unistrato con varias células	unistrato con cuatro células
LAMINA	Tipo de estomas	anomocíticos y anisocíticos	Anomocíticos
	Ubicación de los estomas	elevados	a nivel o ligeramente elevados
	Índice estomático	12,1 (10,8-14,4)	9,2 (10,7-13,6)
	Índice de empalizada	8,2 (6-12)	15,1 (7-23)
PECÍOLO	Lóbulos adaxiales e indumento	Lóbulos prominentes/ pubescente	Lóbulos poco prominentes/ glabro

2) Ensayos fitoquímicos preliminares

- * *Mikania cordifolia* y *M. micrantha* pueden ser diferenciadas por sus perfiles cromatográficos por CCD en distintos sistemas de solventes, lo cual constituye un buen aporte a un eventual control de calidad, ya sea de la materia prima o de especialidades medicinales que las contengan.
- * Ambas especies poseen flavonoides que se hallarían principalmente como heterósidos.
- * De acuerdo a las pruebas químicas orientativas, CCD y a la HPLC-DAD entre estos flavonoides se hallaría la flavona eupafolina (*M. micrantha*).
- * Posible presencia de derivados dicafeoilquinicos, especialmente en *M. micrantha*.
- * No se observa la presencia de 1,2-benzopirona (cumarina) en ninguno de los extractos ensayados, lo que permite suponer una gran variabilidad química de acuerdo al hábitat y/o condiciones de cultivo para estas especies.
- * Existe una buena presunción de la presencia de sustancias pertenecientes al grupo fitoquímico alcaloides en *M. cordifolia*.

3) Actividad gastrointestinal

Luego de efectuar una revisión exhaustiva de la bibliografía disponible (Science Direct, Base de datos NAPRALERT, MedLine Plus, etc.), se puede afirmar que la actividad gastrointestinal de los extractos acuosos de las especies ensayadas en el presente trabajo es presentada por primera vez, resultando sumamente interesante la manera en que ambos extractos se han comportado.

* El extracto acuoso de *Mikania micrantha* presenta un efecto antiespasmódico, evidenciado por un antagonismo no-competitivo de la curva dosis-repuesta de Ach, con una CI50 de 0,54 mg/mL, lo que sugiere un efecto directo del extracto sobre el músculo liso, demostrándose que dicho comportamiento está asociado al antagonismo del influjo de calcio a través de canales, por una vía no competitiva.

* El extracto acuoso de *Mikania cordifolia* mostró efecto dual en la contractilidad intestinal: agonista a una CE50 de 4.16 mg/ml y antagonista a CI50 de 2.04 mg/ml.

* Como agonista, la potencia de *Mikania cordifolia* es mucho menor (3×10^4 veces) que la de Ach, lo que sugiere la presencia de componentes con actividad agonista.

* La *potencia* de ambas especies estudiadas como antagonistas no-competitivos de la Ach, es cercana a la del cedrón, *Aloysia citriodora* Palau (Verbenaceae), conocida planta antiespasmódica.

* La potencia de *M. micrantha* es aproximadamente el doble de la de cedrón, mientras que la de *M. cordifolia* es la mitad.

4) Conclusión final

Las especies *M. cordifolia* y *M. micrantha* no son equivalentes en lo que respecta a su composición química y acciones farmacológicas, por lo que la determinación de elementos anatómicos de diagnóstico y el establecimiento de perfiles cromatográficos resulta especialmente relevante a la hora de su utilización como materia prima de medicamentos seguros y eficaces.

PROYECCION FUTURA

El trabajo aquí presentado tendrá su continuación con el aislamiento y determinación estructural de los compuestos presentes en los extractos de *Mikania cordifolia* y *Mikania micrantha*, así como la determinación de otras actividades biológicas, como tema de una futura Tesis Doctoral.

8.- Resumen

***Mikania cordifolia* y *Mikania micrantha* (Asteraceae):**

Especies medicinales nativas de las Reservas Naturales de Punta

Lara e Isla Martín García, Buenos Aires, Argentina

Anatomía, ensayos fitoquímicos y actividades biológicas

Tesis de Maestría para optar al grado de

Magíster en Plantas Medicinales, UNLP

Ingeniero Agrónomo

Marta Noemí Colares

Directora de Tesis

Prof. Dra. Ana María Arambarri

Co-Directora

Dra. María Adelaida Rosella

Lugar de trabajo:

Cátedra de Morfología Vegetal, Depto. de Ci. Biológicas, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Cátedra de Farmacognosia, Depto. de Ci. Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata

2010

Introducción

Algunas especies del género *Mikania* Willd. (Asteraceae), vulgarmente conocidas como “guaco”, son empleadas tradicionalmente con fines medicinales como antitusivas, expectorantes y alexíteras, entre otros, en gran parte de Latinoamérica, especialmente Brasil, donde algunas son cultivadas con el propósito de utilizarlas en la formulación de diversos medicamentos fitoterápicos conteniendo extractos de “guaco”.

En la provincia de Buenos Aires crecen seis especies de *Mikania*, entre ellas dos con reconocidas propiedades medicinales: *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd. y *Mikania micrantha* Kunth acerca de las cuales existen datos incompletos respecto a la anatomía de los órganos empleados con fines medicinales tales como tallos y hojas y a las acciones biológicas que pueden llevar cabo los extractos de los mismos.

El trabajo de investigación se encuentra dirigido al estudio anatómico y farmacognóstico de *Mikania cordifolia* y *Mikania micrantha*. Estas especies tienen propiedades medicinales y son usadas en medicina popular, lo que las hace potencialmente útiles para la elaboración de medicamentos fitoterápicos. Por ello resulta de interés establecer las características macro y micromorfológicas que aseguren su correcta identificación botánica, así como la definición de perfiles cromatográficos para el reconocimiento de su composición química. Asimismo, en este trabajo se presentan también ensayos a nivel gastrointestinal de los extractos acuoso, diclorometánico y metanólico de ambas especies.

Por lo antes expuesto es que el objetivo general del presente trabajo es validar el uso tradicional de *M. cordifolia* y *M. micrantha*, de modo de contribuir a la revalorización de la flora autóctona argentina, para su mejor aprovechamiento medicinal o alimenticio.

RESULTADOS OBTENIDOS

1. Caracteres anatómicos

Mikania cordifolia* y *M. micrantha

Arquitectura foliar: En ambas especies la venación es actinódroma basal, con cinco venas primarias que divergen radialmente de un punto único en la base de la hoja y convergen en el ápice de la misma. El desarrollo es perfecto reticulado. La venación terciaria es reticulada y la cuaternaria está orientada al azar. La venación marginal es incompleta (las vénulas terminan libres adyacentes al margen) y la areolación está bien desarrollada.



***Mikania cordifolia* (L. f.) Willd.**



***Mikania micrantha* Kunth**

Epidermis vista en superficie (VS): En ambas especies la epidermis **adaxial** presenta células con paredes anticlinales rectas a ligeramente curvadas, mientras que en la epidermis **abaxial** son curvadas u onduladas, sin ornamentación cuticular en *M. cordifolia* y con cutícula levemente estriada radialmente respecto a los estomas en *M. micrantha*. Estomas de tipo anomocítico y anisocítico (predominando los primeros) han sido hallados en *M. cordifolia* y solamente anomocíticos en *M. micrantha*, en ambas especies solo en la cara abaxial, caracterizando a la hoja como hipostomática. Estos están ubicados elevados con respecto a las demás células epidérmicas en *M. cordifolia*, mientras que en *M. micrantha* se hallan a nivel o ligeramente elevados. Los tamaños de estomas (longitud y latitud), así como los índices calculados (estomático y de empalizada) se pueden observar en la Tabla siguiente:

TAXA CARACTERES	<i>M. cordifolia</i>			<i>M. micrantha</i>		
	Rango	Promedio	Moda	Rango	Promedio	Moda
Longitud (µm)	20-35	28,1 (±3,8)	30	30-40	35,3 (±3,8)	35
Latitud (µm)	15-20	20,1 (± 1,8)	20	20-25	21,9 (± 2,4)	20
Índice estomático	11 -14	12,1	13,4	10,7-13,6	9,3	11,7
Índice empalizada	6-12	8,2	8	7-23	15,1	17

En ambas caras de la hoja de las dos especies, se presentan **tricomas** de dos tipos: eglandulares y glandulares:

Los **eglandulares** en *M. cordifolia* son pluricelulares, simples y están compuestos por 2-8 células, presentando cutícula lisa y delgada en toda su extensión. La longitud varía en relación al número de células que los forman y va de 200 µm a 680 µm. En *M. micrantha* presentan la cutícula gruesa y la célula apical pronunciadamente aguda y la longitud de los mismos varía entre 60 µm y 220 µm.

