

Comparación de Componentes Micro y Macromoleculares del Muérdago Criollo (*Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh.) y del Muérdago Europeo (*Viscum album* L.)

Marcelo L. WAGNER^{1,3}, Teresa FERNANDEZ², Elida ALVAREZ^{2*},
Rafael A. RICCO¹, Silvia HAJOS^{2*} y Alberto A. GURNI^{1**}

¹Cátedra de Farmacobotánica. ²Cátedra de Inmunología-IDEHU.

³Museo de Farmacobotánica "Juan A. Domínguez".

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires,
Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN. El muérdago criollo (*Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh.) es utilizado en medicina popular como sustituto del muérdago europeo (*Viscum album* L.). A pesar de pertenecer a dos familias botánicas diferentes, ambas poseen estadios vegetativos similares. Son especies hemiparásitas semileñosas y se utilizan como hipotensoras. En este estudio se analizan los componentes micro y macromoleculares presentes en los extractos acelulares de *L. cuneifolia* y *V. album*. El análisis de los componentes polifenólicos demuestra que cada especie tiene una ruta metabólica diferente: *L. cuneifolia* produce quercetina, leuco y proantocianidinas en tanto que *V. album* produce derivados metilados de la quercetina y no produce proantocianidinas. Cada extracto posee un patrón proteico característico y un diferente poder inmunogénico evidenciado por los métodos de Ouchterlony y Western-blot. Estos resultados pueden ser aplicados para el control de la sustitución del muérdago europeo por el muérdago criollo.

SUMMARY. "Micromolecular and Macromolecular Comparison of Argentine Mistletoe (*Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh.) and European Mistletoe (*Viscum album* L.)". Argentine mistletoe (*Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh., Loranthaceae) is usually used in local folk medicine as the natural substitute of the European mistletoe (*Viscum album* L., Viscaceae). Despite the fact that both belong to different botanical families, they are similar at vegetative stage. Both are hemiparasitic species usually employed in folk medicine to prevent high blood pressure. In the present study the micromolecular and macromolecular components present in acelular extracts of *L. cuneifolia* and *V. album* are compared. The analysis of the poliphenolic components showed that each species has a differential metabolic pathway: *L. cuneifolia* produces quercetin (Qu) and its glycosides (Qu-3-O-xyloside, Qu-3-O-rhamnoside, foeniculin, avicularin), leuco (catechin, epicatechin and flavan-4- β -ol) and proantocyanidins (dimers, oligomers and polymers of flavan-4- β -ol) while *V. album* produces quercetin methyl derivatives, but no proanthocyanidins. Each extract has a characteristic protein pattern when analysed by SDS-PAGE and a differential immunogenic capacity evidenced by Ouchterlony's method and Western-blot. These results could be applied to improve the detection of substitution of the European mistletoe by the Argentine mistletoe *L. cuneifolia*.

PALABRAS CLAVE: Flavonoides, inmunoquímica, *Ligaria cuneifolia*, Medicina popular, Muérdago, *Viscum album*.

KEY WORDS: Flavonoids, Folk medicine, Inmunochimistry, *Ligaria cuneifolia*, mistletoe, *Viscum album*.

* Miembros de la Carrera del Investigador Científico del CONICET.

** Autor a quien dirigir la correspondencia.

INTRODUCCION

El "muérdago criollo" (*Ligaria cuneifolia* (R et P) Tiegh) y el "muérdago europeo" (*Viscum album* L.) son plantas hemiparásitas semileñosas que se desarrollan sobre otros árboles y arbustos.

La utilización de extractos del muérdago europeo en medicina popular está muy difundida en Europa central, Africa y Asia. Un gran número de investigaciones se han realizado en relación con las sustancias mediadoras de los efectos hipotensores ¹⁻³, antineoplásicos e inmunomoduladores que ella presenta ³⁻⁵. En tal aspecto, estudios realizados tanto de los componentes micromoleculares ³ como de los constituyentes macromoleculares permitieron establecer que la acción citotóxica del *V. album* sobre células tumorales es consecuencia de la acción de una glucoproteína, la lectina MLI, con un efecto inhibitorio sobre la síntesis ribosomal de proteínas en células eucarióticas ^{4,5}.

