

## **Análisis de polifenoles e iniciación de cultivos *in vitro* de *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (Loranthaceae) de ejemplares provenientes de la localidad La Población, provincia de Córdoba, Argentina**

María V. Ricco<sup>1,2</sup>, Martín L. Bari<sup>2,3</sup>, Rafael A. Ricco<sup>4</sup>, Marcelo L. Wagner<sup>4</sup>, María A. Álvarez<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas.

<sup>2</sup> CEBBAD-Cátedra de Farmacobotánica y Farmacognosia, Carreras de Farmacia y Bioquímica, Universidad Maimónides, laboratorio 603, Hidalgo 775, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

<sup>3</sup> Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

<sup>4</sup> Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Farmacobotánica y Museo de Farmacobotánica "Juan Aníbal Domínguez", Junín 956, 4° piso, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. República Argentina

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

### **Resumen**

*Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (Loranthaceae) es una hemiparásita sudamericana que produce polifenoles con actividad hipolipemiante, citostática, inmunomoduladora, antioxidante y antimicrobiana. Nuestro objetivo fue determinar el perfil de polifenoles de ejemplares silvestres en distintos órganos y extractos, así como las condiciones más adecuadas para iniciar sus cultivos *in vitro*. Para el estudio fitoquímico se realizaron cromatografías en capa delgada de tipo monodimensional observándose la presencia de flavonoides, derivados hidroxicinámicos y proantocianidinas en los extractos de hojas, tallos primarios, tallos secundarios y flores. En cuanto al análisis cuantitativo se observaron altos valores de flavonoides en hojas (2,14 mg eq. de rutina por gramo de material seco) y de proantocianidinas en flores (7,52 mg eq. de catequina por gramo de material seco), compuestos responsables de las actividades biológicas mencionadas. Para la iniciación de cultivos *in vitro* se estudiaron diferentes aspectos: protocolo de desinfección, explanto de iniciación (hojas, pedicelos, frutos, tallos, meristemas y haustorios) y medios de cultivo base (reguladores de crecimiento y agentes antioxidantes). Los tratamientos más efectivos fueron HgCl<sub>2</sub> 0,05 - 0,2 % en una proporción de 25 explantos cada 100 ml de solución desinfectante y ácido cítrico 2,6 mM o L-cisteína 100 µM como antioxidantes. Solamente fue posible iniciar callos a partir de haustorios cultivados en medio Gamborg B<sub>5</sub> con el agregado de ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético 2,25 µM como regulador de crecimiento.

### **Analysis of Polyphenols and Initiation of *in vitro* Cultures of *Ligaria cuneifolia* (Loranthaceae) from La Población, Córdoba, Argentina**

#### **Abstract**

*Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (Loranthaceae) is a hemiparasitic plant from South America that produces polyphenolic compounds with hipolipemic, cytostatic, immunomodulator, antioxidant and antimicrobial activities. Our goal was to establish the polyphenolic profile from organs and extracts of wild plants and the

---

**Palabras clave:** muérdago - cultivo *in vitro* - polifenoles - *Ligaria cuneifolia* - plantas medicinales.

**Key words:** mistletoe - *in vitro* culture - polyphenols - *Ligaria cuneifolia* - medicinal plants.

culture conditions to initiate *in vitro* cultures. The phytochemical analysis was performed by monodimensional thin layer chromatography revealing the presence of flavonoids, hydroxycinnamic acids and proanthocyanidins in leaves, primary stems, secondary stems and flower extracts. The quantitative analysis established that the highest values of flavonoids were found in leaves (2.4 mg rutin eq. / gram of dried extract) and the highest amount of proanthocyanidins was found in flowers (7.2 mg catechin eq. / gram of dried extract). The biological activities of *L. cuneifolia* were attributed to those compounds. To initiate *in vitro* cultures different aspects were analyzed: disinfection protocol, type of explant (leaves, pedicels, fruits, stems, meristems, haustorium) and basal culture medium composition (plant growth regulators and antioxidant agents). The most effective treatments were HgCl<sub>2</sub> 0.05 - 0.2 % to a proportion of 25 explants per 100 ml of disinfectant solution, and citric acid 2.6 mM or L-cystein 100 μM as antioxidants. *In vitro* cultures were successfully initiated from haustorium cultured in Gamborg B<sub>5</sub> medium added by 2,4-dicloro-phenoxyacetic acid 2.25 μM as plant growth regulator.

## Introducción

*Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (Loranthaceae) es una especie vegetal hemiparásita semileñosa con una amplia distribución en Sudamérica (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Perú y Uruguay). En la República Argentina se puede encontrar en un área comprendida al Norte por la región de la puna en Salta y Jujuy, al Sur por La Pampa, al Noreste por Entre Ríos y el noroeste de Buenos Aires y al Oeste por la precordillera andina. Se la denomina vulgarmente “liga”, “liguilla” o “muérdago criollo” (Varela y col., 2000) refiriéndose su uso en medicina tradicional como hipotensor (Domínguez y col., 1928; Izquierdo y col., 1955; Taira y col., 1994). Diversos estudios farmacológicos informaron actividad antimicrobiana (Soberón y col., 2014), hipolipemiente (Ferrero y col., 2006; Dominighini y col., 2015), antioxidante (Dobrecky y col., 2014.), citostática e inmunomoduladora (Fernández y col., 1998 y 2003; Cerdá Zolezzi y col., 2005). Al igual que otras especies de la familia Loranthaceae, *L. cuneifolia* se caracteriza por la producción de altos niveles de polifenoles, especialmente flavonoides del grupo de los flavonoles, quienes podrían ser responsables de sus actividades farmacológicas (Dobrecky y col. 2017).

