

# CONTROL DE CALIDAD POR ANÁLISIS MICROGRÁFICOS CUALI-CUANTITATIVOS DE *Ilex paraguariensis* ST. HIL. VAR. *paraguariensis*, *AQUIFOLIACEAE*, "YERBA MATE" Y SUS ADULTERANTES COGENÉRICOS ARGENTINOS

Étyle D. Spegazzini\*, María T. Castro\*, Stella M. Carpano\* y Marta T. Nájera\*

## Resumen

En el presente trabajo se analizan: *Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *paraguariensis* y sus adulterantes cogenéricos argentinos: *I. dumosa* Reissek var. *dumosa* Reissek, *I. dumosa* var. *guaranina* Loesener, *I. brevicuspis* Reissek, *I. theezans* Reissek and *I. argentina* Lillo, empleándose parámetros botánicos establecidos por OMS para el Control de calidad de drogas vegetales.

Se presenta un cuadro comparativo con los elementos histológicos de diagnóstico y parámetros de cada especie, para el control de calidad cuando la droga se halle entera, fragmentada o pulverizada.

## Abstract

A comparative study of *Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *paraguariensis* Loes., and their cogenetic argentinian adulterants: *I. dumosa* Reissek var. *dumosa* Reissek, *I. dumosa* var. *guaranina* Loes., *I. brevicuspis* Reissek, *I. theezans* Reissek and *I. argentina* Lillo.

Was studied the anatomy and quali-quantitative micrographic parameters (Proportional Magnitudes, Index) of these leaves in agreement to the establish norms by the WHO for the vegetables drugs.

The micrographic parameters table is presented and it will permit the quality control of the raw material, fragmentary or powdered.

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La presente investigación tuvo por finalidad establecer los caracteres histológicos de diagnóstico presentes en hoja de *Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *paraguariensis*, "yerba mate" (*Aquifoliaceae*) así como los de las especies que crecen en el país y constituyen sus adulterantes cogenéricos mas conspicuos: *Ilex argentina* Lillo, *Ilex brevicuspis* Reissek, *Ilex dumosa* Reissek var. *dumosa*, *Ilex dumosa* Reissek var. *guaranina* Loesener e *Ilex theezans* Reissek.

Se eligió el órgano foliar ya que constituye la materia prima que se emplea comercialmente, en mayor proporción, junto con peciolos y tallos.

Se aplicaron los Índices de Estomas y de Empalizada a fin de aportar

\*Laboratorio de Referencia de Análisis Micrográficos de Plantas Medicinales, Alimenticias y Tóxicas (LABRAM). Farmacobotánica, Dpto. de Ciencias Biológicas. Fac. Cs. Exactas. UNLP. Calle 47 y 115 (1900) La Plata. Argentina. E-mail: labram@biol.unlp.edu.ar

datos que permitirán la identificación de la droga cruda, fragmentada o pulverizada.

Dichos valores numéricos representan parámetros codificables, a efectos de establecer definitivamente el "status" taxonómico de las especies involucradas y facilitar su Control de Calidad.

## MATERIALES

El material estudiado estuvo constituido por ejemplares frescos provenientes de la Estación Experimental del INTA Cerro Azul (Misiones). Las muestras del material empleado quedan depositadas en el Herbario del Museo de Botánica y Farmacognosia "Carlos Spegazzini" de la Facultad de Ciencias Exactas de La Plata U.N.L.P. (LPE).

Las exsiccatas analizadas pertenecen a las siguientes instituciones:

Herbario CEFYBO, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (BACP).

Herbario "Juan A. Domínguez" Museo de Farmacobotánica, Facultad de Bioquímica y Farmacia, UBA (BAF).

Herbario División Plantas Vasculares, Museo de Ciencias Naturales de La Plata, U.N.L.P. (LP).

Herbario "Carlos Spegazzini" de la Facultad de Ciencias Exactas, U.N.L.P. (LPE).

Herbario Instituto de Botánica Darwinión (SI).

### *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*

ARGENTINA. Prov. Buenos Aires : A. M. Fuchs, (SI 16642, hojas a y b). Prov. Misiones: A. Burkart 28405 (SI); Zardini *et al.* 727 (LP); C. Spegazzini s/nº, 26/1/1907 (LP); S. Prat Kricum (LPE 938); Boelcke *et al.* 5421 (SI); J.C. Gamero *et* M. Toursarkissian 151 (SI); J. F. Molfino, (LPE 87, 93); A. L. Cabrera *et al.* 28906 (SI); V. Maruñak 194 (SI); G. C. Giberti *et* O. Ahumada 3 (SI); A. Schinini *et al.* 24281 (BACP); G. C. Giberti *et* Daviña 199 (BACP); J.F. Molfino (LPE 96, 97); M.I.H.S. de Birabén, 10/1969 (LP); Colector desconocido, 104 1/07 (LP); I.C. Vattuone *et* A. Bianchi, 6-3/ 1914 (BAF 191-201-202-205); León Denis nº 2,4,5,6, 7 (BAF); Gozulbo V. nº 1 (BAF); San Ignacio 17/ 1/1914,4,5,6,7,8, (BAF); S. Prat Kricum (LPE 970, 976).

URUGUAY. Corn Osten: nº 19689 (BAF); s/ colector nº 19690 (BAF).

PARAGUAY. T. Rojas nº 4020 (BAF); T. Rojas, 1916 (BAF).

BRASIL. G.C. Giberti *et al.* 328 (BACP); G.C. Giberti *et al.* 393, 394 (BACP); G. C. Giberti *et al.* 397 (BACP); G. C. Giberti *et al.* 405 (BACP); G. C. Giberti *et al.* 411 (BACP); G. C. Giberti *et al.* 419 (BACP); G. C. Giberti *et al.* 423 (BACP); S. Prat Kricum *et al.* 225 (BACP); A. Lehnem 2204 (SI).

### ***Ilex argentina***

ARGENTINA. Prov. Jujuy: Cabrera *et al.* 32020, 32046 (SI); A. L. Cabrera *et al.* H. A. Fabris 21130 (LP); sin colector, 11/1911 (LP). Prov. Misiones: S. Prat Kricum (LPE 971, 977). Prov. Salta: Lázaro Novara 3809 (LP). Prov. Tucumán: S. Venturi 9990 (LP); Descole *et al.* s/nº, ex-LIL 35169 (LP); S. Venturi 4623 (SI); G. C. Giberti s/nº (BACP 2828).

### ***Ilex brevicuspis***

ARGENTINA. Prov. Misiones: T. Rojas 4488 (LP); G.C. Giberti *et al.* S.D. Prat Kricum 355 (BACP).

BRASIL. F. C. Hoehne 28597 (LP); B. Rambo 29438 (SI); G.C. Giberti *et al.* 298, Kricum (LPE 973, 978); G.C. 304, 308 (BACP).

### ***Ilex dumosa* var. *dumosa***

ARGENTINA. Prov. Misiones: Prat Kricum (LPE 960, 972).

BRASIL. G.C. Giberti, S.D. *et al.* Prat Kricum, D. Da Croce *et al.* P. Floss 237, 238 (BACP).

### ***Ilex dumosa* var. *guaranina***

ARGENTINA. Prov. Corrientes: A. Schinini *et al.* 11165 (SI). Prov. Misiones: A. Schnander 10248 (SI); S. Prat Kricum (LPE, 979) (BAF) XI/1977.

PARAGUAY. E. Migone 10599 (SI); Pavetti *et al.* Rojas 10048 (SI).

### ***Ilex theezans***

ARGENTINA. Prov. Misiones: S. Prat Kricum (LPE 975, 976); S. Prat Kricum *et al.* 54 (BACP,SI).