El muérdago criollo es utilizado en medicina popular argentina como hipotensor de manera similar al muérdago europeo ⁶⁻⁸. Las causas de este empleo radican en que ambas especies parecen semejantes al estado vegetativo.

Estudios previos en los que fueron analizadas las características anatómicas de ambas especies permitieron comprobar que existen diferencias entre ellas. Tales diferencias son evidenciables en las drogas en polvo y permiten determinar la existencia de mezclas o sustitución de la especie europea por la especie de nuestro país ⁹.

El objetivo de este trabajo es comparar ambas especies desde el análisis de los componentes micromoleculares polifenólicos y de los constituyentes macromoleculares proteicos con potencialidad antigénica, con el fin de determinar si el grado de disimilitud morfológica, por el cual cada una fuera ubicada en una familia botánica distinta, está acompañado también por un metabolismo diferente.

MATERIALES Y METODOS

L. cuneifolia fue colectada en el noroeste argentino (Jujuy) por uno de nosotros (AAG).

Los ejemplares fueron determinados según la clave de Abbiati ¹⁰ y comparados con material de herbario. El material vegetal se encuentra depositado en el herbario del Museo de Farmacobotánica "Juan A. Domínguez" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina.

El material vegetal de *V. album* procede de Hungría y fue provisto por un importador local.

ANÁLISIS MICROMOLECULAR DE *L. CUNEIFOLIA* L.

Extractos

Las plantas fueron desecadas al aire; se separaron las hojas de los tallos para ser procesados en forma independiente.

Los órganos señalados fueron pulverizados por medio de un molino de cuchillas rotativas. Se tomaron 5 g de cada muestra, y se realizaron extracciones con agua en ebullición durante 30 min. Estos extractos fueron llevados a sequedad a presión reducida y los residuos fueron redisueltos en metanol ^{9, 11}.

Análisis de Flavonoides y compuestos relacionados

Mapeo cromatográfico

Los extractos fueron analizados por cromatografía bidimensional en capa fina de celulosa (CCF) de acuerdo con el método de Mabry ¹², utilizando ter-butanol/ácido acético/H₂O (3:3:1, TBA) en la primera dimensión y ácido acético (HOAc) al 15% para la segunda dimensión.

Los cromatogramas fueron observados bajo luz UV (360 nm) antes y después de ser tratados con vapores de amoníaco. Luego se realizó una aspersion con una solución de triclóruo de aluminio (AlCl₃) al 5% en metanol y fueron nuevamente observados bajo luz UV ¹².

Aislamiento y caracterización de los flavonoles

Se realizaron cromatogramas preparativos en papel Whatman N° 3 MM unidireccionales y descendentes. Cada extracto se sembró en banda fina y se utilizó como fase móvil HOAc al 15%.

Cada banda obtenida fue eluída con metanol y recromatografiada en las mismas condiciones en n-butanol/HOAc/ H₂O (4:1:5, fase superior, BAA).

Los compuestos purificados fueron eluídos con metanol y analizados por procedimientos estándar ^{8, 11-14}: a) cocromatografía en capa fina de celulosa con testigos para determinar los valores de R_f en distintos solventes (BAA; HOAc al 15%, H₂O), b) espectrofotometría U.V.-visible, c) hidrólisis con ácido clorhídrico 2N, d) cocromatografía en capa fina de celulosa con testigos para determinación de los valores de R_f de los aglicones en distintos solventes: BAA, cloformo-ácido acético-agua (2:1: agua hasta saturación, CAA), ácido clorhídrico-ácido acético-agua (3:30:10; Forestal), TBA y HOAc 60%), e) cocromatografía capa fina de los azúcares frente a testigos, utilizando como solvente isopropanol-agua (4:1, IPrA) y como reactivo revelador anilina-difenilamina-acetona-ácido fosfórico (4ml:4g:200ml: 30ml).