La producción de metabolitos vegetales en cultivos *in vitro* presenta algunas ventajas, como por ejemplo el desarrollo del cultivo en condiciones definidas, controladas y óptimas que permiten independizarse del cultivo en campo (pestes, condiciones climáticas) y la producción sistemática y regulada de biomoléculas con calidad estandarizada (metabolitos primarios y secundarios). Asimismo,

una vez establecidos dichos cultivos es posible realizar estudios acerca de los factores que afectan el crecimiento y los perfiles de producción de metabolitos, como es el caso de los reguladores de crecimiento, la fuentes de carbono y nitrógeno, la influencia de la luz y la temperatura, entre otras variables, y así optimizar el proceso productivo (Álvarez y col., 2009). Puede ocurrir que un proceso productivo desarrollado en cultivos vegetales *in vitro* requiera de una estrategia de desarrollo en dos etapas: la primera, de establecimiento y mantenimiento, se desarrolla en las condiciones óptimas para la inducción y el crecimiento de callos; y la segunda, de aumento de rendimiento y escalado, se lleva a cabo en condiciones que inducen la producción de la biomolécula de interés en altas concentraciones. Los cultivos, en este caso se desarrollan en medio líquido y es usual que se realice el escalado del proceso a biorreactores (Álvarez y col., 2009).

Por su condición de hemiparásita, el cultivo agronómico de *L. cuneifolia* presenta grandes dificultades. Por otra parte, la utilización de ejemplares silvestres para la producción de extractos activos acarrearía su rápida extinción. Por este motivo encaramos la iniciación de cultivos *in vitro* de *L. cuneifolia* para ser utilizados como plataforma productora de compuestos polifenólicos con actividad farmacológica. Además, los cultivos *in vitro* pueden aprovecharse para la micropropagación de la especie debido a que los programas genéticos de rediferenciación pueden ser inducidos con un balance hormonal adecuado.

Esto permitiría conservar el recurso biológico y a la vez disponer de una fuente renovable de material biológico para el proceso productivo sin amenazar el recurso natural.

El objetivo general de este trabajo fue determinar cualitativa y cuantitativamente el perfil de polifenoles (ácidos hidroxicinámicos, proantocianidinas y flavonoides), en distintos órganos (tallos primario y secundario, hoja y flor) y extractos de ejemplares silvestres de *L. cuneifolia* provenientes de Córdoba, así como establecer las condiciones más adecuadas para iniciar y mantener cultivos *in vitro* (explantos de partida, protocolo de desinfección, medio de cultivo, reguladores de crecimiento y agentes antioxidantes) de *L. cuneifolia*.

## Materiales y métodos

### Recolección y acondicionamiento del material vegetal

En la localidad de La Población, Provincia de Córdoba, Argentina (32,059551 S; 65,010162 O) se recolectaron ramas de ejemplares de *Acacia caven* (Mol.) Mol. (Fabaceae) conteniendo como huésped *L. cuneifolia* cuyos tallos, hojas, frutos y flores se separaron para los ensayos posteriores. Para el análisis de polifenoles parte del material se secó a temperatura ambiente y en oscuridad, mientras que para la iniciación de cultivos *in vitro* el restante material se mantuvo a 4 °C dentro de bolsas de plástico herméticas hasta su utilización.

Se realizó la identificación taxonómica del material vegetal mediante claves y se compararon con material de herbario. Un ejemplar fue depositado en el Museo de Farmacobotánica Juan Aníbal Domínguez (BAF 9018).

### Obtención de extractos

El material vegetal seco se redujo a polvo (molinillo IKA® A11 Basic Analytical Mill) procesándose por separado las hojas, tallos (primario y secundario) y flores. El extracto acuoso (5 % p/v) se obtuvo por el método de infusión (Farmacopea Argentina Ed. VI), forma empleada frecuentemente en la medicina tradicional. Por otra parte, los extractos etanólico (80 % v/v) y metanólico (100 %) se realizaron al 5 % p/v en baño de ultrasonido durante 30 minutos

a temperatura ambiente. Luego cada extracto se filtró y almacenó a 4 °C (metanólico y etanólico) y a -20 °C (acuoso) para los estudios fitoquímicos posteriores. Los diferentes métodos de extracción se corresponden con los mayormente empleados en los análisis de polifenoles (Waterman y Mole, 1994). La realización de un extracto empleando metanol 100 % responde a la necesidad de contar con un extracto libre de agua, necesario para la cuantificación de las proantocianidinas (Price y col., 1978).

### Análisis cualitativo de polifenoles

Se desarrollaron los perfiles cromatográficos sembrando 10 µl de cada extracto utilizando como fase estacionaria cromatofolios de Sílica Gel 60 (Merck) y como fase móvil acetato de etilo: ác. fórmico: ác. acético: agua (100:11:11:23). Se utilizaron los reveladores de productos naturales (NP: 2-Aminoethyl diphenyl borate, solución metanólica al 1 %) para polifenoles y el reactivo de vainillina / ácido clorhídrico para proantocianidinas (solución etanólica al 5 % de vainillina en ácido clorhídrico concentrado, 4:1).

### Análisis cuantitativo de polifenoles

La cuantificación de fenoles totales se realizó por el método de Folin Ciocalteu (Makkar y col., 1993), la de taninos condensados por el método de la vainillina (Price y col., 1978), la de ácidos hidroxicinámicos mediante una modificación del método de Dao y Friedman (Ricco y col., 2015) y la de flavonoides según el método de Woisky y Salatino (1998) y Chang y col. (Chang y col., 2002). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Se empleó un espectrofotómetro UV-visible con arreglo de diodos (HP 8452 A).

### Iniciación de cultivos *in vitro*

#### Ensayo de desinfección

En una primera etapa se ensayaron tres protocolos de desinfección utilizando explantos de hoja y distintos agentes desinfectantes: HgCl<sub>2</sub> (0,1 %), 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona + 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (Delcide CG, 0,1 %) y NaClO (4 % Cl<sub>2</sub> activo). Una vez establecido el agente más efectivo se procedió a optimizar el tiempo de desinfección, la concentración y relación entre agente desinfectante/cantidad de material vegetal según se indica en la Tabla 1.