BRASIL. G. C. Giberti, *et al.* 297, 302 (BACP); G.C. Giberti, *et al.* 310 (BACP); G. C. Giberti, *et al.* 427 (BACP).

## **MÉTODO**

Para las observaciones de la epidermis foliar con microscopio óptico (MO), se empleó material seco procediendo a su diafanización y eliminación de cutina mediante una técnica creada "ad hoc"<sup>1</sup>, mediante la cual pudieron visualizarse las células y obtenerse los valores numéricos proporcionales: Índices de Estomas<sup>2</sup> y Empalizada<sup>3</sup>.

Los cortes transversos de hojas se practicaron con micrótopo de Ranvier, a partir de material fresco fijado en 3:1 (alcohol absoluto: ácido acético glacial) o seco e hidratado en caliente. Una parte del mismo se diafanizó con NaOH al 10% y otra, se coloreó con safranina-fast green<sup>4,5</sup>. Los cortes se montaron en bálsamo sintético Biopur, pasando a formar parte de la colección de cada especie.

Los test microquímicos se practicaron "in situ" con los siguientes reactivos: floroglucina clorhídrica, ácido clorhídrico y azul de metileno; para evidenciar lignina, oxalato de calcio y mucilagos respectivamente.

Las observaciones se realizaron con un microscopio óptico Olympus CH y los diseños originales se realizaron con el mismo, equipado con tubo de dibujo Iroscope.

La simbología utilizada es la de Metcalfe *et* Chalk<sup>6</sup>.

## RESULTADOS

*Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *paraguariensis* Mem. Mus. Hist. Nat. 9: 351, 1822.

Sin. *Ilex paraguariensis* f. *latifolia* Chodat, *Ilex paraguariensis* f. *parvifolia* Chodat 7 n.v. "yerba mate", "árbol del mate", "Caa", "té del Paraguay", "yerba señorita", "palo de yerba mate", "caá-guazú".

Caracteres epidérmicos de hoja observados con MO:

- Cutícula gruesa y ornamentada.
- Epidermis adaxial con células de contornos rectos (Fig. 1, A).
- Epidermis abaxial con células de contornos levemente ondulados (Fig. 1, B).
- Tricomas tectores unicelulares en ambas epidermis.
- Estomas ciclocíticos en la epidermis abaxial (Fig. 1, B).
- Hidatodes abundantes en la epidermis abaxial (Fig. 1, C).

Caracteres anatómicos del corte transverso:

- Estructura dorsiventral o bifacial (Fig. 1, D).
- Cutícula muy gruesa y ornamentada.
- Epidermis adaxial uniestratificada, interrumpida por células donde se producen divisiones periclinales y en las cuales aparece un contenido mucilaginoso (Fig. 1, D).
- Mesófilo: parénquima en empalizada con células dispuestas en 3 capas. La altura de las mismas es igual en las dos primeras disminuyendo en la tercera hacia la zona interna del mesófilo (Fig. 1, D, E, F).

- Parénquima lagunoso braciforme (Fig. 1, F).
- Sustancias cristalinas: drusas de oxalato de calcio en las células del mesófilo (Fig. 1, D, E).
- Sistema vascular de la nervadura principal: presenta un haz anfibasal rodeado por una vaina completa de fibras esclerenquimáticas (Fig. 1, D).
- Epidermis abaxial uniestratificada con cutícula gruesa interrumpida por estomas e hidatodes.

Microscopía analítica cuantitativa

Índice de Estomas: 6.89 (10.13) 15.50.

Índice de Empalizada: 2.50 (3.00) 4.50

*Ilex argentina* Lillo Anales Soc. Cient. Argent. 72:171, 1911.

n.v. "árbol de la yerba", "palo de yerba", "naranjillo", "roble", "roble de Tucumán", "roblina".

Caracteres epidérmicos de hoja observados con MO:

- Cutícula ornamentada.
- Epidermis adaxial con células de contornos rectos, algunas presentan divisiones periclinales o anticlinales (Fig. 2, A).
- Epidermis abaxial con células de contornos ondulados, algunas con membranas engrosadas y lignificadas (Fig. 2, B).
- Tricomas tectores unicelulares en ambas epidermis.
- Estomas ciclocíticos o bicíclicos en la epidermis abaxial (Fig. 2, B).
- Hidatodes muy escasos en la epidermis abaxial.

Caracteres anatómicos del corte transverso de hoja:

- Estructura dorsiventral o bifacial (Fig. 2, C, D).
- Cutícula muy gruesa y ornamentada.
- Epidermis adaxial uniestratificada con algunas células de mayor altura que penetran en el parénquima en empalizada (Fig. 2, C, D).
- Mesófilo: células del parénquima en empalizada dispuestas en dos capas, una de mayor altura y la otra mas corta hacia el centro del mesófilo; parénquima lagunoso braciforme hacia la epidermis abaxial (Fig. 2, C, D).
- Sustancias cristalinas: drusas de oxalato de calcio, en el parénquima lagunoso (Fig. 2, C, D).

- Sistema vascular de la nervadura principal: constituido por un haz

colateral, con casquete de esclerénquima hacia la epidermis abaxial y colénquima hacia la epidermis adaxial. Vaina del haz completa, formada por células parenquimáticas (Fig. 2, C).

- Epidermis abaxial uniestratificada con cutícula gruesa, interrumpida por estomas y escasos hidatodes.

Microscopía analítica cuantitativa

Índice de Estomas: 6.60 (12.38) 20.00.

Índice de Empalizada: 6.00 (7.95) 11.50

***Ilex brevicupis*** Reissek in C. Martius, Fl. Bras. 11 (1) 56, 1861.

Sin: *Ilex caaguazuensis* Loesener<sup>8</sup>

nv.: "Cauna", "caona", "mico", "ornhela de mico", "cauna de monte", "siete sangrías".

Caracteres epidérmicos de hoja observados con MO:

- Cutícula ornamentada.
- Epidermis adaxial con células de contorno ondulado (Fig. 3, A).
- Epidermis abaxial con células de contornos rectos (Fig. 3, B).
- Tricomas tectores unicelulares en ambas epidermis.
- Estomas ciclocíticos en la epidermis abaxial (Fig. 3, B).

Caracteres anatómicos del corte transversal de hoja:

- Estructura dorsiventral o bifacial (Fig. 3, C, D).
- Cutícula gruesa y ornamentada.
- Epidermis adaxial uniestratificada (Fig. 3, C, D).
- Mesófilo: células del parénquima en empalizada dispuestas en dos capas, parénquima lagunoso braciforme hacia la epidermis abaxial (Fig. 3, C, D).
- Sistema vascular de la nervadura principal: haz colateral, casquete semicircular de esclerénquima hacia la epidermis abaxial (Fig. 3, C).
- Epidermis abaxial con cutícula gruesa uniestratificada con estomas.

Microscopía analítica cuantitativa

Índice de Estomas: 3.80(8.22)11.49.

Índice de Empalizada: 2.50(3.57) 4.75.

***Ilex dumosa*** Reissek In: Martius, Fl. Bras. 11 (1) 56, 1861.

Sin. *Ilex dumosa* var. *montevideensis* Loes.; *Ilex dumosa* var. *gomezii* Loes.<sup>8</sup>

n.v. "apere'a Ka'a", "Ka'a mini".

***Ilex dumosa*** Reissek var. ***dumosa***

Sin. *Ilex dumosa* Reissek var. *montevicensis* Loes.; *Ilex amara* (Vell. Conc.) Loes. var. *latifolia* Reissek f. *microphylla* Reissek ex Loes.; *Ilex dumosa* Reissek var. *mosenii* Loes.<sup>9</sup>

n.v. "caá-chirivi", "caúna dos capões", "congonha", "congonha miuda", "congonha miuda do brejo", "congonilla".