Análisis de Leuco y Proantocianidinas

Los extractos metanólicos originales fueron analizados por cromatografía bidimensional en papel Whatman N° 1 (PC) y CCF usando sec-butanol/ HOAc/ H₂O (14:1:5) para la primera dimensión y HOAc al 6% para la segunda ^{15,16}. Los cromatogramas fueron tratados por aspersion con HCl 1% en metanol y colocados en estufa a 100 °C durante 15 min, después de los cuales catequina 4-β y las proantocianidinas originaron cianidina, la cual es roja a la luz de día ¹⁶.

Con réplicas de los cromatogramas se realizó una aspersion con el reactivo vainillina -HCl (solución etanólica al 5% P/V de vainillina - ácido clorhídrico concentrado, en una relación 4:1), se lo expuso a una corriente de aire caliente y se verificó la aparición inmediata de manchas rojas correspondientes a leuco y proantocianidinas. La caracterización de las sustancias fue realizada por procedimientos estándar ^{8,13,16,17}: a) tratamiento ácido de las sustancia con HCl 2N, b) CCF frente a testigos en diferentes sistemas de solventes: BAA, Forestal, HOAc 60%, ácido fórmico-ácido clorhídrico-H₂O (9:2:3), c) Espectroscopía UV-visible.

ANÁLISIS MACROMOLECULAR

Extractos

Material desecado de tallos y de hojas (10 g) fueron extraídos con 100 ml de solución de NaCl 0,15 M en buffer Tris 0,2 M de pH 7,5 (TBS) durante tres horas en presencia de fluoruro de fenil-metil sulfonilo (PMSF) 1 mM, EDTA 5 mM, Na₂S₂O₅ 10 mM y polivinil pirrolidona (PVP) 2% (Sigma). Los extractos acelulares fueron centrifugados a 12.000 xg a 4 °C durante 30 min en una centrifuga RC5C Sorvall Instruments y mantenidos a -20 °C hasta su uso.

Cuando fue necesario los extractos fueron liofilizados utilizando un sistema ELIOVAC y mantenidos a -20 °C hasta su utilización.

Determinación de la concentración proteica

La determinación de la concentración proteica fue realizada por el método de Bradford ¹⁸, utilizando como estándar seroalbúmina bovina.

Antisueros

Antisueros contra los extractos acelulares de *L. cuneifolia* y *V. album* fueron producidos en ratones Swiss de 2- 3 meses de edad. Los animales fueron inoculados tres veces durante 2 meses por vía subcutánea con 100 µl de los extractos emulsionados con igual volumen de adyuvante completo de Freund (100 µg de proteína/ratón). Una semana después de la última inoculación los animales fueron sangrados y el suero obtenido fue mantenido a -20 °C hasta su uso.

Inmunodifusión bidimensional

El ensayo de difusión bidimensional fue realizado de acuerdo con el método de Ouchterlony ¹⁹. Los pasos de inmunodifusión se llevaron a cabo a temperatura ambiente en cámara húmeda por 48 h. Los geles fueron secados y coloreados con 0.1% de Amido black en Metanol/HOAc/H₂O (35:10:55).

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de agentes disociantes (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) fue realizada de acuerdo con el método de Laemmli ²⁰, utilizando 4% de poliacrilamida para el gel de stacking y 10% para el gel resolutivo, en un sistema de buffers discontinuos (Tris/HCl 0,125 M de pH 6,8/8,6). Las muestras fueron preparadas por mezcla de los extractos liofilizados con buffer conteniendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 5% de 2-mercaptoetanol y 0,002% de azul de bromofenol en Tris HCl 0,125 M a pH 6.8). La separación electroforética fue realizada a 150 mA/gel durante 45 min utilizando un sistema Mini V8-10- BRL. Los geles fueron coloreados con plata ²². Como estándar de PM se utilizó la mezcla SDS-VII (Sigma).