**Tabla 1.-** Tratamientos para ensayo de desinfección con HgCl<sub>2</sub>. Modificado de Majid y col., 2014

Nº de tratamiento	Nº explantos de hoja/100 ml	Tiempo en EtOH 70 % (s)	HgCl <sub>2</sub> (% p/v)
1	25	30	0,05
2	25	30	0,1
3	25	30	0,2
4	25	60	0,05
5	25	60	0,1
6	25	60	0,2
7	50	30	0,05
8	50	30	0,1
9	50	30	0,2
10	50	60	0,05
11	50	60	0,1
12	50	60	0,2
13	75	30	0,05
14	75	30	0,1
15	75	30	0,2
16	75	60	0,05
17	75	60	0,1
18	75	60	0,2
19	25	-	-
20	50	-	-
21	75	-	-

Brevemente, el material se lavó con una solución acuosa de Tween 20 por 5 minutos, se sumergió en etanol 70 % durante 30 - 60 segundos y se trató con bicloruro de mercurio al 0,05 %, 0,1 %, o 0,2 % por 5 minutos utilizando 25, 50 y 75 explantos de hoja cada 100 ml de las soluciones mencionadas (Majid y col., 2014).

### Ensayo de inhibición del “browning”

Para inhibir los efectos perjudiciales sobre los cultivos de los exudados oscuros liberados al medio (Mustafa y col., 2013; Ndakidemi y col., 2014), se realizaron lavados previos con uno de los siguientes agentes antioxidantes: ácido cítrico (1,04; 1,56 y 2,60 mM), ácido ascórbico (1,70 y 2,80 mM), ácido cítrico: ácido ascórbico (2,6: 2,8 mM), L-cisteína (50 y 100 µM), nitrato de plata (10 y 50 µM); L-cisteína: nitrato de plata (100: 50 µM) y ácido cítrico: ácido ascórbico: L-cisteína: nitrato de plata (2,6 mM: 2,8 mM: 100 µM: 50 µM), durante distintos tiempos (5, 15, 30 y 120 min). Los explantos así tratados se sembraron en WM conteniendo el mismo trata-

miento antioxidante con el que se realizó el lavado y se mantuvieron en cámara acondicionada a 24 ± 2 °C. La mitad del material se cultivó en oscuridad y la otra mitad bajo un fotoperiodo de 16 h dado por lámparas de luz blanca (1,8  $\text{wm}^{-2} \text{seg}^{-1}$  de irradiancia: 150  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

### Ensayo de inducción de callos

Se partió de distintos órganos (hojas, pedicelos, meristemas apicales, nudos y frutos) los cuales fueron desinfectados previamente con el protocolo que resultó más efectivo en el “ensayo de desinfección”. Sin embargo, en el caso de los frutos se realizó una desinfección previa con una solución de HgCl<sub>2</sub> más concentrada (0,5 %), con el fin de disminuir la carga microbiana inicial previa a la desinfección de la semilla con el protocolo antes mencionado. En todos los casos se realizaron cuatro enjuagues finales con agua destilada estéril y se transfirieron los respectivos explantos a tubos de vidrio conteniendo 10 ml de uno de los siguientes medios de cultivo: White modificado con hidrolizado de caseína 500 mg/l y extracto de levadura 100 mg/l (WM), Gamborg (B5), Murashige and Skoog con vitaminas RT (MS-RT), MS-RT/2 y MS con agua de coco (Khanna y Staba, 1968; Murashige y Skoog, 1962) con uno de los siguientes reguladores de crecimiento o combinaciones de los mismos: ácido 2,4-diclorofenoxiacético [2,4-D] (2,25 µM; 4,5 µM y 10 µM); 2,4-D + kinetina [KIN] (2,25: 2,30 µM; 4,5: 2,3 µM; 10,0: 2,3 µM; 2,25: 2,30 µM; 4,50: 4,65 µM; 10,00: 4,65 µM); ácido indolacético [AIA] (2,25; 4,50 y 10,00 µM); ácido naftalenacético [ANA] + KIN (2,25: 2,30 µM; 4,5: 2,3 µM; 10,0: 2,3 µM) y bencilaminopurina [BAP] (0,2; 0,3 y 0,4 µM). En el caso de los frutos, se les extrajo el epicarpio y se sembró la semilla en medio de cultivo sin hormonas durante aproximadamente 15 días. Una vez transcurrido ese tiempo se cortaron explantos de haustorio los cuales fueron cultivados con los tratamientos hormonales indicados anteriormente.

## Resultados y Discusión

### Análisis cualitativo de polifenoles

En el análisis cualitativo por cromatografía en capa fina de los polifenoles se observaron compuestos amarillo-anaranjados correspondientes al grupo de