Los **glandulares** son similares en ambas especies y se diferencian por sus características en dos subtipos: (a) tricomas constituidos por un pie simple de 3-4 células y cabeza unicelular esférica; (b) tricomas peltados con pie corto de 1-2 células y cabeza bicelular. Estos últimos ubicados en depresiones de la epidermis.

TAXA		<i>M. cordifolia</i>	<i>M. micrantha</i>
TRICOMAS			
Longitud media (µm)		287,8	133,2
Densidad media (n°/mm ²)	adaxial	23,4	9,2
	abaxial	73,0	48,0

La **densidad de tricomas** determina que *M. cordifolia* aparezca pubescente mientras que *M. micrantha* es glabrescente.

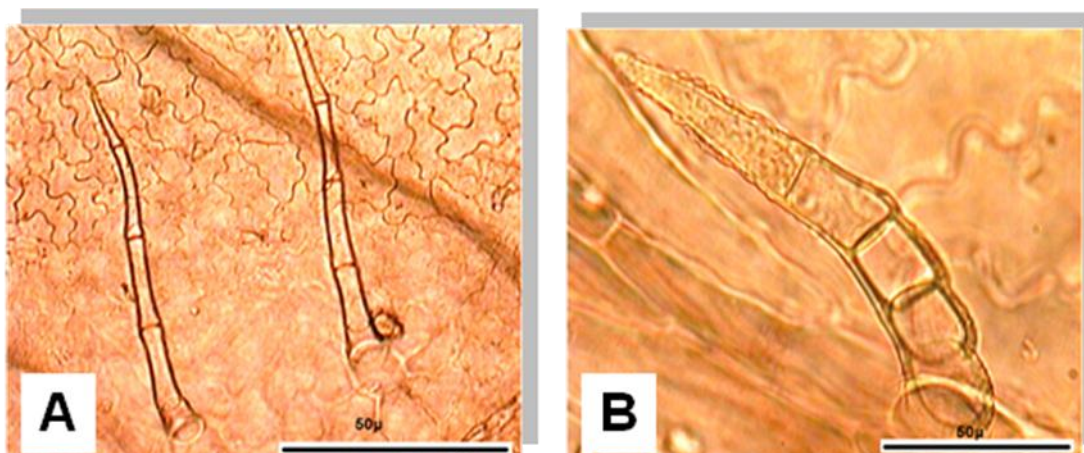


Fig. 2. Tricomas glandulares. **A,** *Mikania cordifolia*: tricomas pluricelulares, lisos. **B,** *M. micrantha*: tricomas pluricelulares con la célula apical notablemente aguda y con la superficie rugosa con gránulos de ceras. Escalas 50 micrómetros.

Lámina en corte transversal (CT)

En ambas especies la epidermis es unistrata. El mesofilo es de tipo dorsiventral constituido por 1(2) capa de parénquima en empalizada de células cortas y anchas hacia la cara adaxial y 1 (2) capas de parénquima esponjoso laxo hacia la cara abaxial. La vena media es biconvexa con tres haces colaterales dispuestos en forma de arco rodeados por parénquima. En posición subepidérmica hay colénquima angular. Se observan conductos secretores esquizógenos con epitelio unistrato ubicados frente al xilema de los haces vasculares. La diferencia entre ambas especies está dada por el número de células que forman el epitelio secretor de los conductos, el cual está formado por más de 4 células en *M. cordifolia* y por cuatro células en *M. micrantha*. Esta característica se mantiene en el pecíolo y tallo, resultando de valor taxonómico a nivel específico.

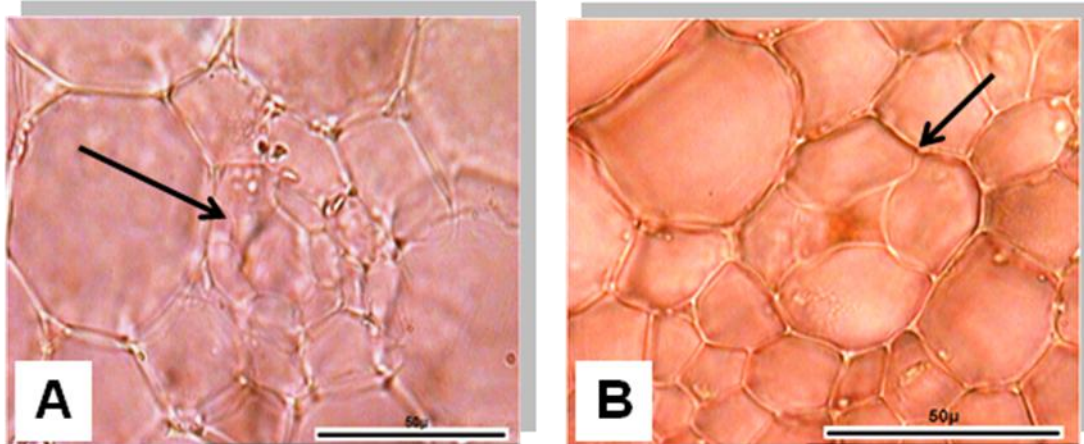


Fig. 3. Conductos secretores. A, *Mikania cordifolia*: mostrando el conducto con epitelio formado por más de cuatro células (flecha). **B, *M. micrantha*:** mostrando el conducto con epitelio formado por cuatro células (flecha). Escalas 50 micrómetros.

Pecíolo en corte transversal (CT)

Presenta contorno redondeado, con la cara abaxial convexa y la cara adaxial plana, con dos lóbulos prominentes en *M. cordifolia*, mientras que éstos son poco marcados en *M. micrantha*. Epidermis unistrata, notablemente pubescente en *M. cordifolia* y con estomas elevados (en algunos casos, en columna), mientras que es glabrescente en *M. micrantha* con estomas ubicados a nivel o ligeramente elevados. La corteza está formada por colénquima angular discontinuo, ubicado en la cara ventral y en los lóbulos, alternando con clorénquima. Este seguido de parénquima donde el tejido vascular está dispuesto formando un arco de haces colaterales que reducen su tamaño desde la cara abaxial hacia los lóbulos adaxiales. En los radios medulares se visualizan los conductos secretores esquizógenos, con las mismas características que en la lámina. La diferencia entre las especies estudiadas está dada por la densidad de tricomas y el grado de manifestación de los lóbulos ventrales.

Tallo en corte transversal (CT)

El corte transversal de un entrenudo joven (2,5 mm de diámetro) muestra un contorno hexacostado en *M. cordifolia* y apenas lobado en *M. micrantha*. En ambas especies la epidermis es unistrata, pubescente en *M. cordifolia*, glabra en *M. micrantha*. Los tipos de tricomas y disposición de los estomas respecto al nivel de las restantes células es igual que en la hojas. La corteza presenta varias capas de colénquima angular ubicado en mayor proporción en las costillas y lóbulos, seguido de parénquima en el cual se destacan los grandes espacios aerénquimáticos en *M. micrantha* que están ausentes en *M. cordifolia*. En *M. cordifolia* rodea el cilindro vascular un anillo de fibras que en tallos de mayor diámetro está acompañado de esclereidas, mientras que *M. micrantha* presenta una capa endodermoide rodeando al cilindro vascular. Los haces vasculares de la eustela muestran casquetes prominentes de fibras floemáticas a nivel de las costillas, siendo menores en los restantes haces en *M. cordifolia*, diferencia que no se observa en *M. micrantha*. En ambas especies la médula es parenquimática y fistulosa. En *M. cordifolia*, los conductos secretores se ubican en la médula periférica, mientras que en *M. micrantha* se hallan en el cilindro vascular ubicados en el parénquima de los sectores interfloemáticos. **Cristales.** No fueron hallados en ninguna de las especies.