Análisis por Western- blot

Las proteínas separadas electroforéticamente como ya se indicó fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.22 (Sigma) a 200 V y 150 mA 4 °C durante 2 h, utilizando el Sistema Miniblot BRL conforme con el método descrito por Towin ²¹ con ligeras modificaciones. Las membranas de nitrocelulosa que con-

tienen las proteínas transferidas fueron bloqueadas con una solución Tris-salina (TBS) de pH 7.4 con 3% de leche descremada y 2% de glicina, durante 1h a 37 °C. Luego fueron lavadas con TBS e incubadas durante 18 h a 4 °C con los antiseros murinos con actividad para los diferentes extractos vegetales. Suero murino normal fue utilizado como control. Luego, las membranas fueron lavadas e incubadas con anti-Ig G de ratón conjugadas con peroxidasa (BioSys, Israel) durante una hora a 37 °C. Las tiras fueron lavadas con TBS y la reacción enzimática fue revelada utilizando 4-Cl-1-naftol/ H₂O₂.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN MICROMOLECULAR DE *L. CUNEIFOLIA* Y *V. ALBUM*

Los resultados de la caracterización fitoquímica de flavonoides realizada sobre las muestras de hojas y tallos de *L. cuneifolia* indican la presencia de flavonoles no metilados: quercetina y glicósidos basados en quercetina: Quercetina-3-O-xilósido, Quercetina-3-O-ramnósido, Quercetina-3-O-β arabofuranósido (foeniculina) y Quercetina-3-O-α arabofuranósido (avicularina); leucoantocianinas (catequina, epicatequina y 4-β-flavanol) y proantocianidinas (dímeros, oligómeros y polímeros del 4-β-flavanol) ⁸. El 4-β-flavanol y las proantocianidinas originaron cianidina después del tratamiento con HCl 2N.

Los datos físico-químicos de los compuestos aislados se detallan a continuación:

Quercetina: Rf en Forestal 0.42, en BAA 0.73, en CAA 0.15, en TBA 0.57, en HOAc 60% 0.30. Propiedades espectrales: $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH: 256, 370; + NaOMe 248, 322 (desc.); + AlCl₃ 270, 334, 456 y + HCl 265, 360, 426; + NaOAc 274, 390 (desc.) y + H₃BO₃ 262, 388.

Quercetina-3-O-xilósido: Rf en BAA 0.65, en H₂O 0.10, en HOAc 15% 0.37. Propiedades espectrales: $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 258, 360; + NaOMe 272, 326, 410; + AlCl₃ 275, 422 y + HCl 268, 366s, 402; + NaOAc 270, 326s y 380 + H₃BO₃ 259, 370. Hidrólisis: quercetina y xilosa.

Quercetina-3-O-ramnósido: Rf en BAA 0.86, en H₂O 0.25, en HOAc 15% 0.48. Propiedades espectrales: $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 256, 349; + NaOMe 269, 327, 396; + AlCl₃ 274, 408 y + HCl 270, 352, 397; + NaOAc 270, 364 y + H₃BO₃ 259, 368. Hidrólisis: quercetina y ramnosa.

Quercetin-3-O-β-L-arabofuranósido: Rf en BAA 0.75, en H₂O 0.13, en HOAc 15% 0.26. Propiedades espectrales: $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 256, 357; + NaOMe 270, 330, 410; + AlCl₃ 273, 408 y + HCl 271, 363, 398; + NaOAc 272, 376 y + H₃BO₃ 259, 375. Hidrólisis: quercetina y arabinosa.

Quercetin-3-O-α-L-arabofuranósido: Rf en BAA 0.85, en H₂O 0.17, en HOAc 15% 0.30. Propiedades espectrales: $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 256, 357; + NaOMe 271, 324, 403; + AlCl₃ 272, 404 y + HCl 269, 353, 396; + NaOAc 270, 320s, 376 y + H₃BO₃ 260, 299, 367. Hidrólisis: quercetina y arabinosa.