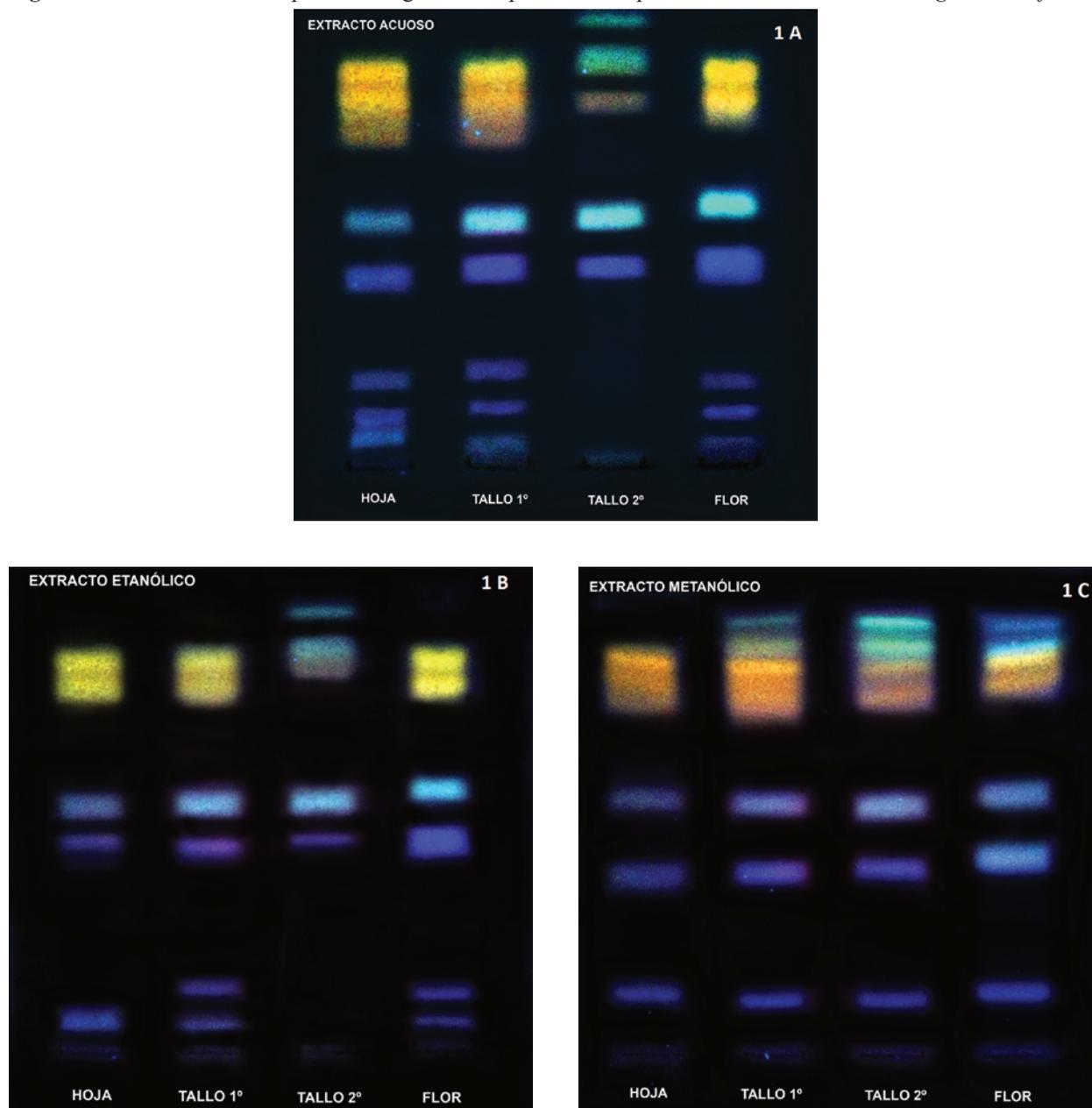
los flavonoides, así como bandas azul-verdosas las cuales indican la presencia de derivados de ácidos hidroxicinámicos, para todos los extractos y órganos analizados (Figura 1A, 1B, 1C).

Los cromatogramas muestran distintos perfiles, observándose la mayor diferencia respecto del proveniente del extracto metanólico, donde puede observarse un perfil de compuestos para el tallo secundario similar al determinado para los otros órganos. Este comportamiento no se ha observado para los extractos

acuoso y etanólico, donde los provenientes de tallo secundario presentan un perfil característico.

En lo que respecta a un análisis que abarque los resultados cuali-cuantitativos, en líneas generales y en las condiciones del ensayo aquí empleadas, los extractos acuosos presentaron una mayor cantidad de bandas, que se correlaciona con la determinación de los valores más altos de polifenoles para la mayoría de los órganos analizados si se compara con los demás extractos analizados.

**Figura 1.-** Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina de los polifenoles de los extractos de *Ligaria cuneifolia*



**1A:** Extracto acuoso; **1B:** extracto etanólico; **1C:** extracto metanólico-

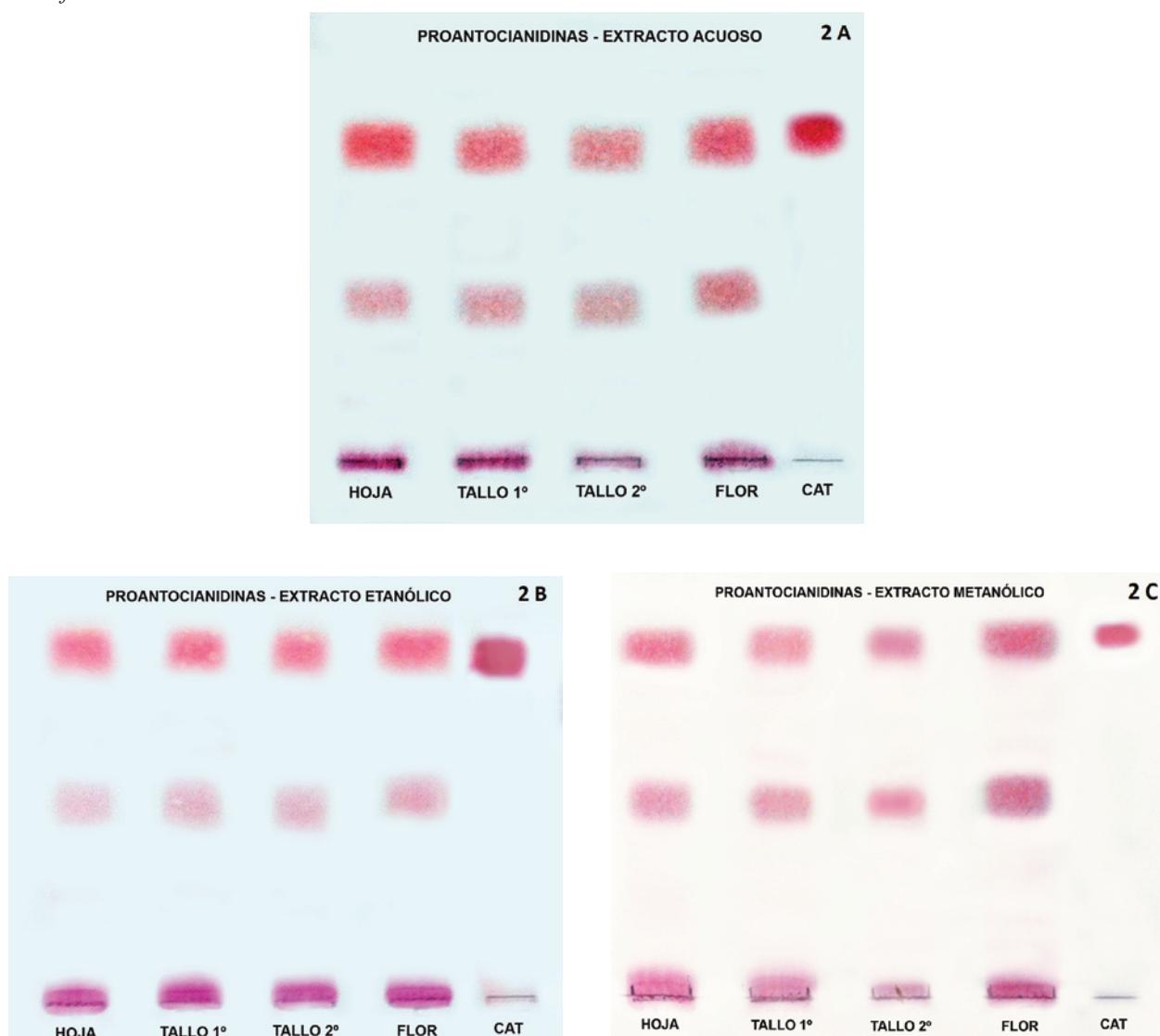
En el caso de la cromatografía realizada para la detección de proantocianidinas se observan bandas de una coloración rosada, correspondientes a compuestos de distinto peso molecular. Concretamente se detectó la presencia de (+) catequina en todos los órganos y extractos (Figura 2A, 2B, 2C).