Caracteres epidérmicos de hojas observados con MO:

- Cutícula ornamentada.
- Epidermis adaxial con células de contornos ondulados (Fig. 4, A).
- Epidermis abaxial con células de contornos levemente ondulados (Fig. 4, B).
- Tricomas tectores unicelulares en ambas epidermis.
- Estomas de anomocíticos a ciclocíticos en epidermis abaxial (Fig. 4, B).
- Hidatodes escasos en epidermis abaxial.

Caracteres anatómicos del corte transverso:

- Estructura dorsiventral o bifacial (Fig. 4, C, D).
- Cutícula muy gruesa y ornamentada.
- Epidermis adaxial uniestratificada (Fig. 4, C, D).
- Mesófilo: células del parénquima en empalizada dispuestas en dos capas de igual altura, parénquima lagunoso braciforme hacia la epidermis abaxial (Fig. 4, C, D).
- Sustancias cristalinas: drusas de oxalato de calcio dispuestas en el parénquima lagunoso (Fig. 4, C, D).
- Sistema vascular de la nervadura principal haz colateral con un casquete de esclerénquima y vaina del haz completa de células parenquimáticas (Fig. 4, C).
- Epidermis abaxial con cutícula gruesa, estomas e hidatodes.

Microscopía analítica cuantitativa

Índice de Estomas: 7.36 (9.80)13.04.

Índice de Empalizada: 1.25(2.41)3.25

***Ilex dumosa*** Reissek var. ***guaranina*** Loes. Nova Acta Acad. Caes.

Leop. Carol. German. Nat. Cur., 78:198, 1901.

Sin. *Ilex dumosa* f. *angustifolia* Chodat<sup>9</sup>

n.v. "ka'a ygapo", "ka' a la niña", "guaranina", "yerba señorita", "caá-berá", "caáchiri", "cauna".

Caracteres epidérmicos de hojas observados con MO:

- Cutícula ornamentada.
- Epidermis adaxial con células de contornos ondulados (Fig. 5, A).
- Epidermis abaxial con células de bordes ondulados, algunas con membranas engrosadas lignificadas (Fig. 5, B).
- Tricomas tectores unicelulares en ambas epidermis.
- Estomas anomocíticos a cicloclíticos en la epidermis abaxial (Fig. 5, B).
- Hidatodes no muy abundantes en epidermis abaxial.

Caracteres anatómicos del corte transverso:

- Estructura dorsiventral o bifacial (Fig. 5, C, D).
- Cutícula gruesa y ornamentada.
- Epidermis adaxial uniestratificada (Fig. 5, C, D).
- Mesófilo: células del parénquima en empalizada dispuestas en tres capas, dos hileras de mayor altura y la tercera mas corta hacia el centro del mesófilo. Parénquima lagunoso braciciforme hacia la epidermis abaxial (Fig. 5, C, D).
- Sustancias cristalinas drusas de oxalato de calcio en la tercer capa de células de empalizada mas cortas (Fig. 5, C, D).
- Sistema vascular de la nervadura principal, haz colateral rodeado por una vaina completa esclerenquimática; hacia la epidermis abaxial un casquete de colénquima (Fig. 5, C).
- Epidermis abaxial, con cutícula engrosada, estomas e hidatodes.

Microscopía analítica cuantitativa

Índice de Estomas: 7.69(10.93)13.84

Índice de Empalizada: 1.25(2.31)4.00

*Ilex theezans* C. Martius ex Reissek *In* C. Martius, Fl. Bras, 11 (1): 51, 1861.

n.v. "acebo gigantesco", "caa-ná", "caá panami", "cauna", "cauna amargosa", "cauna de folhas largas", "chá-mate", "congonha", "palo de



aceite", "yerba colorada", "yerba", "hierba de aceite"<sup>10</sup>.

Caracteres epidérmicos de hoja observados con MO:

- Cutícula ornamentada.
- Epidermis adaxial con células de contornos rectos, algunas de mayor tamaño (Fig. 6, A).
- Epidermis abaxial con células de contornos levemente ondulados (Fig. 6, B).
- Tricomas tectores unicelulares en ambas epidermis.
- Estomas diacíticos a bicíclicos, en la epidermis abaxial (Fig. 6, B).
- Hidatodes escasos en la epidermis abaxial.

Caracteres anatómicos del corte transversal de hoja:

- Corte transversal de estructura dorsiventral o bifacial (Fig. 6, C, D).
- Cutícula gruesa y ornamentada.
- Epidermis adaxial pluriestratificada (Fig. 6, C, D).
- Mesófilo: células del parénquima en empalizada dispuestas en cuatro o cinco capas, parénquima lagunoso hacia la epidermis abaxial (Fig. 6, C, D).
- Sustancias cristalinas: drusas de oxalato de calcio en el parénquima lagunoso (Fig. 6, C, D).
- Sistema vascular de la nervadura principal: haz colateral con vaina incompleta de esclerénquima hacia la epidermis adaxial, presenta colénquima central (Fig. 6, C).
- Epidermis abaxial con cutícula gruesa uniestratificada interrumpida por estomas e hidatodes.

Microscopía analítica cuantitativa

Índice de Estomas: 6.49(11.26)14.79.

Índice de Empalizada: 1.75(4.12)8.75.

## DISCUSIÓN

De las observaciones de la exo y endomorfología foliar de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y las cinco especies cogenéricas se concuerda, en parte, con datos aportados por diferentes autores, discrepándose con algunos conceptos que pasaremos a puntualizar.

Respecto de los estomas, el género *Ilex* sp., puede presentar diferentes tipos: ciclocíticos en *Ilex paraguariensis*, *Ilex argentina*, *Ilex brevicuspis*,

*Ilex dumosa* var. *guaranina* e *Ilex dumosa* var. *dumosa*; bicíclicos en *Ilex argentina* e *Ilex theezans*. Mientras que, anomocíticos sólo se hallan en *Ilex dumosa* y sus variedades y diacíticos en *Ilex theezans*, concordando con lo expresado por Baas<sup>11</sup>. Por lo cual no participamos de lo dicho por Jackson *et* Snowdon<sup>12</sup> y Metcalfe *et* Chalk<sup>13</sup> y lo publicado en el British Herbal<sup>14</sup>; cuando indican que el tipo de estomas de *Ilex paraguariensis* es anomocítico, ya que se ha comprobado que es de tipo ciclocítico.

La existencia de hidatodes, verrugas corchosas o lenticelas foliares, no es considerada por la mayoría de los investigadores, en cambio podemos establecer que poseen valor diagnóstico y revisten importancia diagnóstica en el género *Ilex*. Se ha observado su presencia en la epidermis abaxial de las especies estudiadas excepto en *Ilex brevicuspis*. En *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* son abundantes; en *Ilex argentina*, *Ilex theezans* y en las dos variedades de *Ilex dumosa* aparecen en menor cantidad.

Según Coelho<sup>15</sup>, la existencia de lenticelas foliares podría ser un carácter diferencial entre variedades de *Ilex paraguariensis*, pero él sólo consideró *Ilex paraguariensis* var. *sincorensis* Loes. que no crece en Argentina, sin embargo, la presencia de las mismas en *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, estaría desvirtuando dicha aseveración.

Por otro lado para *Ilex argentina*, el citado autor, manifiesta ausencia de ellas, no obstante las hemos observado.