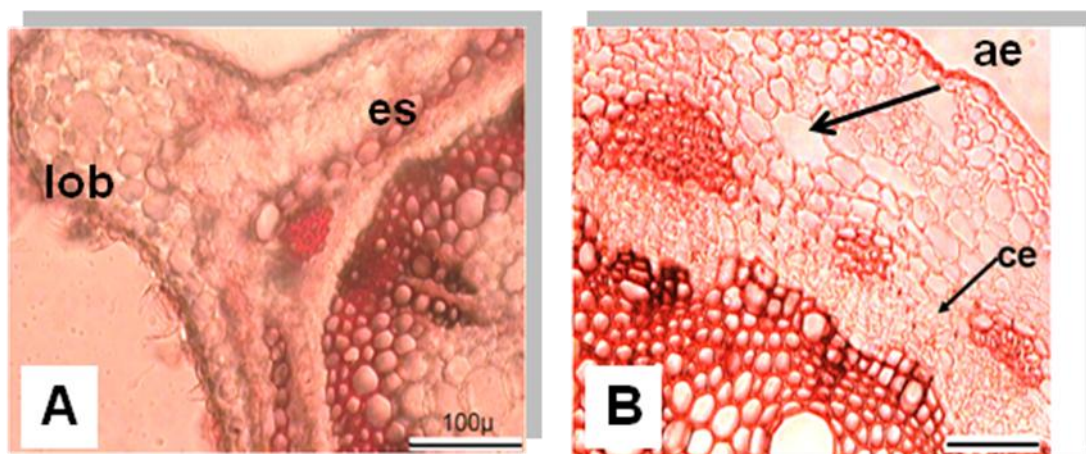


Fig. 4. Tallo en corte transversal. A, *Mikania cordifolia*: lóbulo prominente (lob); anillo de esclerenquima perivascular (es). **B, *M. micrantha*:** mostrando la corteza sin anillo esclerenquimático; ae, aerénquima; ce, conducto esquizógeno secretor. Escalas 100 micrómetros.

2. Ensayos fitoquímicos preliminares

Desde el punto de vista fitoquímico, tanto las pruebas químicas realizadas, como el análisis de los perfiles cromatográficos por CCD y HPLC-DAD, así como de los espectros UV en comparación con datos bibliográficos, permitieron efectuar una primera aproximación acerca de la naturaleza de los grupos fitoquímicos presentes en los extractos diclorometánico, metanólico y acuoso de *M. cordifolia* y *M. micrantha*.

Extractos diclorometánicos: A pesar de que los perfiles cromatográficos son diferentes, presentan por CCD para ambas especies varias bandas que reaccionan con anisaldehído sulfúrico, indicando la presencia de compuestos de naturaleza terpenoide. Asimismo, las CCD realizadas para poner de manifiesto la cumarina (1-2 benzo pirona) dio resultado negativo para ambas especies, por lo cual esta sustancia no se hallaría presente en los extractos DCM de éstas.

Analizando los perfiles por HPLC-DAD, se observa la presencia de varios picos cuyos espectros UV, guardan similitud con las de los derivados dicafeoilquinicos (pico 5) en *M. cordifolia*, y la flavona eupafolina (pico 3) en *M. micrantha*.

Extractos metanólicos: Los ensayos realizados y las CCD efectuadas sobre los extractos de ambas especies se corresponden con lo esperado para el grupo fitoquímico flavonoide con al menos dos -OH fenólicos adyacentes (reacciones con Cl_3Al , Cl_3Fe , KOH) y la presencia de un $\text{C}=\text{O}$ en posición 4 asociado a un -OH en C5 del núcleo flavonoide A. También es notorio que aun antes del agregado de los reactivos, el extracto de *M. micrantha* presenta fluorescencia celeste, propia de derivados cafeoil quinicos.

Para las reacciones generales de alcaloides, el resultado es positivo con todos los reactivos ensayados, para el extracto metanólico de *M. cordifolia* en tanto, que para *M. micrantha* sólo resultó positiva la reacción en presencia de ácido pícrico.

También es notorio que para ambos extractos las CDD efectuadas para poner de manifiesto la presencia de cumarina arrojaron resultados negativos.

Analizando los perfiles por HPLC-DAD, en el extracto MeOH de *M. cordifolia*, los espectros UV de los picos presentes guardan similitud con los correspondientes a una

flavona trisustituida (pico 2), otra flavona, la luteolina (pico 4) y derivados dicafeoilquínicos (pico 8).

En el caso del extracto MeOH de *M. micrantha*, los espectros UV de sus picos principales (picos 3, 5, 6, 7, 8) parecen guardar similitud con el de los derivados dicafeoilquínicos.

Extractos acuosos: Tanto los ensayos fitoquímicos como las CCD realizadas sobre ambos extractos arrojaron la presunción de la presencia de compuestos del grupo fitoquímico flavonoide (al igual que los extractos metanólicos), y al igual que lo que ocurría con el extracto metanólico de *M. micrantha*, también el extracto acuoso presenta fluorescencia celeste propia de derivados cafeoil quínicos.

El hecho de que esta serie de ensayos fuera positivo en los extractos MeOH y acuoso, estaría indicando que los compuestos de naturaleza flavonoide se hallan predominantemente bajo la forma de heterósidos.

Respecto a las reacciones generales de alcaloides, el resultado es positivo con los reactivos de Dragendorf, ácido pícrico y ácido tánico para el extracto acuoso de *M. cordifolia*.

Por último cabe destacar que con respecto a la presencia de lactonas, los datos aportados por el HPLC-DAD son insuficientes para poder efectuar un análisis preliminar de la presencia de estos compuestos en las especies ensayadas. No obstante, no podemos descartar su presencia, especialmente en los extractos DCM, dado que la CCD de los mismos evidencia la presencia de compuestos que reaccionan con el anisaldehído sulfúrico, si bien se necesitaría realizar su aislamiento y otros ensayos, tales como la determinación de su espectro IR, para poder verificar su existencia.

3. Actividad gastrointestinal

Los extractos acuosos de ambas especies ensayadas han demostrado que, además de ejercer una acción sobre el ileon aislado de rata, se comportan de una manera diferente.

El extracto acuoso de *Mikania micrantha* tiene efecto antiespasmódico a CI50 de 0.54 mg/ml, lo cual evidencia un antagonismo no competitivo de Ach y sugiere un efecto directo del extracto sobre el músculo liso. La evaluación de los efectos de concentraciones crecientes del extracto sobre las curvas dosis-respuesta de Ca^{+2} , en medio despolarizante de alta $[K^+]_o$, demuestra que dicho comportamiento está asociado al antagonismo del influjo de calcio a través de canales, por una vía no competitiva.

En tanto, el extracto acuoso de *Mikania cordifolia* mostró un comportamiento diferente. Analizando las curvas dosis-respuesta de Ach, se puede observar una potenciación del efecto contráctil a bajas $[Ach]_o$ (0,01 μ g/mL), seguido de un antagonismo a altas $[Ach]_o$ (desde 0,1 a 30 μ g/mL), ambos dependientes de la concentración del extracto de *M. cordifolia* (entre 0,1 y 1 mg/mL). Este comportamiento sugiere la presencia de un componente que actúa como agonista.

El efecto agonista muscarínico de *M. cordifolia* fue finalmente comprobado mediante las curvas dosis-respuesta realizadas en comparación con las curvas dosis-respuesta de Ach, en las que se obtuvo para *M. cordifolia* una CE50 de 4,16 mg/mL, y el bloqueo total por el pretratamiento con atropina, típico antagonista competitivo de los receptores muscarínicos. La potencia agonista de *Mikania cordifolia* fue mucho menor (3×10^4 veces) que la de Ach.