Cianidina: Rf en BAA 0.65, en Fórmico 0.28, en Forestal 0.47, en HOAc 15% 0.60. Propiedades espectrales: $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH-HCl 536; + AlCl₃ 552.

$$E_{440} / E_{\text{máx}} \% = 19$$

De acuerdo con los datos bibliográficos ²³⁻²⁶ *V. album* presenta flavonoides no metilados: quercetina, flavonoides metilados basados en quercetina: Quercetina-3-metiléter, Quercetina-7-metiléter (ramnetina), Quercetina-3'-metiléter (isoramnetina), Quercetina-3,3'-dimetiléter, Quercetina-3,7-dimetiléter, Quercetina-7,3'-dimetiléter (ramnacina) y Quercetina-3,7,3'-trimetiléter (paquipodol), un dihidroflavonol: homoeriodictiol-7-O-glucósido y una chalcona: 2'-OH-4'-6'-di-O-metil-chalcona-4-O-glucósido, no habiéndose detectado leuco ni proantocianidinas. La Tabla 1 resume la comparación entre ambas especies, en tanto que la Figura 1 da cuenta de las correspondientes estructuras.

Especie	Compuesto					
	Que	Que-Me	DHF	Chal	LA	PA
<i>Ligaria cuneifolia</i>	+	-	-	-	+	+
<i>Viscum album</i>	+	+	+	+	-	-

Tabla 1. Comparación entre los flavonoides de *Ligaria cuneifolia* y *Viscum album*.

+: presencia. -: ausencia. Que: quercetina libre. Chal: chalcona. Que-Me: quercetina metoxilada. LA: leucoantocianidinas. DHF: dihidroflavonol. PA: proantocianidinas.

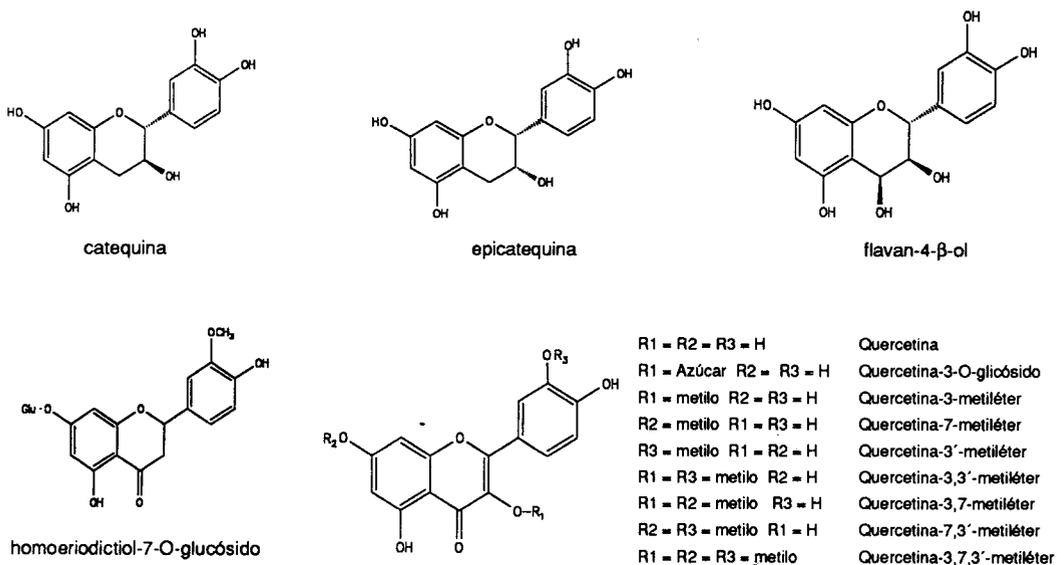


Figura 1. Fórmula de los compuestos.