Como se mencionara anteriormente, los resultados obtenidos en el análisis cualitativo de flavonoides muestran la presencia de compuestos dihidroxilados en el anillo B flavonoídico (probablemente derivados de quercetina), evidenciado por la reacción con el reactivo NP, obteniéndose una

coloración anaranjada. Estos resultados concuerdan con los presentados por Dobrecky y col. (2017) en los cuales detecta la presencia de distintos flavonoides (derivados de quercetina) para las poblaciones de Catamarca, San Juan, así como para una muestra comercial.

En cuanto al análisis de los taninos condensados, Dobrecky y col. (2017) detectan la presencia de catequina en las distintas muestras, resultado que coincide con la observación de las bandas de catequina obtenidas en los cromatogramas de los extractos provenientes de los ejemplares de Córdoba.

**Figura 2.-** Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina de proantocianidinas de los extractos de *Ligaria cuneifolia*



2A: extracto acuoso; 2B: extracto etanólico; 2C: extracto metanólico.

### Análisis cuantitativo de polifenoles

El órgano que presenta los mayores valores de fenoles totales es el tallo primario, seguido de la flor, luego de la hoja y por último es el tallo secundario el que menos fenoles contiene para todos los extractos ensayados (Tabla 2). En cuanto al análisis de flavonoides es la hoja la que presenta un mayor contenido en todos los extractos, mientras que el tallo secundario es el órgano que presenta menores valores de flavonoides en todos los casos (Tabla 2). Los niveles de ácidos hidroxicinámicos resultaron 50 % menores para el caso del tallo secundario en los extractos acuoso y metanólico en comparación con el resto de órganos (Tabla 2). El órgano que presenta mayor contenido de proantocianidinas es la flor, seguida de la hoja, el tallo secundario y, por último, del tallo primario (Tabla 2). La hoja y la flor no presentan diferencias significativas entre sí conteniendo un 50 % más de proantocianidinas que los tallos (que también presentan valores similares entre sí).

En el trabajo de Dobrecky y col. (2014) también se realiza un análisis cuantitativo de polifenoles de una población de *L. cuneifolia* de San Juan. Sin embargo, resulta difícil poder realizar un análisis comparativo de los resultados obtenidos en ambos estudios ya que existen variaciones en cuanto a los

métodos de obtención de los extractos (extracciones sucesivas con metanol 100, 80 y 50 % y particiones con acetato de etilo y butanol en su caso, y extractos metanólico 100 %, etanólico 80 % e infusión 5 % (p/v) en nuestro caso) y cuantificación de polifenoles, así como en la forma de expresar los resultados entre un trabajo y otro (en nuestro caso nos referimos a gramos de material vegetal seco y Dobrecky y col. (2014) a gramos de fracción).

Si bien los mayores valores de fenoles totales para todos los extractos analizados corresponden al tallo primario, resultan de gran interés los resultados de contenido de flavonoides y proantocianidinas en hojas y flores por las propiedades biológicas y farmacológicas atribuidas a estos compuestos.

### Iniciación de cultivos in vitro

#### Ensayo de desinfección

En la primera etapa las tasas de contaminación más bajas se obtuvieron utilizando  $\text{HgCl}_2$  (0,1 %). En la segunda etapa se observaron los porcentajes de contaminación descritos en la tabla 3.

#### Ensayo de inhibición del “browning”

No se observaron diferencias significativas entre aquellos tratamientos mantenidos en luz y en oscuridad. En el caso del ácido cítrico, cualquiera de las

**Tabla 2.-** Análisis cuantitativo de polifenoles en los extractos de *Ligaria cuneifolia*

Extracto	Órgano	Fenoles totales (mg eq. de ác. gálico/g mat. seco)	Flavonoides (mg eq. de rutina/g mat. seco)	Proantocianidinas (mg eq. de catequina/g mat. seco)	Ác. Hidroxicinámicos (mg eq. de ác. clorogénico/g mat. seco)
Acuoso	Hoja	59,61 ± 1,00	2,14 ± 0,13		2,86 ± 0,07
	Tallo 1°	80,22 ± 2,32	1,33 ± 0,06		2,86 ± 0,15
	Tallo 2°	50,16 ± 5,39	0,37 ± 0,02		1,47 ± 0,03
	Flor	73,73 ± 2,65	1,56 ± 0,04		2,9 ± 0,01
Etanol 80%	Hoja	56,35 ± 4,76	1,95 ± 0,02		3,34 ± 0,04
	Tallo 1°	75,69 ± 2,20	1,87 ± 0,03		3,84 ± 0,25
	Tallo 2°	67,75 ± 2,44	0,87 ± 0,05		3,07 ± 0,34
Metanol 100%	Flor	66,68 ± 2,18	1,21 ± 0,06		3,67 ± 0,04
	Hoja	47,71 ± 2,16	1,77 ± 0,08	6,5 ± 0,52	2,72 ± 0,10
	Tallo 1°	56,52 ± 2,79	1,55 ± 0,03	3,75 ± 0,58	2,79 ± 0,14
	Tallo 2°	48,11 ± 2,60	0,7 ± 0,01	4,68 ± 0,81	1,79 ± 0,04
	Flor	56,12 ± 5,54	0,96 ± 0,09	7,52 ± 0,66	2,76 ± 0,11

Cada resultado se expresa como la media ± desviación estándar.