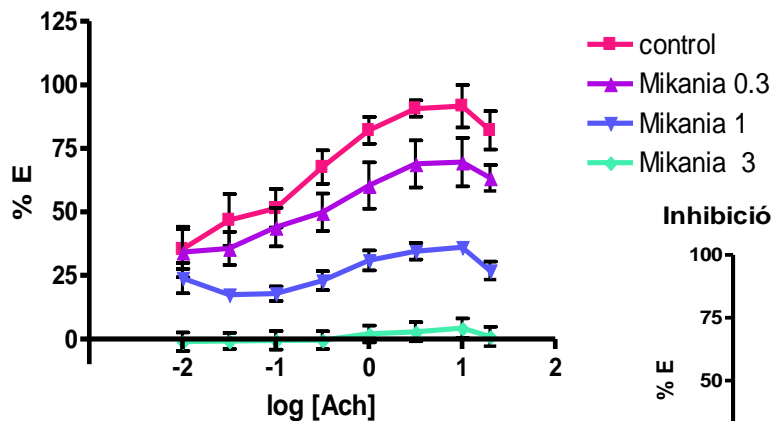
Por otra parte, a concentraciones más altas de Ach el extracto acuoso de *M. cordifolia* produjo una disminución del efecto máximo de las curvas dosis-respuesta de Ach, dependiente de la concentración. Dichas curvas se corresponden con una actividad antagonista no competitivo del extracto de *M. cordifolia*, con una CI50 de 2,04 mg/mL .

La potencia de ambas especies de *Mikania* como antagonista no-competitivo de la Ach, es cercana a la del cedrón, *Aloysia citriodora* Palau (Verbenaceae), conocida planta

antiespasmódica, que presenta una CI50 de 1,34 mg/mL. Más específicamente, la potencia de *M. micrantha* es aproximadamente el doble de la de cedrón, mientras que la de *M. cordifolia* es la mitad.

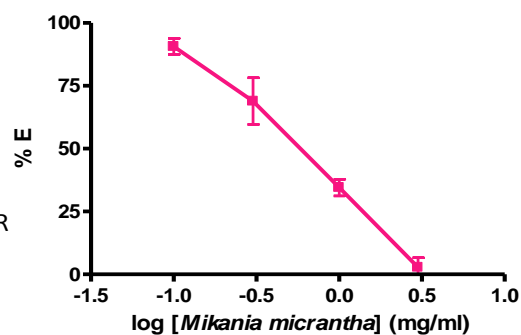
Efectos del extracto acuoso de *M. micrantha*

Mikania micrantha en CDR Ach íleon de rata



Efecto del extracto de *M. micrantha* (en mg/mL) sobre las CDR de Ach (n= 6 experimentos). pD2 Ach: $6,66 \pm 0,28$

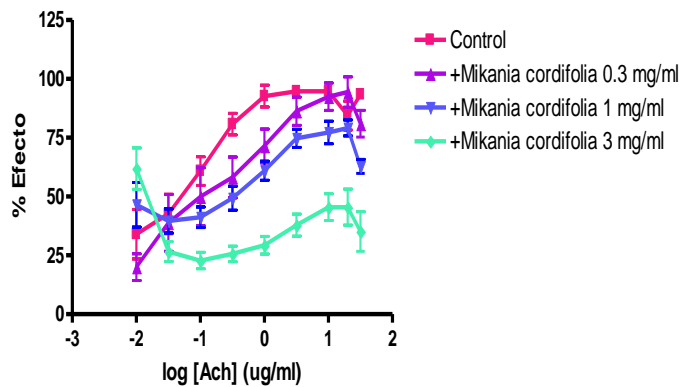
Inhibición de la CDR de Ach en íleon de rata



Curvas de inhibición y cálculo de la concentración inhibitoria 50% del extracto de *M. micrantha* (CI50: $0,54 \pm 0,05$ mg/mL) frente a Ach en el intestino de rata aislada.

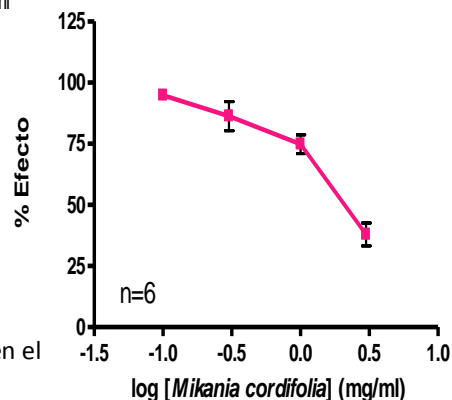
Efectos del extracto acuoso de *M. cordifolia*

Mikania cordifolia en CDR Ach ileon de rata



Efecto del extracto de *M. cordifolia* sobre las CDR de Ach en el intestino de rata aislada (n=6) pD_2 Ach: $6,69 \pm 0,21$

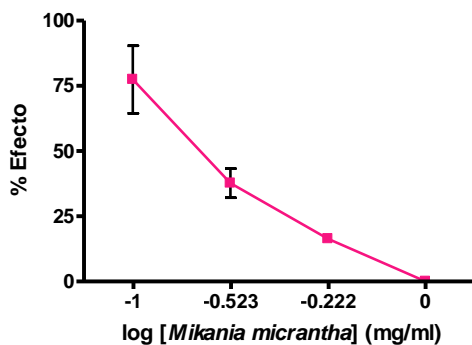
Inhibición de la CDR de Ach en ileon de rata



Curvas de inhibición y cálculo de la concentración inhibitoria 50% del extracto de *M. cordifolia* (CI 50: $2,04 \pm 0,06$ mg/mL) frente a Ach en el intestino de rata aislada.

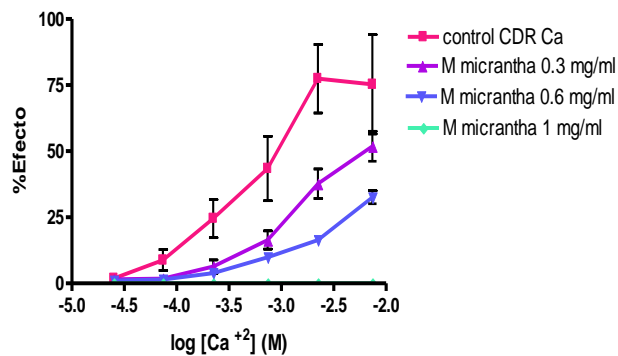
Efectos de *M. micrantha* sobre las CDR de Ca^{+2}

Inhibición de CDR de Ca^{+2} en ileon de rata



a

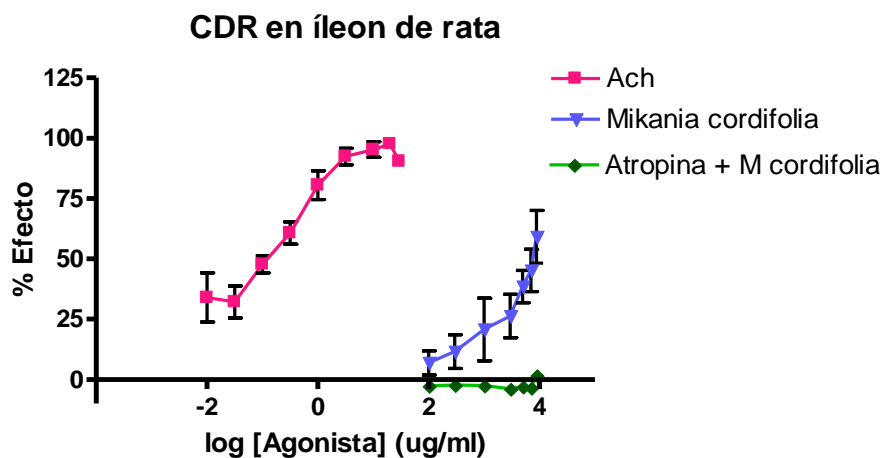
Mikania micrantha en CDR de Ca^{+2}



b

Efectos del extracto de *M. micrantha* sobre la CDR de Calcio (a) y cálculo de la CI 50% ($0,51 \pm 0,06$ mg/mL) (b). Notar que desplazó no competitivamente al calcio.