Respecto de los caracteres diferenciales entre las epidermis de las distintas especies y variedades se pueden puntualizar: la presencia de células lignificadas en la epidermis abaxial de *Ilex argentina* e *Ilex dumosa* var. *guaranina*, carácter de valor diagnóstico ya observado por Lendner<sup>16</sup>, Baas<sup>11</sup> y Barral, *et al.*<sup>17</sup>.

En relación a la forma de las células epidérmicas se diferencian en las distintas especies y variedades. Scala<sup>18</sup> llegó a definir las especies por dichas características.

La presencia de pelos epidérmicos en estos materiales fue adjudicada, por distintos autores (Oglobin<sup>19</sup>, Coelho<sup>15</sup>), a la acción del psilidio: *Gyropsylla spegazziniana* L. conocida como "ampolla" de la yerba mate y productor del "rulo de la yerba mate" (Fernández Díaz 20). Dicho concepto es erróneo dado que un tricoma se inicia a partir de una

célula epidérmica. Se trata de pelos epidérmicos unicelulares presentes en todas las especies y variedades de *Ilex* estudiadas los cuales se observan a nivel de la nervadura principal en ambas epidermis. Así también los cita Loesener en su diagnóstico original<sup>21</sup>.

Muchos autores niegan la presencia de los mismos<sup>22, 18</sup>; lo que debe adjudicarse al manipuleo y los distintos tratamientos que sufren las hojas de *Ilex*, en el proceso de elaboración de la "yerba mate", mientras que en el material fresco, recién herborizado se observan dichos tricomas.

En cuanto a los caracteres anatómicos observados con MO en todas las especies y variedades del género *Ilex* se advierte una estructura dorsiventral o bifacial, o sea constituida por parénquima en empalizada hacia la epidermis adaxial y un parénquima lagunoso braciforme hacia la epidermis abaxial. Cutículas gruesas y ornamentadas en ambas epidermis.

La epidermis adaxial en general es uniestratificada en las distintas especies excepto en *Ilex theezans* que aparece pluriestratificada o múltiple como lo expresa Coelho<sup>15</sup>. Para Baas<sup>11</sup> incluiría además, idioblastos mucilaginosos. De acuerdo con nuestros análisis, se coincide con ambos.

En *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, dicha capa se halla interrumpida por células mucilaginosas, indicado ya por Lendner<sup>16</sup>.

En *Ilex argentina* aparecen algunas células epidérmicas de mayor altura las que penetran en el parénquima en empalizada, según Giberti<sup>9</sup> serían idioblastos mucilaginosos y para Baas<sup>11</sup> se trataría de una epidermis múltiple, pero las observaciones realizadas demuestran la existencia de divisiones periclinales y la presencia de idioblastos mucilaginosos coincidiendo con lo que expresa Giberti. Por lo tanto se puede inferir que *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* posee epidermis uniestratificada presentando algunas células con contenido mucilaginoso.

Con respecto a la epidermis abaxial, debemos decir que en todas las especies de *Ilex* estudiadas aparece una gruesa cutícula, células estomáticas e hidatodos. En el caso de *Ilex brevicuspis*, no se observan estos últimos elementos histológicos.

En cuanto al número de capas del parénquima en empalizada es variable en *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* se observan dos capas celulares de igual tamaño y una tercera más corta hacia la zona interna en contacto con el parénquima lagunoso.

Según Brieger<sup>23</sup> presenta una capa de empalizada, en tanto Coelho<sup>15</sup> manifiesta que, eventualmente existe una cuarta capa de transición. *Ilex argentina* e *Ilex brevicuspis* poseen una a dos capas, *Ilex dumosa* var. *dumosa* dos, *Ilex dumosa* var. *guaranina* de dos a tres y en *Ilex theezans* de tres a cinco capas.

#### Idioblastos cristalíferos

La posición en el mesófilo de las drusas de oxalato de calcio es variable: en *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* se ubican en especial en la tercera capa, en *Ilex argentina* en el parénquima lagunoso, en *Ilex dumosa* var. *dumosa* dispuestas en el parénquima lagunoso, en *Ilex dumosa* var. *guaranina* en la tercer capa de empalizada y en *Ilex theezans* en el parénquima lagunoso mientras que en *Ilex brevicuspis* no se observan. Los autores ya citados describen las drusas, pero no definen su posición.

#### Sistema vascular de la nervadura principal

En *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* se observa un haz anfigasal rodeado de una vaina esclerenquimática.

En *Ilex argentina* el haz es colateral con casquete de esclerénquima hacia la epidermis abaxial y colénquima hacia la epidermis adaxial, la vaina del haz es completa y formada por células parenquimáticas.

En *Ilex brevicuspis* el haz es colateral, con casquete semicircular de esclerénquima hacia la epidermis abaxial.

En *Ilex dumosa* var. *dumosa* el haz es colateral con un casquete basal de esclerénquima y vaina del haz completa formada por células parenquimáticas.

En *Ilex dumosa* var. *guaranina*, el haz es colateral rodeado por una vaina completa de esclerénquima; hacia la epidermis abaxial, posee un casquete de células colénquimatosas.

En *Ilex theezans* el haz es colateral con un casquete semicircular de esclerénquima hacia la epidermis abaxial y hacia la epidermis adaxial en los extremos presentan sobre el xilema dos paquetes de floema y en el centro del haz aparecen un grupo de células colenquimatosas. La mayoría de los trabajos consultados sobre estos aspectos de la anatomía de *Ilex* no aportan datos sobre el tema.

La obtención de valores numéricos mediante la microscopía analítica cuantitativa permitió aportar magnitudes numéricas proporcionales las cuales son originales e inéditas.

## CONCLUSIONES

Tal como expresara Scala<sup>18</sup>: "El estudio histológico (micrográfico) de las "yerbas" es el primer e ineludible auxiliar para el reconocimiento seguro de sus falsificaciones y adulteraciones conocidas, probables o simplemente posibles.

El estudio histológico ha de ser solidario con el estudio químico, éste último para establecer el porcentaje oficial de cafeína puesto que una yerba micrográficamente pura y genuina pudiera haber sido despojada de su principio activo principal".

El presente trabajo aporta el desarrollo de un método original para la eliminación de cutina en órganos foliares sin el cual hubiera sido imposible la obtención de Valores Numéricos (Índices).

Los resultados de los análisis micrográficos son aplicables a la identificación y control de calidad de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y las especies cogenéricas: *Ilex argentina*, *Ilex brevicuspis*, *Ilex dumosa* var. *guaranina*, *Ilex dumosa* var. *dumosa* e *Ilex theezans*, ya que los mismos permiten:

- Observar las células de la epidermis adaxial con contornos rectos en *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, *Ilex argentina*, e *Ilex theezans*; con contornos ondulados en *Ilex brevicuspis*, *Ilex dumosa* var. *dumosa* e *Ilex dumosa* var. *guaranina*; y además la ausencia de estomas en todos los casos, en dicha epidermis.

- Establecer que en las células de la epidermis abaxial los contornos son rectos en *Ilex brevicuspis*; levemente ondulados en *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, *Ilex dumosa* var. *guaranina* e *Ilex theezans*; contornos ondulados en *Ilex argentina* e *Ilex dumosa* var. *dumosa*.

- Visualizar en la epidermis abaxial células lignificadas en *Ilex argentina* e *Ilex dumosa* var. *guaranina*.

- Establecer los tipos de estomas presentes en la epidermis abaxial en cada especie y variedades: ciclocíticos en las especies y variedades estudiadas exceptuando *Ilex theezans*; bicíclicos se puede hallar en *Ilex argentina* e *Ilex theezans*; anomocíticos en las dos variedades de *Ilex dumosa* y diacíticos en *Ilex theezans*.

- Determinar la presencia de pelos epidérmicos en todas las especies y variedades.