**Tabla 3.-** Resultados de optimización del protocolo de desinfección con HgCl<sub>2</sub> expresados en % de explantos contaminados

Nº Trat.	Nº explantos hoja/100 ml sol.	Tiempo en EtOH 70% (s)	HgCl <sub>2</sub> (% p/v)	% explantos contaminados
1	25	30	0,05	40
2	25	30	0,1	20
3	25	30	0,2	20
4	25	60	0,05	30
5	25	60	0,1	70
6	25	60	0,2	30
7	50	30	0,05	30
8	50	30	0,1	90
9	50	30	0,2	90
10	50	60	0,05	40
11	50	60	0,1	70
12	50	60	0,2	40
13	75	30	0,05	80
14	75	30	0,1	40
15	75	30	0,2	70
16	75	60	0,05	80
17	75	60	0,1	40
18	75	60	0,2	30
19	25	-	-	100
20	50	-	-	100
21	75	-	-	100

tres concentraciones probadas podría ser utilizada como tratamiento preventivo para la liberación de exudados siendo suficiente un lavado durante 5 min (Tabla 4). El ácido ascórbico y la L-cisteína fueron más efectivos a las concentraciones de 2,8  $\mu$ M y 100  $\mu$ M respectivamente y el nitrato de plata a la menor concentración (50  $\mu$ M). Los tratamientos en los que se combinaron dos agentes antioxidantes - ácido cítrico: ácido ascórbico (2,6 mM: 2,8 mM) y L-cisteína: nitrato de plata (100  $\mu$ M: 50  $\mu$ M)- fueron efectivos a todos los tiempos probados, mientras que el tratamiento que contenía todos los compuestos en la máxima concentración no fue capaz de inhibir en su totalidad la liberación de dichos exudados (Tabla 4). El control del *browning* es importante pues como ya fue demostrado cuando los tejidos de

la planta se exponen a situaciones de estrés, como daños mecánicos (por ejemplo al separar el explanto de la planta madre), se estimula el metabolismo de los compuestos fenólicos desencadenándose una reacción de hipersensibilidad que origina una serie de procesos como por ejemplo, la liberación del contenido de las células rotas, reacciones particulares de las células vecinas sin mostrar signos de daño y/o muerte prematura de células que se encuentran alrededor de la herida. Los compuestos fenólicos son particularmente lábiles y por lo tanto fácilmente oxidados pudiendo resultar fitotóxicos o incluso conducir a un incremento de los procesos de oxidación por resultar ellos mismos, una vez oxidados, oxidantes muy fuertes (Debergh y Zimmerman, 1991).

**Tabla 4.-** Resultados obtenidos en el ensayo de tratamientos con antioxidantes

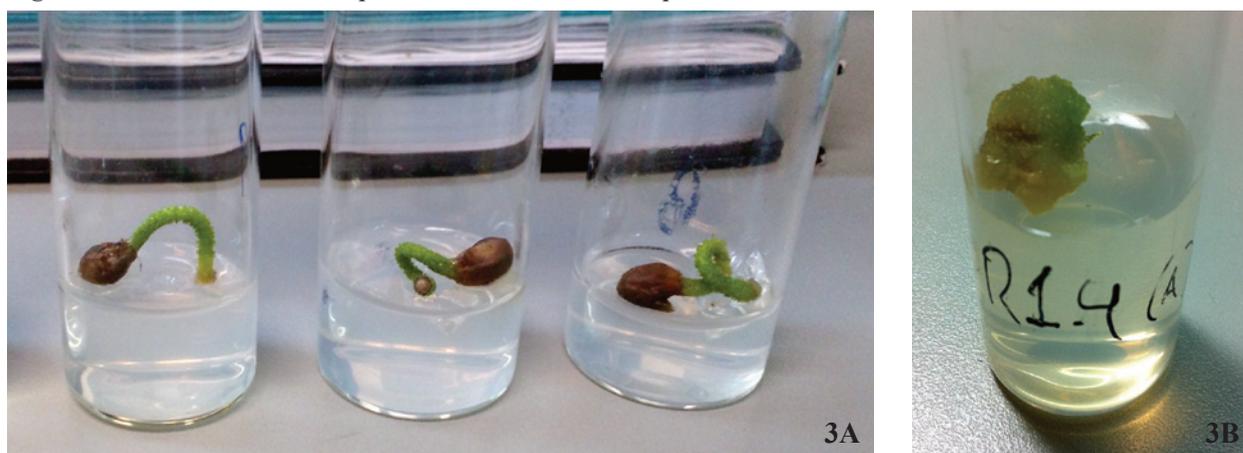
N°	TRATAMIENTO Agente Antioxidante	TIEMPO DE LAVADO (luz) (min)			TIEMPO DE LAVADO (osc) (min)		
		5	15	30	5	15	30
1	ácido cítrico 1,04 mM	-	-	-	-	-	-
2	ácido cítrico 1,56 mM	-	-	-	-	-	-
3	ácido cítrico 2,6 mM	-	-	-	-	-	-
4	ácido ascórbico 1,70 mM	+	+	+	+	+	+
5	ácido ascórbico 2,8 mM	+	-	-	-	-	-
6	ác.cít: ác.asc (2,6 mM:2,8 mM)	-	-	-	-	-	-
7	L-cys 50 µM	+	+	+	+	+	+
8	L-cys 100 µM	-	-	-	-	-	-
9	NO3Ag 10 µM	-	-	-	-	-	-
10	NO3Ag 50 µM	+	+	+	+	+	+
11	L-cys: NO3Ag (100 µM:50 µM)	-	-	-	-	-	-
12	todos (conc. máx.)	+	+	+	+	+	+

El signo “+” corresponde a la liberación de exudados al medio, mientras que el signo “-” indica la ausencia de exudado.