Efectos de *M. cordifolia* como agonista



Efectos del extracto de *M. cordifolia* como agonista en comparación con ACh, y en presencia de atropina 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (CE50 ACh: $0,14 \pm 0,06 \text{ mg}/\text{mL}$, $n=4$). La CE 50 de *M. cordifolia* ($4,168 \pm 1,94 \mu\text{g}/\text{mL}$, $n=4$) fue totalmente inhibida por atropina.

4) Conclusión final

Las especies *M. cordifolia* y *M. micrantha* no son equivalentes en lo que respecta a su composición química y acciones farmacológicas, por lo que la determinación de elementos anatómicos de diagnóstico y el establecimiento de perfiles cromatográficos resulta especialmente relevante a la hora de su utilización como materia prima de medicamentos seguros y eficaces.

PROYECCION FUTURA

El trabajo aquí presentado tendrá su continuación con el aislamiento y determinación estructural de los compuestos presentes en los extractos de *Mikania cordifolia* y *Mikania micrantha*, así como la determinación de otras actividades biológicas, como tema de una futura Tesis Doctoral.

9.- Anexos

RESERVA NATURAL DE USO MÚLTIPLE ISLA MARTÍN GARCÍA



Esta Reserva cuenta con una superficie de 180 has y fue creada en 1969 por medio de la Ley Provincial N° 7.580. Está ubicada en el extremo norte de la provincia de Buenos Aires, al sur de la desembocadura del Río Uruguay, dentro

del Río de la Plata superior y a unos 46 km en línea recta desde la ciudad de Buenos Aires.

La isla cuenta con una rica historia que ha motivado su declaración de "Lugar Histórico" por Decreto Nacional 4.718/58. En 1516 fue descubierta por Don Juan Díaz de Solís, quien sepulta en la isla al despensero de su nave de nombre Martín García. El lugar se constituyó en un sitio estratégico para custodiar el Río de la Plata, siendo escenario de varios combates navales desde 1810 entre las escuadras patriotas y las invasoras tanto de origen brasileño como anglo-francesas.



En la isla funcionó una cantera de la cual se extrajeron los materiales para empedrar la ciudad de Buenos Aires; funcionó un Lazareto y Crematorio mandado a construir durante la Presidencia de Domingo F. Sarmiento en 1874, el cual tuvo gran actividad durante la epidemia de fiebre amarilla que

azotó a la Argentina en 1881; desde 1881 hasta 1960 funcionó un Penal civil y militar; fueron alojados en carácter de presos en la isla los ex-Presidentes institucionales Hipólito Yrigoyen, Juan D. Perón y Arturo Frondizi. El 19 de noviembre de 1973 la Argentina y la República Oriental del Uruguay firman el Tratado del Río de la Plata y su Frente Marítimo. En su artículo 45 se establece que la Isla Martín García será destinada exclusivamente a Reserva Natural para la conservación de la flora y fauna local.

La Isla Martín García, a diferencia de las islas del Delta del Paraná que son de origen aluvional, es un conjunto rocoso perteneciente al Macizo de Brasilia, de edad precámbrica (unos 1.800 millones de años). Su punto más alto tiene unos 27m sobre el nivel del mar, en las proximidades del faro, resultando la isla más alta de la región del Delta del Paraná. Las costas están constituidas por playas naturales usualmente de fragmentos de rocas del basamento cristalino o menos comúnmente de arenas. El clima es templado y húmedo con tendencia a cálido. La precipitación media anual es de 1.000mm.



La variedad ambiental y florística de la isla la convierten, junto con la Reserva Natural Punta Lara, en uno de los puntos de la provincia de Buenos Aires de mayor diversidad biológica. Las selvas marginales ocupan algunos sectores costeros de la isla. Se trata de una versión empobrecida de las selvas subtropicales presentes en Misiones. El estrato arbóreo está integrado por el ceibo, *Erythrina crista-galli* L. var. *crista-galli*, de conocidas flores rojas; el laurel criollo, *Nectandra* sp., una especie nativa pariente del Laurel del Viejo Mundo utilizado para condimento; el azota caballos, *Luehea divaricata* Mart., un espléndido árbol nativo, de gran desarrollo y hermoso follaje; el agarrapalo o Igua po-I, *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq., especie con infrutescencias semejantes a pequeños higos, muy consumidos por las aves que facilitan su dispersión, muchas veces cumpliendo su primeros años de vida como epífito sobre otro árbol hasta que sus raíces pueden alcanzar el suelo; el chalchal, *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Hieron. ex Niederl., de frutos carnosos que pasan del amarillo al naranja para tornarse finalmente rojizos; etc. Las lianas y enredaderas son muy comunes en estas selvas, destacándose el Cipó, *Asclepia* sp. y el cabello de angel, *Clematis montevidensis* Spreng.



Los bosques xeromórficos ocupan sectores con menor humedad de la isla, teniendo como especie dominante el espinillo, *Acacia caven* (Molina) Molina, arbolito de la familia de las leguminosas de notable floración a principios de primavera, cuando se cubre de inflorescencias amarillas, sumamente perfumadas. Otros integrantes arbóreos de estos bosques son el tala, *Celtis ehrenbergiana* (Klotzsch) Liebm., el coronillo, *Scutia buxifolia*



Rissek, el molle, *Schinus areira* L. y la sombra de toro, *Jodina rhombifolia* (Hook. & Arn.) Rissek, todos componentes típicos de los talares del norte de la provincia de Buenos Aires. Las dunas tienen su flora particular, constituida por varias herbáceas, como los *Senecios* y también se encuentran reducidos montes donde asoman los cardones, muchas veces semicubiertos de enredaderas y plantas apoyantes.

Buena parte de la superficie de la isla tiene formaciones boscosas que se han desarrollado sobre antiguos asentamientos humanos. Allí se pueden encontrar entremezclados viejos ejemplares cultivados, plantas de especies ornamentales exóticas asilvestradas y elementos de los montes nativos. Por su abundancia se destaca el coronillo en estos bosques periurbanos.

(Fuente: www.reservamartingarcia.com.ar/content.html Fotos: Santiago Martínez)

RESERVA NATURAL INTEGRAL PUNTA LARA

Esta Reserva Natural Integral (Equivalente UICN: Reserva Natural Estricta) fue creada por Decreto 18529 del año 1949, siendo éste el primer instrumento legal que ampara esta área protegida. Luego ratifican y modifican algunos aspectos, el Decreto Nº 5421 del año 1958 y las Leyes Provinciales Nº 11.544 y 12.814. La superficie del Área



Protegida Punta Lara asciende a 31has. Luego, distintas normativas, crearon áreas protegidas contiguas o que abarcaban a la original, con las que el conjunto asciende a las 3.000 has (Selva Marginal de Hudson, del Parque Provincial Pereyra Iraola y la R.N.I. Punta Lara).

Está ubicada entre los partidos de Berazategui y Ensenada, sobre la ribera del Río de La Plata, distante a 18km de la ciudad de La Plata.

El objetivo general de creación de esta unidad de conservación fue preservar sus características naturales específicas y propender al incentivo de la investigación. La finalidad más específica para establecer el área protegida fue salvaguardar la representatividad – en escala mucho más sencilla- esta muestra de selva misionera.

La importancia de la misma radica en que constituye el núcleo de selvas marginales con la distribución más austral del mundo.

Es un conjunto de ecosistemas ribereños de la costa del Río de la Plata que muestra el paisaje original de la ribera platense. Desde el punto de vista cultural, la zona de la Reserva presenta hallazgos arqueológicos en los arroyos de la selva y conserva el paisaje primigenio que observaran los primeros conquistadores, hace más de 400 años.



Como ya se ha mencionado, constituye el exponente más austral de las "selvas en galería" que bordean los ríos Paraná y Uruguay, con vegetación subtropical similar a la del sur del Brasil y gran parte de Misiones, y diferente a la vegetación de los alrededores.