- Comprobar la existencia de hidatodes, verrugas corchosas o lenticelas foliares en la epidermis abaxial en las especies y variedades estudiadas excepto en *Ilex brevicuspis*.

Los cortes transversos de cada especie y variedad permitieron definir los siguientes caracteres:

- Epidermis uniestratificada en *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, *Ilex argentina*, *Ilex brevicuspis*, *Ilex dumosa* var. *guaranina* e *Ilex dumosa* var. *dumosa*.

- Epidermis pluriestratificada en *Ilex theezans*.

- Idioblastos mucilaginosos en *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, *Ilex argentina*, *Ilex dumosa* var. *guaranina* e *Ilex theezans*.

- Mesófilo con número variable de capas de células de empalizada: de una a dos en *Ilex argentina* e *Ilex brevicuspis*, dos en *Ilex dumosa* var. *dumosa*, dos a tres en *Ilex dumosa* var. *guaranina*, tres en *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* y de tres a cinco en *Ilex theezans*.

- Drusas se hallan en las especies y variedades estudiadas excepto en *Ilex brevicuspis*. En *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* las mismas se disponen especialmente en la tercer capa de empalizada además y en todo el mesófilo; en *Ilex argentina* en el parénquima lagunoso, en *Ilex dumosa* var. *guaranina* en la tercer capa celular del parénquima en empalizada, en *Ilex dumosa* var. *dumosa* e *Ilex theezans* en el parénquima lagunoso.

Se establecen como Índices de Estomas los siguientes valores promedios para cada una de las especies y variedades:

*Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*:  $\bar{X} = 10.13$

*Ilex argentina*:  $\bar{X} = 12.38$

*Ilex brevicuspis*:  $\bar{X} = 8.22$

*Ilex dumosa* var. *guaranina*:  $\bar{X} = 10.93$

*Ilex dumosa* var. *dumosa*:  $\bar{X} = 9.80$

*Ilex theezans*:  $\bar{X} = 11.26$

Como Índices de Empalizada los siguientes valores:

*Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*:  $\bar{X} = 3.00$

*Ilex argentina*:  $\bar{X} = 7.95$

*Ilex brevicuspis*:  $\bar{X} = 3.57$

*Ilex dumosa* var. *guaranina*:  $\bar{X} = 2.31$

*Ilex dumosa* var. *dumosa*:  $\bar{X} = 2.41$

*Ilex theezans*:  $\bar{X} = 4.12$

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, podemos manifestar que los caracteres exo y endomorfológicos acompañados de los valores numéricos: Índice de Estoma e Índice de Empalizada, representan un aporte original e inédito y constituyen una metodología segura, de fácil ejecución.

Por lo tanto se sugiere debieran incluirse en el Código Alimentario Argentino<sup>24</sup>, a fin de facilitar el control de calidad tanto cuando la droga se encuentra entera, fragmentada o pulverizada.

Los datos expuestos quedan representados en el Cuadro 1, que resume los caracteres estudiados, que identifican cada especie, los cuales permitirán definir genuinidad, adulteraciones o sustituciones por medio de una rápida observación.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Gustavo Giberti por haberme cedido el material vegetal de su colección, como por comunicarme sus conocimientos sobre el tema.

Al Ing. Sergio Prat Kricum de Inta Cerro Azul por permitirme disponer del material fresco.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. CARPANO, S.M.; E.D. SPEGAZZINI ET M.T. NÁJERA. 1994. Nueva técnica de eliminación de cutina en órganos foliares. *Rojasiana* 2 (1): 9-12.

2. SALISBURY, E.J. 1927. On the causes and ecological significance of stomatal frequency with special reference to the woodland flora. *Phil. Trans. Roy. Soc. London.* 216 B: 1-65.

3. ZORNIG, H. ET G. WEISS. 1925. Beiträge Zur. Anatomie des Laubblattes offizineller und pharmäzeutisch gebräuchlicher Compositen-Drogen. *Arch. Pharm., Berl.* 263: 451-470.

4. D'AMBROGIO, A. DE ARGÜESO 1986. Manual de técnicas en la histología vegetal Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires.

5. DIZEO, C. DE STRITTMATTER 1979. Modificación de una coloración safranina-fast green. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 18 (3-4): 121-122.

6. METCALFE, C. R. Y L. CHALK 1957. *Anatomy of the Dicotyledons*, Vol 1, Ed. Clarendon Press, Oxford.

7. GRONDONA, E.M. 1954. Historia de la yerba mate II. Sinonimia, cariología y distribución. Rev. Arg. Agron. 21 (1): 9-24.
8. GIBERTI, G.C. 1979. Las especies Argentinas del género *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*). Darwiniana 22: 217-240.
9. ——— 1989. Los parientes silvestres de la yerba mate y el problema de su adulteración. Dominguezia 7:1-22.
10. ——— 1990. *Ilex theezans*, especie confirmada para nuestra flora. Clave de las especies argentinas del género *Ilex* (*Aquifoliaceae*). Bol. Soc. Arg. Bot. 26 (3-4): 159-162.
11. BAAS, P. 1975. Vegetative anatomy and affinities of *Aquifoliaceae*, *Sphenostemon*, *Phelline* and *Oncotheca*. Blumea 22: 311-407.
12. JACKSON, B. ET D. SNOWDON 1968. Powdered Vegetable Drugs. Atlas of Microscopy. J. & A. Churchill Ltd. 104 Gloucester Place, London.
13. METCALFE, C. R. ET L. CHALK 1979. Anatomy of the Dicotyledons. 2a. ed. Vol. I- Vol. II Oxford University Press, New York.
14. BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA 1983 "*Ilex*". Publ. British Herbal Medicine Association, 255 pp.
15. COELHO, G.C. inédito. Anatomia foliar e morfologia de inflorescências das espécies riograndenses de *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*). Tesis Doctoral. UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 1995.
16. LENDNER, A. 1917. Contribución al estudio de las falsificaciones de la yerba mate. Inst. Bot. Farm. Fac. Cs. Med. Bs. As. 35: 1-54.
17. BARRAL, G.; POGGIO, L. ET G.C. GIBERTI 1995. Chromosome numbers and DNA content from *Ilex argentina* (*Aquifoliaceae*). Bol. Soc. Arg. Bot. 30 (3-4): 243-248.
18. SCALA, A.C. 1921. Contribución al conocimiento histológico de la yerba mate y sus falsificaciones. Rev. Museo La Plata 26: 69-165.
19. OGLOBLIN, A. 1939. Los pelos epidérmicos de la yerba mate. Physis 18: 461-465.
20. FERNÁNDEZ DÍAZ C. Y. 1997. Plagas de la Yerba mate. En: Tercer Curso de Capacitación en Producción de Yerba mate. Resúmenes. INTA, Cerro Azul, Misiones.
21. LOESENER, T. 1901. Monographia Aquifoliacerum I. Nova Acta Acad. Caes. Leop. Carol. German. Nat. Cur., 78: VIII + 600 pp.



22. COPPETTI, V. 1916. La "yerba mate". Algunas de sus más frecuentes falsificaciones. Su investigación micrográfica. Primer Congreso Nacional Montevideo.

23. BRIEGER, D. 1995. Charakterisierung der Blätter von *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire und möglicher Verfälschungen mit Hilfe botanischer und phytochemischer Methoden. J. Cramer in der Gebrüder Verlagsbuchhandlung. Berlin. Stuttgart.

24. CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO (C.A.A.) actualizado 1997. De la Canal y Asoc. S.R.L., Buenos Aires.