CARACTERIZACIÓN MACROMOLECULAR DE *L. CUNEIFOLIA* Y *V. ALBUM*

El análisis de los constituyentes macromoleculares presentes en extractos acelulares de *L. cuneifolia* y de *V. album* por medio del método de Ouchterlony se muestra en la Figura 2. El reconocimiento de los componentes de ambas especies

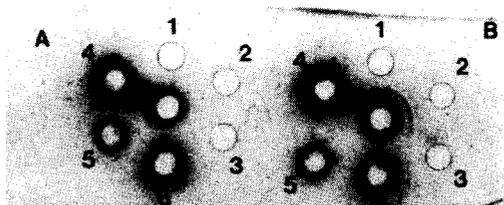


Figura 2. Análisis de la inmunogenicidad de los extractos de *L. cuneifolia* y de *V. album* por el método de Outcherlony. Diferentes concentraciones de *L. cuneifolia* (1-2-3) y de *V. album* (4-5-6) fueron incubadas con los antisueros anti-*Viscum* (A) y anti-*Ligaria* (B). Se pueden observar las bandas de no identidad y de identidad parcial cuando se utiliza el suero anti-*Ligaria*. El suero anti-*Viscum* reconoce sólo los componentes de *V. Album*.

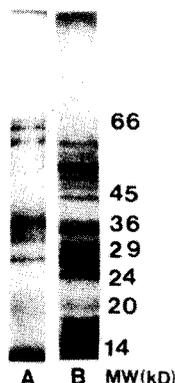


Figura 3. Perfiles de SDS-PAGE de *V. album* (A) y *L. cuneifolia* (B). Los números indican la posición de los patrones de peso molecular (MW).

cuando el ensayo es realizado frente a suero anti-*Ligaria* origina una banda de precipitación característica de antígenos que presentan reacción cruzada. En condiciones similares, el suero anti-*Viscum* solamente reacciona con los constituyentes del extracto de *V. album*.

Cuando se analizan los diferentes extractos mediante el método SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 3) cada extracto genera un perfil característico con la presencia de múltiples componentes de diferentes pesos moleculares comprendidos entre 14kD y 90kD.

El análisis por Western-blot permite verificar que ambos extractos poseen capacidad inmunogénica propia. Cada uno genera un antisuero que es capaz de reconocer el extracto inductor. Además, puede observarse que el suero anti-*Ligaria* reacciona con constituyentes presentes en el extracto de *V. album* (Figura 4), poniendo de manifiesto la existencia de estructuras proteicas relacionadas.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Si bien en *L. cuneifolia* y en *V. album* se detectó quercetina libre, la presencia de los demás compuestos revela que ambas especies poseen vías metabólicas diferentes.

En *L. cuneifolia* la dihidroquercetina puede seguir dos caminos ^{8, 27, 28}. Uno de ellos es el de ser oxidado por la enzima flavonol sintasa y generar quercetina, parte de este compuesto se acumula pero gran parte sufre glicosidaciones en el OH del carbono 3 por las enzimas UDP-azúcar: flavonoide 3-O-glicosiltransferasa. Un camino alternativo es el de sufrir la reducción del grupo ceto por acción de la enzima 3-hidroflavanona-4-reductasa NADPH dependiente y originar leucocianidina. Este compuesto puede ser transformado en flavan-3-oles (+ catequina o -epicatequina) por la 3,4 -cis-dioles-reductasa. Ambos tipos de compuestos, la leucocianidina y los flavan-3-oles pueden ser condensados y originar dímeros, oligómeros y polímeros por la actividad de la(s) enzima(s) proantocianidina sintasa(s).