Por ello es que presenta las típicas características selváticas: poca luz, grandes árboles que mantienen la humedad de la atmósfera y del suelo, favoreciendo el desarrollo de vegetales inferiores. Hay cerca de veinte especies de árboles, muchos de los cuales provienen de la selva

misionera siendo el río Uruguay más transportador de semillas que el Paraná. Se observa más especies características de las selvas en galería del primero que de este último. Está surcada por el arroyo Las Cañas. Hay numerosos artrópodos, anfibios, algunos mamíferos y gran variedad de aves. Con respecto a los suelos, éstos son de reciente formación, aportados por limos deltaicos, con zonas relictuales de ingresión marina. Mientras que el clima es templado, con una precipitación media anual 1000mm y temperatura media anual 18°C.

(Fuente: patrimonionatural.com- Fotos: Pablo Ramos Corrales, Marta Colares)

NOTA: La recolección de las especies vegetales incluidas en el presente trabajo fue autorizada por Disposición 09 - 10 del Organismo Provincial para el Desarrollo Sustentable (OPDS) de la Provincia de Buenos Aires, en razón de que la misma fue efectuada en las Reservas Naturales de Punta Lara e Isla Martín García.

Trabajos Científicos

Parte de los resultados de las investigaciones llevadas a cabo para la realización de esta Tesis fueron presentados en los siguientes Congresos y Reuniones Científicas y los mismos han sido aceptados para su publicación como proceeding (En Actas del Congreso).

“Anatomía foliar y caulinar de dos especies medicinales nativas de Argentina: *Mikania cordifolia* y *M. micrantha* (Asteraceae)”

Marta Colares., Ana M. Arambarri, María A. Rosella, Teresita Di Bernardi, Etile Spegazzini

XIX Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina “Fernando Cambieses Molina”

SILAE (Sociedad Italo-Latinoamericana de Etnomedicina). 6 Septiembre de 2010, Cagliari, Italia.

“Efectos gastrointestinales de *Mikania micrantha* Kunth and *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd (Asteraceae) en íleons aislados de rata”

Colares, M.; Muguerza, ^b; Debenedetti, S.²; Spegazzini, E.; Rosella, M.; Consolini, A.

1° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas –RICIFA 2010. Córdoba, Argentina- 24 y 25 de Junio de 2010

10.- Bibliografía

- ABOY, A. L., G. GONZÁLEZ ORTEGA, P. R. PETROVICK, A. LANGELOH & V. LINCK BASSANI. 2002. Atividade Antiespasmódica de Soluções extrativas de Folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco). *Acta Farmacéutica Bonaerense* **21** (3): 185-91.
- AHMED M., M. T. RAHMAN, M. ALIMUZZAMAN, J. A. SHILPI. 2001. Analgesic sesquiterpene dilactone from *Mikania cordata*. *Fitoterapia* **72**: 919-921.
- ALONSO, J. & C. DESMARCHELIER. 2005. *Plantas Medicinales Autóctonas de la Argentina*. Editorial L.O.L.A. (Literature of Latin America), Buenos Aires.
- AMAT, A.G. 1983. Taxones de Compuestas Bonaerenses críticos para la investigación farmacológica. *Acta Farmacéutica Bonaerense* **2**: 23-36.
- AKERETE, O. 1984. WHO's Traditional Medicine Programme: progress and perspectives. *WHO Chron.* **38**:78-81.
- ARIAS A. R., E. FERRO, A. INCHAUSTI, M. ASCURRA, N. ACOSTA, E. RODRIGUEZ & A. FOURNET. 1995. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae. *Journal of Ethnopharmacology* **45**:35-41.
- AUBAD LOPEZ P., B. A. ROJANO, T. LOBO ECHEVERRI. 2007. Actividad antioxidante en musgos. *Scientia et Técnica* **13**:23-26.
- BARDON, A., L. CARDONA, C. A. N. CATALAN & J. R. PEDRO. 1996. Norguaianolides and Germacranolides from *Mikania mendocina*. *Phytochemistry* **41**(3): 845-849.
- BARREDA, V. D., L. PALAZZESI, M. C. TELLERÍA, L. KATINAS, J. V. CRISCI, K. BREMER, M. G. PASSALIA, R. CORSOLINI, R. RODRÍGUEZ BRIZUELA & F. BECHIS. 2010. Eocene Patagonia Fossils of the Daisy Family. *Science* **329**.

- BODOK, E., R. OPREAN, L. VLASE, M. TAMAS & R. SANDULESCU. 2005. Fast determination of colchicine by TLC-densitometry from pharmaceuticals and vegetal extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **37**: 971-977.
- BOEGER, M. R. T, Y. ALQUINI & R. R. B. NEGRELLE. 2004. Características anatômicas da região nodal de estacas em diferentes fases de desenvolvimento de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel – Asteraceae) e formação de raízes adventícias. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, **6** (2): 1-6.
- BOHLMANN, F., T. BURKHARDT & C. ZDERO (eds.), 1973. *Naturally occurring Acetylenes*. London/New York, Academic Press. 547 pp.
- BOHLMANN, F., 1977. Summary of the chemistry of the Compositae. En: Heywood, Harborne & Turner (eds.), *The Biology and Chemistry of the Compositae*, **2**: 1097-1104. London, Academic Press.
- BOHM, B.A. & T.F. STUESSY, 2001. *Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae)*. Vienna, Springer. 831 pp.
- BUDEL J. M., M. R. DUARTE, I. KOSCIUV, T. B. DE MORAIS & L. P. FERRARI. 2009. Contribuição ao estudo farmacognóstico de *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker (guaco), visando o controle de qualidade da matéria-prima. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **19**(2B): 545-552.
- BUKHARI I. A., R. A. KAHN, A. U. GILANI, A. J. SHAH, J. HUSSAIN & V. U. AHMAD . 2007. The analgesic, anti-inflammatory and calcium antagonist potential of *Tanacetum artemisioides*. *Archives of Pharmacal Research* **30**: 303-312.

- CABRERA, A. L. 1961. Compuestas Argentinas: Clave para la determinación de los géneros. *Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales, Bernardino Rivadavia Instituto Nacional de Investigación en Ciencias Naturales, Botánica* **2**: 291-362.
- CABRERA, A. L. 1963. *Flora de la Provincia de Buenos Aires. Compuestas*. Colección Científica del INTA **6**: 53-58. Buenos Aires.
- CABRERA, A. L. 1976. *Regiones Fitogeográficas Argentinas. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería 2ª ed.* **2**: 1-85. Ed. Acmé. Buenos Aires.
- CABRERA A. L., J. V. CRISCI, G. DELUCCHI, S. E. FREIRE, D. A. GIULIANO, L. IHARLEGUI, L. KATINAS, A. A. SÁENZ, G. SANCHO & E. URTUBEY. 2000. *Catálogo ilustrado de las Compuestas (Asteraceae) de la Provincia de Buenos Aires, Argentina: Sistemática, Ecología y Usos*. COBIOBO Nº 2. PROBIOTA Nº1.
- CAROLLO, C. A., N. P. LOPES, & C. RODRIGUES DE OLIVEIRA. 2007. Identificação dos Compostos Polares de *Mikania cordifolia* por HPLC-DAD-MS. 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.
- CAROLLO, C. A. 2008. Análise fitoquímica e avaliação dos efeitos dos tipos de adubação, da radiação solar e do estresse hídrico, no acúmulo de metabólitos secundários em espécies do gênero *Mikania*. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. 228p.
- CASTRO, O., J. M. GUTIERREZ & M. BARRIOS. 1999. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpientes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Revista de Biología Tropical* **47**: 605-616.