### Ensayo de inducción de callos

Solamente fue posible obtener callos cuando se utilizaron haustorios como explanto de iniciación (Figura 3). En el caso de las hojas, pedicelos y entrenudos los explantos murieron al poco tiempo, mientras que en los meristemas hubo aparición de zonas hiperhídricas que no prosperaron más allá de un mes en cultivo observándose una rápida oxidación y muerte. Los haustorios son estructuras que algunas especies (parásitas y hemiparásitas) utilizan para atravesar las

barreras que presenta el hospedante con el objetivo de alcanzar sus vasos conductores (en el caso de *L. cuneifolia*, xilema) y aprovechar así sus nutrientes. En este trabajo se utilizaron como explantos haustorios separados de los ejemplares recolectados y también haustorios que se desarrollaron al colocar las semillas en cultivo *in vitro* por lo que se trabajó con material joven con alta capacidad de dediferenciación y que no mostró, al ser colocado en cultivo,

**Figura 3.-** Inducción de callos a partir de haustorios como explanto**3A:** desarrollo del haustorio; **2B:** callo.

liberación de exudado al medio como lo hicieron los restantes explantos. Esto resultó ventajoso pues no presentaron las características de comportarse como recalcitrantes al cultivo *in vitro* o de producir exudados tóxicos en las condiciones ensayadas.

En cuanto al efecto de los reguladores de crecimiento solamente fue posible observar la aparición de tejidos hiperhidróticos en las zonas de las heridas, desdiferenciación celular y formación de callo cuando se utilizó el 2,4-D como regulador de crecimiento a una concentración de 2,25  $\mu\text{M}$  y B5 como medio base (Tabla 5). El 2,4-D es el prototipo de la auxina sintética ampliamente utilizada en cultivos *in vitro* de vegetales. En futuros ensayos se procederá a analizar la influencia de otros reguladores de crecimiento y otras condiciones de cultivo (fuente de carbono, de nitrógeno) con el fin de optimizar el rendimiento de biomasa y analizar el rendimiento de compuestos polifenólicos en los cultivos *in vitro*.

## Conclusiones

En base a los resultados obtenidos, las hojas y las flores de *L. cuneifolia* serían los órganos a considerar en la elaboración de especialidades medicinales para su futuro empleo farmacológico debido a su contenido en polifenoles.

Respecto al cultivo *in vitro*, este trabajo es el primero en informar el establecimiento exitoso del mismo en esta especie o especies relacionadas. Se optimizó el protocolo de desinfección, se determinaron los agentes antioxidantes de elección para inhibir la liberación de exudados fenólicos tóxicos al medio de cultivo y se logró iniciar cultivos indiferenciados a partir de haustorios en medio B5 con 2,4-D como regulador de crecimiento a una concentración de 2,25  $\mu\text{M}$ . En futuros ensayos se optimizarán las condiciones para obtener alto rendimiento de biomasa productiva de los compuestos polifenólicos de interés.

**Tabla 5.-** Resultados obtenidos en el ensayo de inducción de callos

Reguladores de crecimiento	Explantos				
	Hojas	Nudos	Meristemas	Pedicelos	Haustorios
2,4-D (2,25 $\mu\text{M}$ )	-	-	-		+
2,4-D (4,5 $\mu\text{M}$ )	-	-	-		
2,4-D (10 $\mu\text{M}$ )	-	-	-		
2,4-D+KIN (2,25 $\mu\text{M}$ +2,3 $\mu\text{M}$ )	-		-	-	
2,4-D+KIN (4,5 $\mu\text{M}$ +2,3 $\mu\text{M}$ )	-		-	-	
2,4-D+KIN (10 $\mu\text{M}$ +2,3 $\mu\text{M}$ )	-		-	-	
2,4-D+KIN (2,25+4,65 $\mu\text{M}$ )	-		-	-	
2,4-D+KIN (4,5 $\mu\text{M}$ +4,65 $\mu\text{M}$ )	-		-	-	
2,4-D+KIN (10 $\mu\text{M}$ +4,65 $\mu\text{M}$ )	-		-	-	
AIA (2,25 $\mu\text{M}$ )	-		-	-	
AIA (4,5 $\mu\text{M}$ )	-		-	-	
AIA (10 $\mu\text{M}$ )	-		-	-	
ANA+KIN (2,25 $\mu\text{M}$ +2,3 $\mu\text{M}$ )	-		-		
ANA+KIN (4,5 $\mu\text{M}$ +2,3 $\mu\text{M}$ )	-		-		
ANA+KIN (10 $\mu\text{M}$ +2,3 $\mu\text{M}$ )	-		-		
BAP (0,2 $\mu\text{M}$ )	-		-		
BAP (0,3 $\mu\text{M}$ )	-		-		
BAP (0,4 $\mu\text{M}$ )	-		-		

(-): tratamientos en los que no se observó formación de tejido calloso; (+): tratamientos en los que hubo formación de callos. Los tratamientos en los que no hay símbolos no fueron ensayados.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por ANPCyT (PICT 2015-2024), CONICET, Universidad de Buenos Aires (Proyecto 20020130100641BA) y CEBBAD (Universidad Maimónides).

Además queremos agradecer al Dr. Javier Calagno por la recolección de las muestras.