H	O	J	A	EPIDERMIS		Ilex paraguayensis var. paraguayensis	Ilex argentina	Ilex brevicuspis	Ilex dumosa var.		Ilex teezans
				ADAXIAL	ABAXIAL				guaranina	dumosa	
						uniestratificada	uniestratificada	uniestratificada	uniestratificada	uniestratificada	planiestratificada
					células mucilaginosas	+	+	-	+	-	+
					contorno celular	recto	recto	ondulado	ondulado	ondulado	recto
					contorno celular	levemente ondulado	ondulado	recto	levemente ondulado	ondulado	levemente ondulado
					células lignificadas	-	+	-	+	-	-
					tipo de estomas	ciclocíticos	ciclocíticos a bicíclicos	ciclocíticos	anomocíticos a ciclocíticos	anomocíticos a ciclocíticos	bicíclicos a diacíticos
					verrugas corchosas	+	+ -	-	+	+	+
					número de capas de empalizada	3	1 - 2	1-2	2 - 3	2	3 - 4 - 5
					drusas	+	+	-	+	+	+
					INDICE DE ESTOMAS	6.90 (10.13) 15.50	6.60 (12.8) 20.00	3.80 (8.22) 11.49	7.69 (10.93) 13.84	7.36 (9.80) 13.04	6.49 (11.26) 14.79
					INDICE DE EMPALIZADA	2.50 (3.00) 4.50	6.00 (7.95) 11.50	2.50 (3.57) 4.75	1.25 (2.31) 4.00	1.25 (2.41) 3.25	2.00 (4.12) 8.75

CUADRO 1. PARAMETROS MICROGRÁFICOS CUALI-CUANTITATIVOS

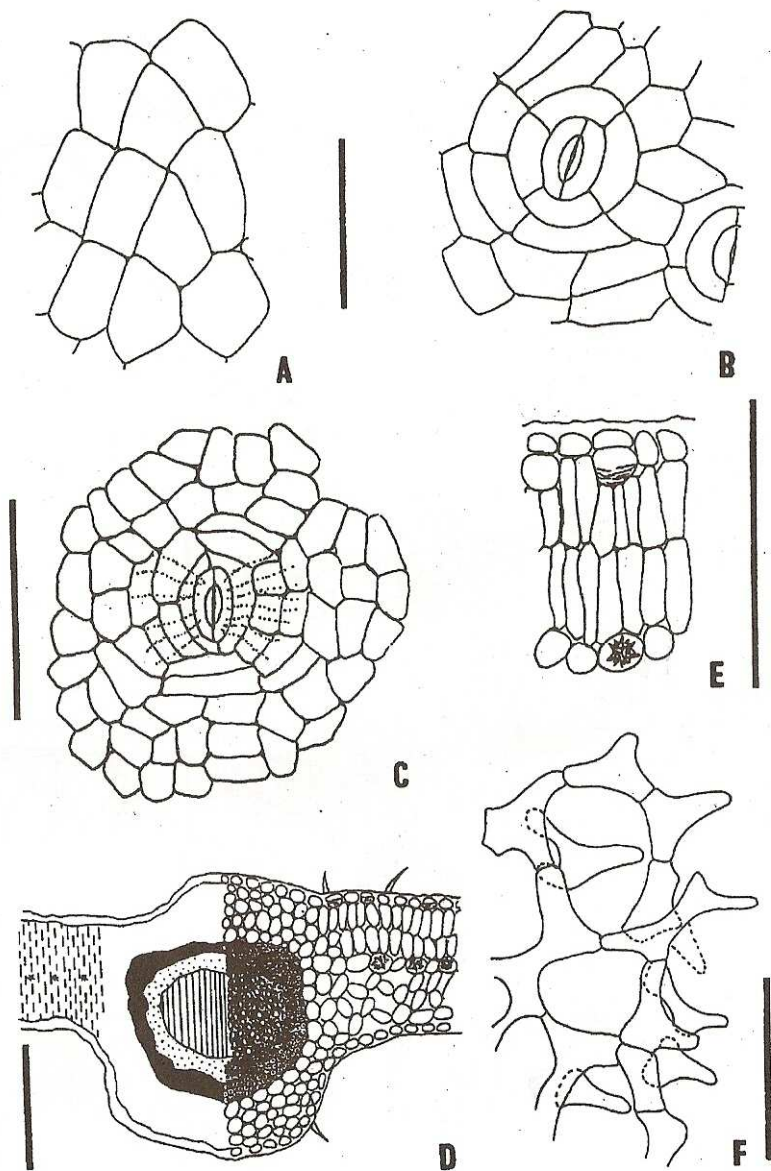


Fig.1 - *I. paraguariensis* var. *paraguariensis*. Hoja: Diseño de la epidermis: A- adaxial, B- abaxial, C- hidatode. Corte transverso: D- diseño de la nervadura principal, E, F- diseños de los parénquimas en empalizada y lagunoso respectivamente. Escala = 100  $\mu$ m.

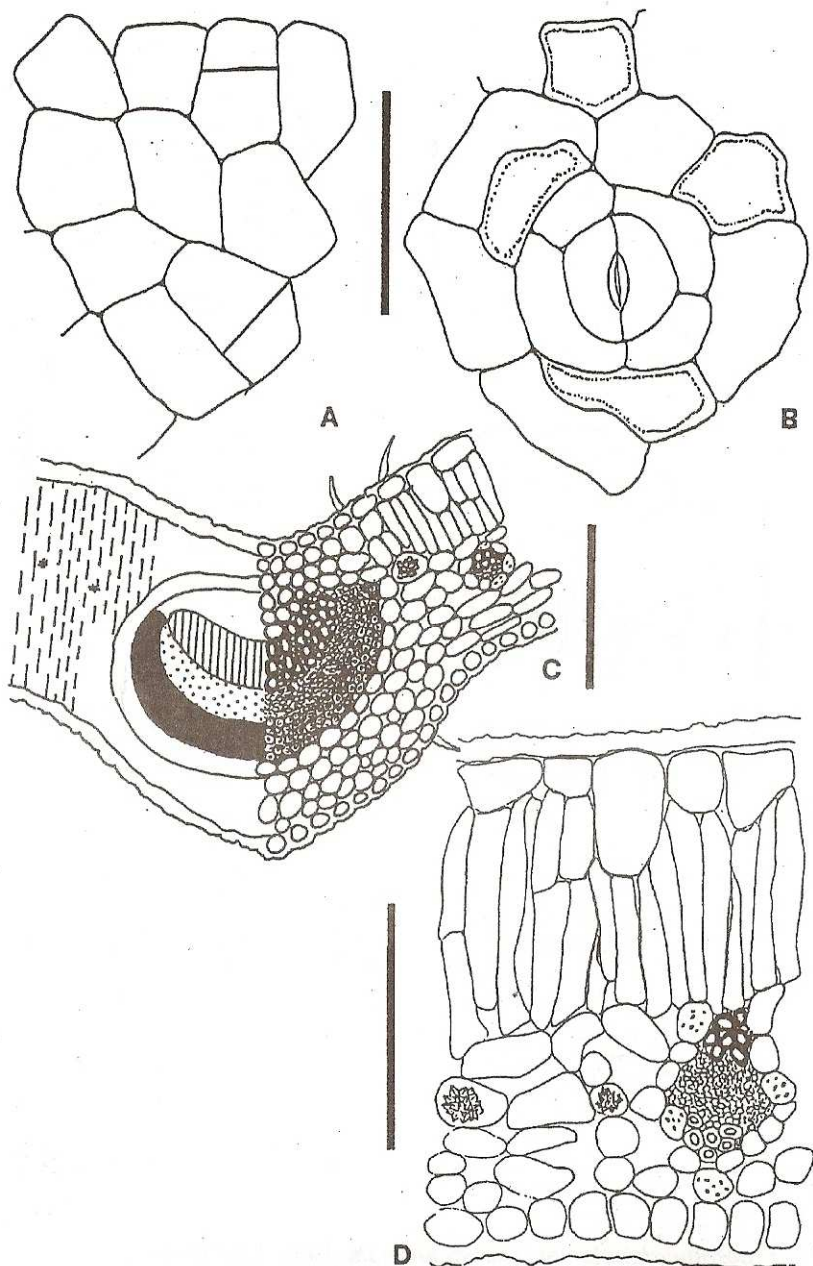


Fig. 2 - *I. argentina*. Hoja: Diseño de la epidermis: A- adaxial, B- abaxial. Corte transverso: C- diseño de la nervadura principal, D- detalle del mesófilo. Escala = 100  $\mu$ m.