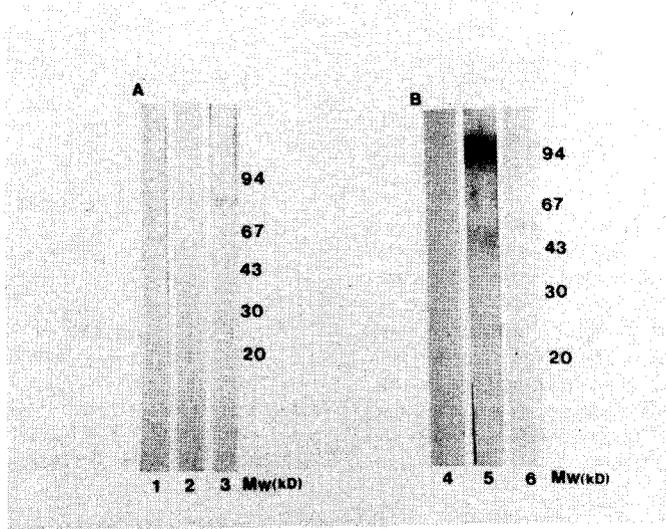


Figura 4. Western-blot de los extractos de *V. album* (B) y *L. cuneifolia* (A). 1 y 4 corresponden al suero de ratón normal, 2 y 5 corresponden al suero anti-*Viscum*, 3 y 6 corresponden al suero anti-*Ligaria*. Los números indican la posición de los patrones de peso molecular (MW).

En cambio el metabolismo de *V. album* es mucho más complejo debido a que presenta una diversificación en la biosíntesis de los flavonoides. Este proceso ocurre a nivel de la flavanona naringenina. Esta puede ser isomerizada a través de la Chalcona isomerasa y posteriormente metilada por acción de las S-adenosil-L-metionina-X-O-metilasa (SAM) para generar la 4',6'-dimetoxichalcona, o ser hidroxilada por la Citocromo P450 monooxigenasa pasando a eriodictiol y por isomerización a homoeriodictiol y acumularse en forma glicosidada. El eriodictiol además puede ser hidroxilado por la Flavanona-3-hidroxilasa a dihidroquercetina y luego, al igual que en *L. cuneifolia*, se transforma en quercetina. Este último compuesto sufre metilaciones por las diferentes SAM y origina así los derivados metilados.

Debido a que la quercetina es la única substancia que presentan en común ambas especies y ser ésta el flavonol más distribuido en plantas superiores²⁶, su presencia no resulta suficiente como para establecer una relación filogenética alguna entre *L. cuneifolia* y *V. album*.

Cuando los constituyentes macromoleculares son separados por medio de métodos electroforéticos, se establece la presencia de componentes con diferentes propiedades antigénicas en cada especie.

Estos componentes poseen además un comportamiento inmunogénico diferente: en tanto que *V. album* induce una respuesta específica, *L. cuneifolia* genera anticuerpos capaces de reaccionar con componentes presentes en ambos extractos. Esto se traduce en una única reacción de cruce que fue detectada por los métodos de Ouchterlony y Western-blot.

De acuerdo con los resultados del análisis macromolecular, existen diferencias también en sus componentes proteicos.

La especie argentina, por tanto, no sólo presenta un patrón diferente de sus componentes micromoleculares respecto de la especie europea sino también de los componentes macromoleculares, que difieren de aquella tanto en su composición como en su capacidad antigénica.

Este estudio indica la necesidad de realizar más ensayos farmacológicos y de citotoxicidad para *L. cunetifolia*, puesto que no existe con *V. album* correlación alguna que permita presuponer cuál será el efecto que sus extractos puedan ejercer sobre el organismo.

Los resultados permiten además su aplicación en el desarrollo de métodos analíticos para un mejor control de la calidad de las preparaciones comerciales con el fin de verificar la sustitución de *V. album* con la especie hemiparásita argentina, *L. cunetifolia*.