## Referencias bibliográficas

- Ahmad, I.; Hussain, T.; Ashraf, I.; Nafees, M.; Maryam, R.M.; Iqbal, M. (2013). "Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture". *American Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 13: 539–547.
- Álvarez, M.A.; Fernández Eraso, N.; Pitta-Alvarez, S.; Marconi, P.L. (2009). "Two-stage culture for producing berberine by cell suspension and shoot cultures of *Berberis buxifolia* Lam.". *Biotechnology Letters* 31: 457-463.
- Cerdá Zolezzi, P.; Fernández, T.; Aulicino, P.; Cavaliere, V.; Greczanik, S.; Caldas Lopes, E.; Wagner, M.; Ricco, R.; Gurni, A.; Hajos, S.; Álvarez, E. (2005). "*Ligaria cuneifolia* flavonoid fractions modulate cell growth of normal lymphocytes and tumor cells as well as multi-drug resistant cells". *Immunobiology* 209: 737-749.
- Chang, C.C.; Yang, M.H.; Wen, H.M.; Chern, J.C. (2002). "Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods". *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
- Debergh, P.; Zimmerman, R.H (eds.). (1991). *Micropropagation Technology and Application*. Springer. Netherland:1-469.
- Dobrecky, C.B.; Moreno, E.; Garcés, M.; Lucangioli, S.; Ricco, R.A.; Evelson, P.; Wagner, M.L. (2014). "Contenido de polifenoles en *Ligaria cuneifolia* y su relación con la capacidad antioxidante". *Dominguezia* 30 (2): 35-39.
- Dobrecky, C. B., Flor, S. A., López, P. G., Wagner, M. L., & Lucangioli, S. E. (2017). "Development of a novel dual CD-MEKC system for the systematic flavonoid fingerprinting of *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh.-Loranthaceae-extracts". *Electrophoresis* 38(9-10): 1292–1300.
- Domínguez, J.A. (1928). *Contribuciones a la Materia Médica Argentina*. Peuser. Buenos Aires: 84, 140-141.
- Dominighini, A.; Ferrero, M.; Crosetti, D.; Álvarez, M.L.; Ronco, M.T.; González, J.; Wagner, M.; Gurni, A.; Carnovale, C.; Luquita, A. (2015). "Effects of proanthocyanidin enriched extract from *Ligaria cuneifolia* on plasma cholesterol and hemorheological parameters. In vivo and In vitro studies." *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 44 (3): 217-225.
- FNA. Farmacopea Nacional Argentina. (1978). *Codex medicamentarius Argentino*. Sexta edición. Buenos Aires, Argentina: Codex S.A.
- Fernández, T; Wagner, M.L.; Varela, B.G.; Ricco, R.A.; Hajos, S.E.; Gurni, A.A.; Álvarez, E. (1998). "Study of an Argentine mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (Loranthaceae)". *Journal of Ethnopharmacology* 62: 25-34.
- Fernández, T.; Cerda Zolezzi, P.; Aulicino, P.; Caldas Lopes, E.; Wagner, M.; Ricco, R.; Hajos, S.E.; Gurni, A.; Alvarez, E. (2003). "Immunobiological features of the galactoside lectin L-Lc isolated from the Argentine mistletoe *Ligaria cuneifolia*". *Journal of Ethnopharmacology* 85: 81–92.
- Ferrero, M.; Crosetti, D.; Dominighini, A.; Álvarez, M.L.; Ronco, M.T; Wagner, M.L.; Gurni, A.; Carnovale, C.; Luquita, A. (2006). "Fracción metanólica de *Ligaria cuneifolia* "muérdago criollo": efecto sobre parámetros hemorreológicos y secreción biliar". *Dominguezia* 22 (1): 27-33.
- Izquierdo, J.A.; Starita, J.A. (1955). "Acciones vasculares de *Phrygilanthus flagellaris* y de *Psittacanthus cuneifolius*". *Revista Farmacéutica* 97: 177-181.
- Khanna, P.; Staba, E.J. (1968) "Antimicrobials from plant tissue culture". *Lloydia* 31: 347-359.
- Majid, B. N.; Roopa, G.; Sampath, K.; Kini, R.K.; Prakash, H.S.; Abbagani, S.; Mehdi, K.; Geetha, N. (2014). "Establishment of an efficient explant surface sterilization protocol for in vitro micropropagation of *Salacia chinensis* L. and endangered antidiabetic medicinal plant". *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3 (12): 1266–74.
- Makkar, H.P.S.; Bluemmel, M.; Borowy, N.K.; Becker, K. (1993). "Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical

- and protein precipitation methods”. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 61: 161-165.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant* 15: 473-479.
- Mustafa, N.S.; Taha, R.A.; Hassan, S.; Zaid, N.S.M.; Mustafa, E.A. (2013). “Overcoming phenolic accumulation of date palm *in vitro* culture using tocopherol and cold pre-treatment”. *Middle-East Journal of Scientific Research* 15: 344-350.
- Ndakidemi, C.; Mneney, E.; Ndakidemi, P. (2014). “Effects of ascorbic acid in controlling lethal browning in *in vitro* culture of *Brahylaena huilensis* using nodal segments”. *American Journal of Plant Sciences* 5 (1): 187-191.
- Price, M.L.; Van Scoyoc, S.; Butler, L.G. (1978). “A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannins in sorghum grains”. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 26: 1214-1218.
- Ricco, R.A.; Agudelo, I.J.; Wagner, M.L. (2015). “Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad”. *Lilloa* 52 (2): 161-174.
- Soberón, J.R.; Sgariglia, M.A.; Maderuelo, M.R.; Andina, M.L.; Sampietro, D.A.; Vattuone, M.A. (2014). “Antibacterial activities of *Ligaria cuneifolia* and *Jodina rhombifolia* leaf extracts against phytopathogenic and clinical bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 118 (5): 599-605.
- Taira, C.A.; Wagner, M.L.; Adrados, H.M.; Pino, R.; Gurni, A.A. (1994). “Pharmacological study of a vasoactive agent present in infusions from *Ligaria cuneifolia* var. *cuneifolia*. *Pharmaceutical Biology* 42 (3): 234-239.
- Varela, B.G.; Fernández, T.; Taira, C.; Cerdá Zolezzi, P.; Ricco, R.A.; Caldas López, E.; Álvarez, É.; Gurni, A.A.; Hajos, S.; Wagner, M.L. (2000). “El muérdago criollo, *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. -Loranthaceae-. Desde el uso popular hacia el estudio de los efectos farmacológicos”. *Dominguezia* 17 (1): 31-50.
- Waterman, P.G., Mole, S. (1994). *Analysis of polyphenolic plant metabolites*, Methods in Ecology, London, England: Blackwell Scientific Publications.
- Woisky, R.G.; Salatino, A. (1998). “Analysis of propolis: some parameters and procedures chemical quality control”. *Journal of Apicultural Research* 37: 99-105.