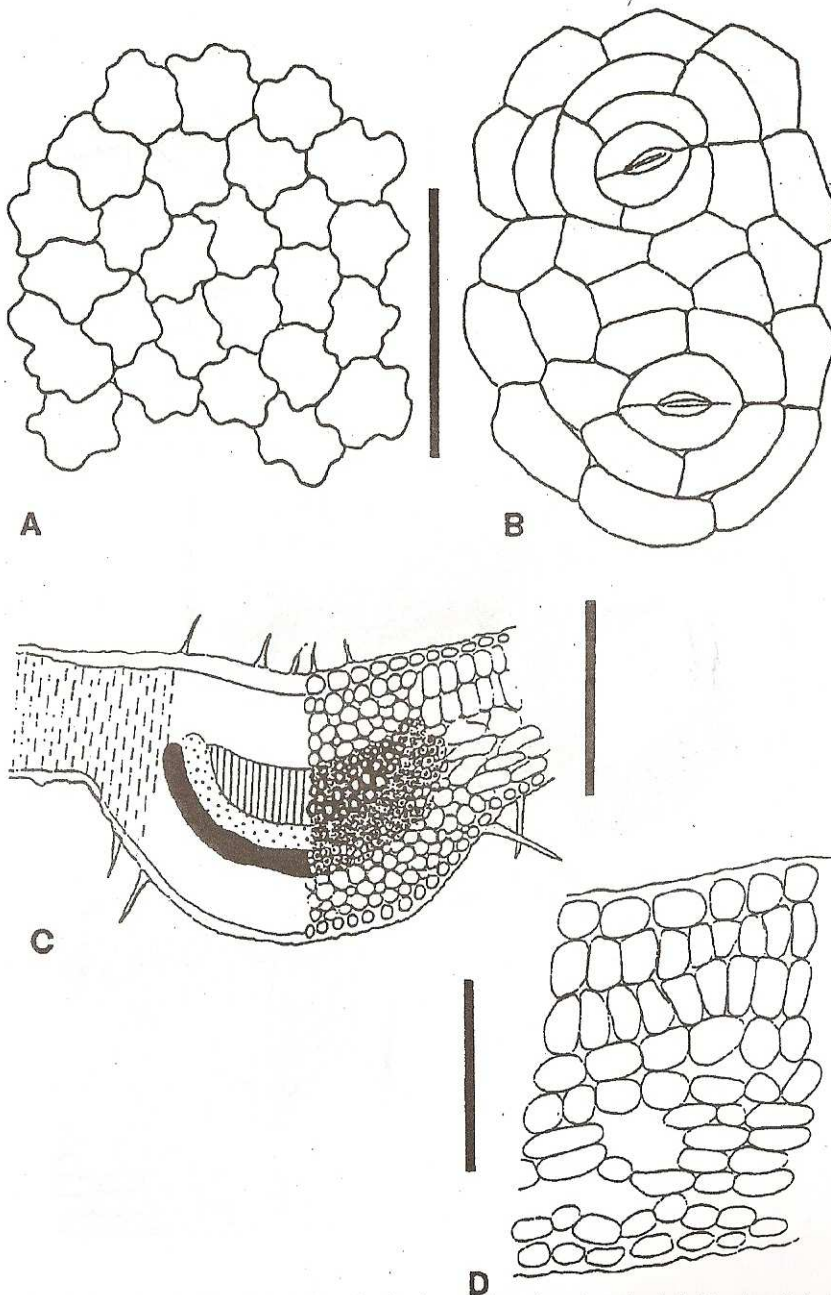


Fig. 3 - *I. brevicuspis*. Hoja: Diseño de la epidermis: A- adaxial, B- abaxial. Corte transverso: C- diseño de la nervadura principal, D- detalle del mesófilo. Escala = 100  $\mu$ m.

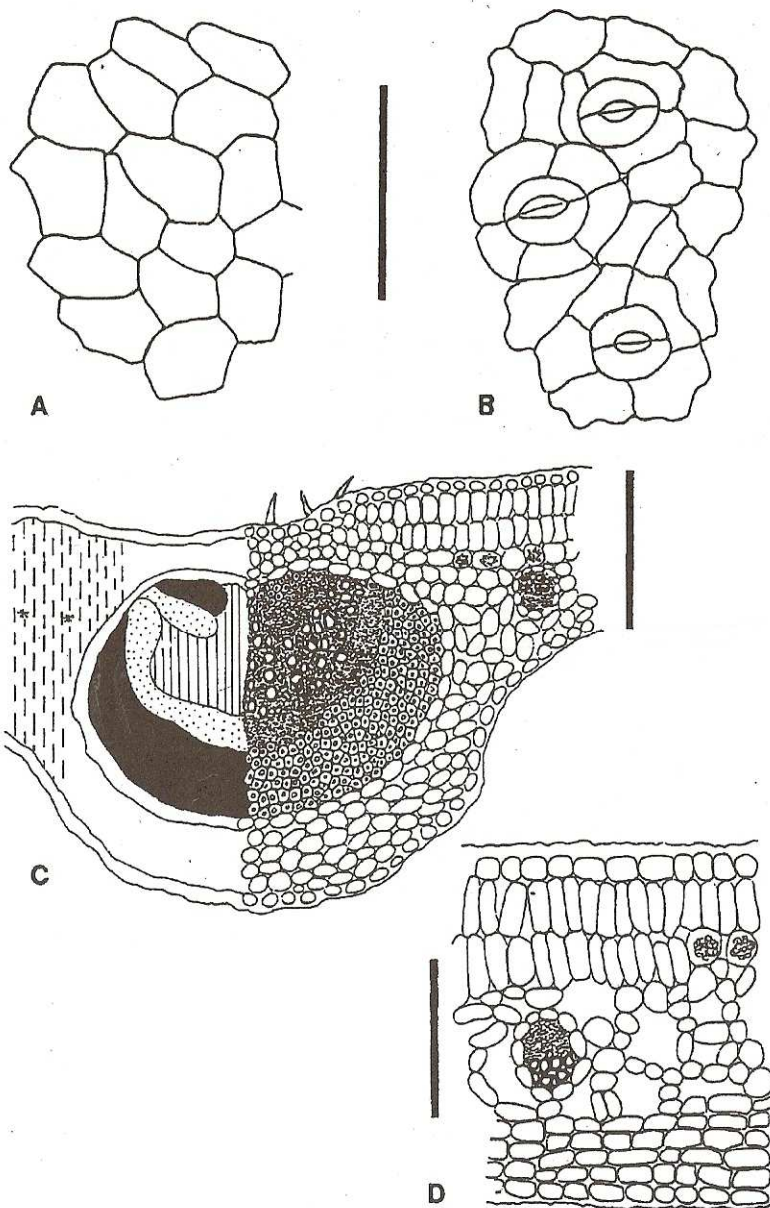


Fig. 4 - *I. dumosa* var. *dumosa*. Hoja: Diseño de la epidermis: A- adaxial, B- abaxial. Corte transverso: C- diseño de la nervadura principal; D- detalle del mesófilo. Escala = 100  $\mu$ m.