Agradecimientos. Este estudio ha sido subsidiado en parte por CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) y Universidad de Buenos Aires (FA 093). Se agradece también al sr. Mauricio Ferres (Platario S.A.C.I.F.) por aportar el material de *V. album*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Youngken, H.W. (1951) "Tratado de Farmacognosia", Atlante Ed., México pág. 365
2. Paris, R.R. & H. Moyses (1981) "Précis de Matière Médicale", Masson ed., Paris, Tomo 2, págs. 108-10
3. Luther, P. & H. Becker (1987) "Die Mistel. Botanik, Lektine, Medizinische Anwendung", SpringerVerlag, Berlin, Heidelberg, New York págs. 1-188
4. Portalupi, E. (1987) "Il vischio nella terapia dei tumori: valutazione critica dell'impiego dell'Iscaador nella terapia anti tumorale", Istituto Hiscia ed., Svizzera, págs. 1-247
5. Gabius, S., S. Joshi, K. Kayser & H.J. Gabius (1992) *International Journal of Oncology*. 1: 705
6. Domínguez, J.A. (1928). "Contribuciones a la Materia Médica Argentina". Peuser ed., Buenos Aires. págs. 260-4
7. Ratera, E.L. & M.O. Ratera (1980) "Plantas de la flora Argentina empleadas en Medicina Popular", Hemisferio Sur ed., Buenos Aires, pág. 82
8. Wagner, M.L. (1993) "Estudios Fitoquímicos Comparativos de los Flavonoides de Loranthaceae de la Flora Argentina. Relación con el Muérdago Europeo". Tesis doctoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires
9. Varela B.G. & A.A. Gurni (1995) *Acta Farm. Bonaerense* 14: 21-9
10. Abbiatti, D. (1946) *Revista del Museo de La Plata (nueva serie, sección botánica)* 7: 1-110
11. Gurni, A.A. (1979) "Vergleichend phytochemische Untersuchungen an den Flavonoiden der Dilleniaceen". Tesis doctoral, University of Hamburg
12. Mabry, T.J., K.R. Markham & M.B. Thomas (1970) "The Systematic Identification of the Flavonoids", Springer-Verlag, Berlin, New York. págs. 1-175
13. Markham, K.R. (1982) "Techniques of Flavonoids Identification", Academic Press ed., New York. págs. 1-113
14. Waterman, P.G. & S. Mole (1994) "Analysis of Phenolic Plant Metabolites" Blackwell Scientific Publications, Oxford, págs. 1-238

15. Haslam, E. (1975) "Natural Proanthocyanidins" en "*The Flavonoids*" part I. (J.B. Harbone, T.J. Mabry and H. Mabry, ed.), Academic Press, New York, London, págs. 505-59
16. Gurni, A.A. & M.L. Wagner. (1982) *Phytochemistry* **21**: 2428
17. Porter, L.J. (1988) "Flavans and Proanthocyanidins" en "*The Flavonoids. Advances in Research since 1980*" (J.B. Harbone, ed.) Chapman and Hall, London and New York, págs. 21-63
18. Bradford, M. (1976) *Analytical Biochemistry* **72**: 248
19. Ouchterlony, O. (1964) "*Immunological Methods*" pág. 55
20. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**: 680
21. Towin, H., T. Staehlin & J. Gordon (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci.* **76**: 4350
22. Oakley, B.R., D.R. Kirsch & N.M. Morris (1980) *Anal. Biochem.* **105**: 361-3
23. Becker, H., J. Exner & G. Schilling (1978) *Z. Naturforsch.* **33c**: 771-3
24. Becker, H. & J. Exner (1980) *Z. Pflanzenphysiol.* **97**: 417-28
25. Bate-Smith, E.C. & C.R. Metcalfe (1957) *J. Linn. Soc. (Bot.)* **55**: 669-705
26. Wollenweber, E. & M. Jay (1988) "Flavones and Flavonols" en "*The Flavonoids: Advances in research since 1980*" (J.B. Harbone, ed.), Chapman and Hall, London, págs. 233-302
27. Stafford, H.A. (1990) "*Flavonoid Metabolism*" CRC Press. Inc., Boca Raton, Florida, págs. 1-298
28. Stafford, H.A. (1991) "*Plant Physiology*" **96**: 680-5