- CAVIN, A., K. HOSTETTMANN, W. DYATMYKO & O. POTTERAT. 1998. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Medica* **64**: 393-396.
- CEOLIN A. C. G., C. BRATTI, S. C. HEREDIA VIEIRA & S. SCALON. 2009. Organização estrutural do caule de *Mikania cordifolia*, *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*. www.abhorticultura.com.br/biblioteca/.../Biblioteca/46_0653.pdf
- CERANA, M. M. 1997a. *Mikania*. En: A. L. Cabrera & S. Freire (org.). Asteraceae, tribu Eupatorieae. *Flora Fanerogámica Argentina* **47**: 54-76.
- CERANA, M. M. 1997b. El género *Mikania* (Asteraceae) en la República Argentina. Aspectos taxonómicos y morfológicos. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- CONSOLINI, A. 2009. Farmacología de plantas medicinales y fitoterapia. Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Exactas. UNLP
- CORRÊA, M. P. 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.
- GRAGG, G. M., M. R. BOYD, R. KHANNA, R. KNELLER, T. D. MAYS, K. D. MAZAN, D. J. NEWMAN & E. A. SAUSVILLE. 1999. International collaboration in drug Discovery and development: the NCI experience. *Pure and Applied Chemistry* **71**:1619-1633.
- CUENCA, M. D. R., A. BARDON & C. A. N. CATALAN. 1988. Sesquiterpene lactones from *Mikania micrantha*. *Journal of Natural Products* **3**: 625-626.
- D'AMBROGIO DE ARGÜESO, A. 1986. *Manual de Técnicas en histología vegetal*. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.

- DIZZEO DE STRITMATTER, C. 1973. Nueva técnica de diafanización. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* **15**:126-129.
- DOMINGUEZ, X. A. 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Ed. Limusa S. A., México, D. F.
- ESPINDOLA JUNIOR, M. R., A. TORRES BOEGER, C. MACCARI JÚNIOR, B. REISSMANN & F. LESSA RICKLI. 2009. Variação na estrutura foliar de *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) sob diferentes condições de luminosidade. *Revista Brasileira de Botânica* **32** (4): 749-758.
- ELLISON, C. A., H. C. EVANS, D. H. DJEDDOUR & S. E. THOMAS. 2008. Biology and host range of the rust fungus *Puccinia spegazzinii*: A new classical biological control agent for the invasive, alien weed *Mikania micrantha* in Asia. *Biological Control* **45**:133–145.
- FACEY P. C., K. O. PASCOE, R. D. PORTER & A. D. JONES. 1999. Investigation of plants used in Jamaican folk medicine for antibacterial activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **51**: 1455-1460.
- FARMACOPEA ARGENTINA. 2003. Séptima Edición. Buenos Aires, Argentina.
- FARMACOPEA NACIONAL BRASILEIRA. 1996. 4ª Edición. Sao Paulo, Brasil.
- FARNSWORTH, N. & R. W. MORRIS. 1976. Higher plants-the sleeping giant of drug development. *American Journal of Pharmacy* **148**:46-52.

- FERRIANI, A. P., M. V. BORGES, K. C. ZUFFELLATO-RIBAS, A. A. CARPANEZZI & H. S. KOEHLER. 2007. Influência da época do ano e das diferentes formas de aplicação de ácido naftaleno acético (ANA) no enraizamento de *Mikania micrantha* Kunth. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu* **9**:102-107.
- FREIRE, S. E. & E. URTUBEY. 1999. Compuestas medicinales de la provincia biogeográfica pampeana. Claves para su determinación e iconografías. Parte II. Compuestas con capítulos isomorfos y papus piloso (Grupo 3). *Acta Farmacéutica Bonaerense* **18**:283-294.
- FREIRE, S. E., E. URTUBEY, G. SANCHO, N. D. BAYÓN, L. KATINAS, D. GUTIERREZ, D. A. GIULIANO, A. A. SÁENZ, L. IHARLEGUI, G. DELUCCHI. 2006. Inventario de la biodiversidad vegetal de la provincia de Misiones: Asteraceae. *Darwiniana* **44** (2):375-452.
- GATUSO, S., H. BUSILACCHI, C. SEVERIN & G. GIUBILEO. 2004. Domesticación de especies vegetales nativas utilizadas como medicamentos fitoterápicos. *Revista Agromensajes de la Universidad* **14**. UNR.
- GHAYUR M. N., A. H. GILANI, A. KHAN, E. C. AMOR, I. M. VILLASEÑOR & M. I. CHOUDHARY. 2006. Presence of calcium antagonist activity explains the use of *Syzygium samarangense* in diarrhoea. *Phytotherapy Research* **20**: 49–52.
- HARBORNE, J. B., 1977. Flavonoid profiles in the Compositae. En: Heywood, Harborne & Turner (eds.), *The Biology and Chemistry of the Compositae* **1**: 359-84. London, Academic Press.

- HARDMAN, J. G., L. I. LIMBIRD & A. G. GILMAN. 2006. *Goodman & Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics* . Hardman Editorial McGraw-Hill.
- HERZ, W., 1977. *Sesquiterpene lactones in the Compositae*. En: Heywood, Harborne & Turner (eds.), *The Biology and Chemistry of the Compositae* **1**: 337-357. London, Academic Press.
- HERZ, W., P. S. SUBRAMANIAM, R. MURARI, B. N. DENNIS & J. F. BLOUNTLC. 1977. Micordilin, a Complex Elemanolide from *Mikania cordifolia*. *Journal of Organic Chemistry* **42** (10):1720-1725.
- HERZ, W., 1998. Terpenoid Chemistry of *Mikania* Species. *Journal of Indian Chemical Society* **75** :559-564.
- HICKEY, L. J. 1974. Clasificación de la arquitectura de las hojas de las Dicotiledóneas. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* **16**:1-26.
- HOLMES, W. C. 1975. Notes on *Mikania* (Compositae). *Phytologia* **31**: 273-278.
- HOLMES, W. C. 1996. A proposed sectional classification for *Mikania* (Eupatorieae). In: D.J.N. Hind (ed.). *Compositae: Systematics*. Royal Botanical Gardens, Kew.
- HOLMGREN, P. K., N. H. HOLMGREN & L. C. BARNETT. 1990. *Index Herbariorum*. The herbaria of the world. 8th edn. P 1: New York Botanical Gardens: Bronx, New York.
- HONGJUAN H., Y. WANHUI, W. XIAOYI & Z. CHAOXIAN ZHANG. 2009. Allelopathic potential of sesquiterpene lactones and phenolic constituents from *Mikania micrantha* H. B. K. *Biochemical Systematics and Ecology* **36**:867–871.

- JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. Mc Graw Hill Book Co. New York.
- KATINAS, L., D. GUTIERREZ, M. GROSSI & J. V. CRISCI. 2007. Panorama de la familia *Asteraceae* (=Compositae) en la Republica Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* **42**:113-129.
- KENAKIN, T. P. 1984. The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. *Pharmacological Reviews* **36**: 165–222.
- LAHITTE, H. B. & J. A. HURRELL. 1995. Las Plantas de la Medicina Popular de la Isla Martín García (Nativas y Naturalizadas). *Serie Informe N° 50, 1995-1996*.
- LAHITTE, H. B. & J. A. HURRELL. 2000. *Plantas trepadoras*. Biota Rioplatense V. Editorial Ed. L.O.L.A. (Literature of Latin America), Buenos Aires.
- LENTZ, D. L., A. M. CLARK, C. D. HUFFORD, B. MEURER-GRIMES, C. M. PASSREITER, J. CORDERO, O. IBRAHIMI & A. L. OKUNADE. 1998. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **63**: 253–263.
- LIVINGSTONE, E. & S. LIVINGSTONE. 1970. *Pharmacological experiments on isolated preparations*. Edited by the staff of the Department of Pharmacology, University of Edinburgh, Edinburgh, 2nd. Edition.
- LOBITZ, G. O., G. TAMAYO-CASTILLO & I. MERFORT. 1997. Diterpenes and sesquiterpenes from *Mikania banisteria*. *Phytochemistry*. **46**:161-164.
- LOPES, S. C. 1997. Efeitos do guaco (*Mikania glomerata*) na musculatura lisa respiratoria. En: XII Annual Meeting of FESBEE, Caxambú. Anais **282**.