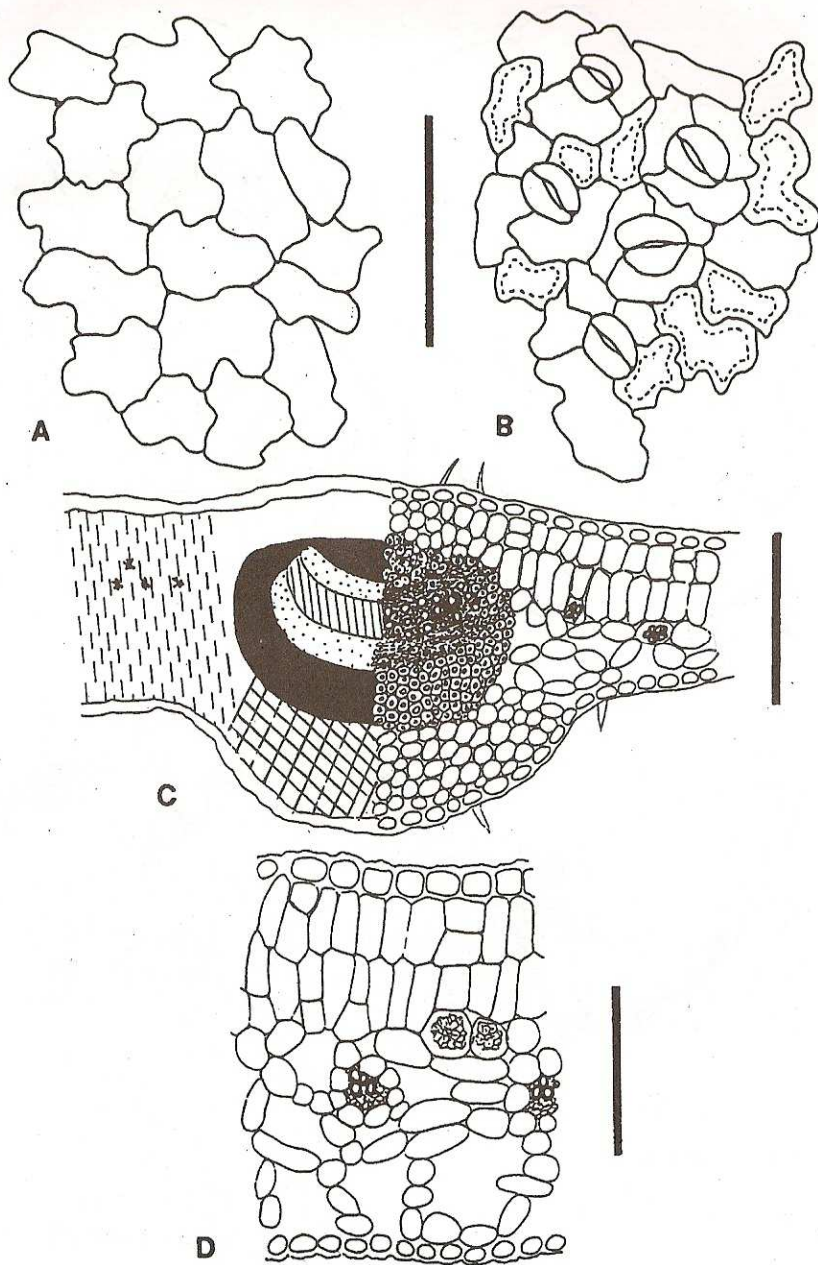


Fig. 5 - *I. dumosa* var. *guaranina*. Hoja: Diseño de la epidermis: A- adaxial, B- abaxial. Corte transverso: C- diseño de la nervadura principal, D- detalle del mesófilo. Escala = 100  $\mu$ m.

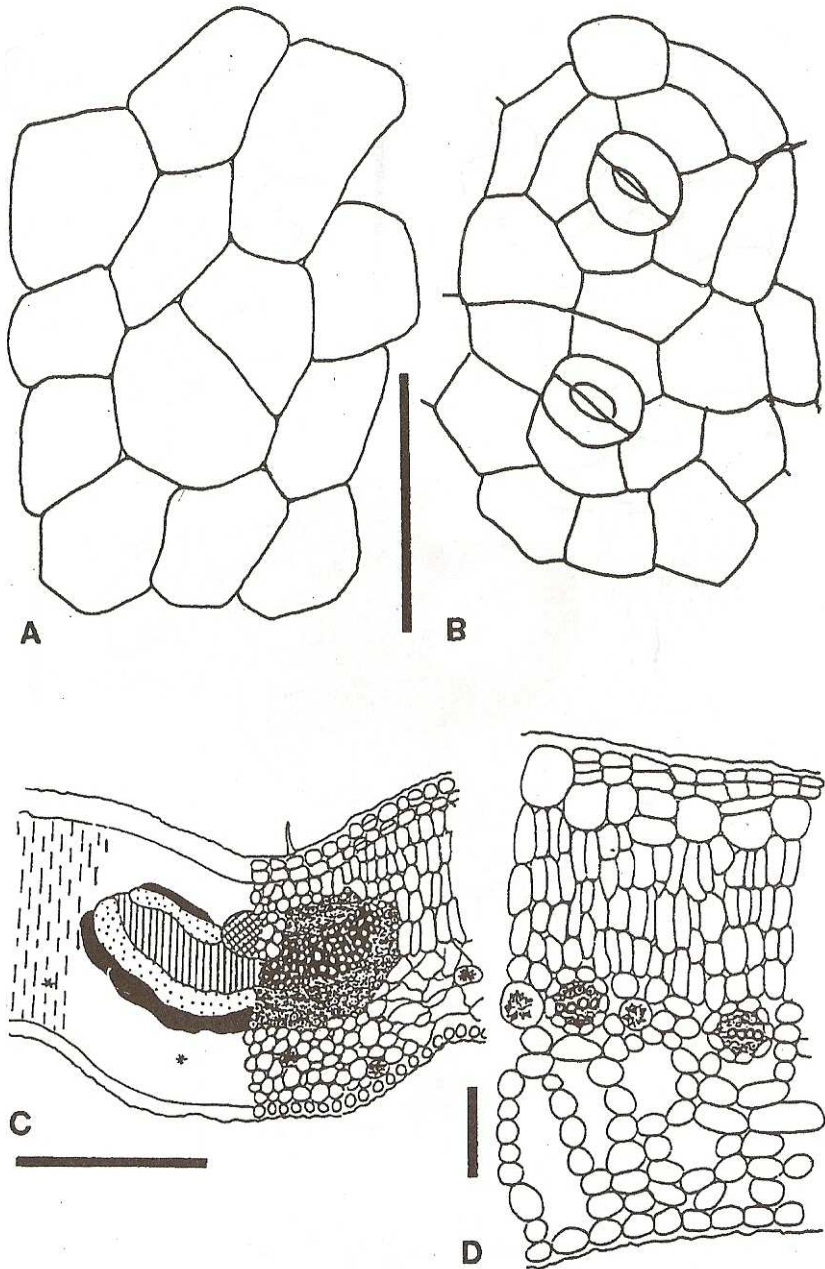


Fig. 6 - *I. theezans*. Hoja: Diseño de la epidermis: A- adaxial, B- abaxial. Corte transverso: C- diseño de la nervadura principal, D- detalle del mesófilo. Escala = 100  $\mu$ m.