- LOWE, S., M. BROWNE, S. BOUDJELAS & M. D. POORTER. 2001. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species: a Selection from the Global Invasive Species Database. IUCN-ISSG.
- MARINOFF, M. A., G. L. ZAGO, H. J. PZOCIK, C. CHIFA & M. C. GIMÉNEZ. 2005. Contribución al conocimiento de la actividad farmacológica de *Medicago sativa* L. (Fabaceae), "alfalfa". *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005*. Universidad Nacional del Nordeste.
- MARTINO, V. 2000. Los Flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos. *Acta Farmacéutica Bonaerense* **19** (4):303-308.
- METCALFE, C. R. & L. CHALK. 1950. *Anatomy of the Dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford, Vol. 1
- METCALFE, C. R. & L. CHALK. 1979. *Anatomy of the Dicotyledons*, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, Vol. 1.
- MILAN P., A. HISSAE HAYASHI & B. APPEZZATO-DA-GLÓRIA. 2006. Comparative Leaf Morphology and Anatomy of Three Asteraceae Species. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49** (1):135-144.
- MORS, W., C. TOLEDO RIZZINI & N. ALVARES PAREIRA. 2000. *Medicinal Plants of Brazil*. Reference Publications, Michigan, USA.
- MOSCHIONE, F. & J. F. KLIMAITIS. 1988. *Flora de Punta Lara*. Cartilla sistemática de los vegetales superiores de la Reserva de la Selva Marginal de Punta Lara y alrededores (provincia de Buenos Aires).

- MUELAS-SERRANO, S., J. J. NOGAL, R. A. MARTÍNEZ-DÍAZ, J. A. ESCARIO, A. R. MARTÍNEZ FERNÁNDEZ & A. GÓMEZ-BARRIO. 2000. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Ethnopharmacology* **71**:101–107.
- MUÑOZ JÁUREGUI, A. M., F. RAMOS-ESCUADERO, C. ALVARADO-ORTIZ & B. CASTAÑEDA. 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química de Perú* **73**:142-149.
- NEIRA GONZÁLEZ, A. M. 2009. Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante del extracto clorofórmico de la orquídea comestible *Prosthechea michuacana*. Tesis de Maestría (Instituto Politécnico Nacional, México).
- OLIVEIRA, F., M. A. ALVARENGA & M. K. AKISUE. 1984. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e de *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker. *Revista de Farmacia y Bioquímica, Universidad São Paulo* **20**:169-183.
- OLIVEIRA F., R. F. O. RODRIGUES, D. H. M. BASTOS & F. H. PEREIRA. 2000. Caracterização morfohistológica e verificação da atividade microbológica da espécie vegetal *Mikania cordifolia* (Lf) Willd. *Lecta* **18**: 33-63.
- PELUSO, G., V. DE FEO, F. DE SIMONE, E. BRESCIANO & M. L. VUOTTO. 1995. Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production. *Journal of Natural Products* **58**(5):639-46.

- PENG, L. Y., S. X. MEI, B. JIANG, H. ZHOU & H. D. SUNU. 2000. Constituents from *Lonicera japonica*. *Fitoterapia* **71**:713-715.
- PUI-HAY BUT, P., H. ZHEN-DAN, M. SHUANG-CHENG, CH. YIU-MAN, S. PANG-CHUI, Y. WEN-CAI & J. REN-WANG. 2009. Antiviral Constituents against Respiratory Viruses from *Mikania micrantha*. *Journal of Natural Products* **72** (5):925–928.
- RABIN, K. P., A. JABBAR & M. A. RASHID. 2000. Antiulceractivity of *Mikania cordata*. *Fitoterapia* **71**: 701-703.
- RAGONE, M. I., M. SELLA, P. CONFORTI, M. G. VOLONTE & A. E. CONSOLINI A. 2007. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum. *Journal of Ethnopharmacology* **113**:258–266.
- REJANE RITTER M. & J. L. WAECHTER. 2004. Biogeografía do gênero *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **18**(3):643-652.
- REJANE RITTER, M. & S. T. SFOGGIA MIOTTO. 2005. Taxonomía de *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Hoehnea* **32**:309-359.
- RONDINA, R.V.D., A. L. BANDONI & J. D. COUSSIO (eds.). 2003. *Plantas silvestres argentinas con reconocidas propiedades medicinales o tóxicas*. Base de Datos, CYTED-OEA.
- ROSELLA, M. A. 2008. *Estudio farmacognóstico de “pasto amargo”: Gentianella parviflora” (Griseb.) T. N. Ho (Gentianaceae)*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

- RUPPELT, B. M., E. F. R. PEREIRA, L. C. GONCALVES & N. A. PEREIRA. 1991. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom-1, analgesic and anti-inflammatory activities. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **86**:203-205.
- SALGADO, H. R. N., A. F. F. RONCARI & R. R.D. MOREIRA. 2005. Antidiarrhoeal effects of *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) leaf extract in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **15**(3): 205-208.
- SALISBURY, E. 1927. On the causes and ecological significance of stomatal frequency with special reference to the woodland flora. *Philosophical Transactions Royal Society of London, Ser B* **216**: 1-65.
- SEAMAN, F.C., 1982. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *Botanical Review* **48**:121-595.
- SHARAPIN, N. 2000. *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Ed. R. Pinzón CAB-CYTED. Bogotá, Colombia.
- SOARES, R., S. S. COSTA, J. M. JANSEN, C. A. SILVA, C. S. LOPES, M. BERNARDO-FILHO, V. N. SILVA, D. N. CRIDDLE, B. N. PORTELA, L. M. S. RUBENICH, R. G. ARAUJO & R. M. CARVALHO. 2002. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea pig trachea. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **54**:249-256.
- SORARÚ, S. & A. BANDONI. 1978. *Plantas de la medicina popular argentina*. Ed. Albatros, Buenos Aires.

- SÖRENSEN, N. A., 1977. Polyacetylenes and conservatism of chemical characters in the Compositae. En: Heywood, Harborne & Turner (eds.), *The Biology and Chemistry of the Compositae* **1**:385-409. London, Academic Press.
- UMA, B. H., M. POLATA, A. LOBSTEINA, B. WENIGERA, R. ARAGÓN, L. DECLERCQ & R. ANTONA. 2002. A new dicaffeoylquinic acid butyl ester from *Isertia pittieri*. *Fitoterapia* **73**:550–552.
- VITTO, L. A. DEL, E. M. PETENATTI. 2009. Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera Parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, Importancia ecológica y plantas de interés industrial. *Multequina* **18**:87-115.
- WAGNER, H. & S. BLADT. 1995. *Plant Drug Analysis*. 2nd Edition. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.
- WEBERLING, F., 1989. *Morphology of flowers and inflorescences*. Cambridge, Univ. Press. xx. 405 pp. il.
- WEI, Y., H. HUANG, P. WU, H. CAO & W. YE. 2004. Phenolic constituents from *Mikania micrantha*. *Biochemical Systematics and Ecology* **32** :1091–1096.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1998. Basic tests for drugs: pharmaceutical substances, medicinal plant materials and dosage forms, Geneva, Switzerland.
- ZARDINI, E. M. 1984. Etnobotánica de compuestas argentinas con especial referencia a su uso farmacológico. *Acta Farmacéutica Bonaerense* **3**: 77-99.

ZORNING H. & G. WEISS. 1925. Beiträge zur Anatomie des Laubblattes offizineller und pharmäzeutisch gebräuchlicher Compositen-Drogen. *Archiv für Pharmakologie. Berlin* **263**: 451-470.

ZULOAGA, F. O. & O. MORRONE (eds.), 1999. Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina, II. Dicotyledoneae. *Monograph in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 74: XXII, 1-1269.

ZULOAGA, F. O., O. MORRONE & D. RODRÍGUEZ, 1999. Análisis de la biodiversidad en plantas vasculares de la Argentina. *Kurtziana* **27**:17-167.

ZULOAGA F. O., O. MORRONE & M. J. BELGRANO (eds.). 2008. Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur. *Monograph in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. **2**: 1-2286. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, USA.