

Caracteres farmacognósticos para el control de calidad de *Petiveria alliacea*, *Lippia graveolens* y *Tagetes lucida*

Bonier M. Garrido, Sindy C. Polanco, Isabel C. Gaitán, Armando Cáceres, María E. Paredes*

Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Edificio T-12, Ciudad Universitaria, Zona 12, Guatemala. Escuela de Química Biológica, Departamento de Citohistología.

*Autor a quien dirigir la correspondencia: maruparedess@yahoo.com

Resumen

Esta investigación se centró en el estudio de tres especies de plantas aromáticas de uso popular en Guatemala: *Petiveria alliacea*, *Lippia graveolens* y *Tagetes lucida*, que se aplican para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. A partir del material vegetal fresco y seco, se determinaron las características macroscópicas, organolépticas, micromorfológicas y fitoquímicas de cada especie, a los fines de establecer las que puedan ser utilizadas para su respectivo control de calidad. *P. alliacea* presenta hojas hipostomáticas con estomas paracíticos, mesófilo con dos capas de parénquima en empalizada y de 4 a 5 de parénquima esponjoso, donde encontramos cristales de oxalato de calcio en forma de estiloide; el nervio medio está constituido por hasta 6 haces vasculares dispuestos en arco. *L. graveolens* presenta hojas anfistomáticas con estomas anomocíticos; en las epidermis se observan diferentes tipos de tricomas glandulares y no glandulares; el nervio medio está constituido por 5 a 6 haces vasculares dispuestos en arco. *T. lucida* presenta hojas hipostomáticas con estomas anomocíticos y anisocíticos, mesófilo isobilateral con abundantes cavidades secretoras; el nervio medio está constituido por 3 haces vasculares con casquetes de esclerenquima y vaina esclerificada. Se identificaron para cada especie los metabolitos que podrían estar relacionados con los usos populares atribuidos.

Pharmacognostic characters for the quality control of *Petiveria alliacea*, *Lippia graveolens*, and *Tagetes lucida*

Summary

This research was focused on the study of three species of aromatic plants popularly used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal diseases, *Petiveria alliacea*, *Lippia graveolens*, and *Tagetes lucida*. Macroscopic, organoleptic, micro morphological and phytochemical characteristics of each species were determined from fresh and also dried plant material, to establish those that can be used for its quality control. *P. alliacea* exhibit hypostomatic leaves with paracytic stomata, 2 layers of palisade parenchyma and 4 to 5 of spongy parenchyma, styloid crystals and even 6 vascular bundles drawing an arch with 2 different types of collenchyma, in midrib. *L. graveolens* shows amphystomatic leaves with anomocytic stomata, variety of

Palabras clave: *Petiveria alliacea* - *Lippia graveolens* - *Tagetes lucida* - micromorfología - metabolitos secundarios - control de calidad.

Key words: *Petiveria alliacea* - *Lippia graveolens* - *Tagetes lucida* - micromorphology - secondary metabolites - quality control.

glandular and non-glandular trichomes on epidermal projections, a flattened arch with 3 accessory vascular bundles in midrib. *T. lucida* shows hypostomatic leaves with anisocytic and anomocytic stomata, isobilateral mesophyll with several secretory cavities, 3 vascular bundles adjoined with sclerenchymatic caps and surrounded by sclerenchymatous cells, in midrib. Also for each species, secondary metabolites that can be related to their popular medicinal uses were identified.

Introducción

Según los informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), desde 1993 el 80 % de la población mundial recurre a la medicina tradicional para atender sus necesidades primarias de asistencia médica (OMS, 2003).

En Guatemala existe una larga tradición del uso de plantas medicinales, relacionado con la gran diversidad biológica y cultural del país; es así que los mayas observaron los efectos de muchas plantas medicinales y sus yerberos o curanderos dominaron el conocimiento de la herbolaria, utilizando diversas hierbas para el tratamiento de la sintomatología de diversas enfermedades (Xiu-Chacón, 1998). Actualmente la población guatemalteca sigue utilizando las plantas para el tratamiento de enfermedades de diversa índole, como en el caso de las afecciones gastrointestinales, que son la primera causa de morbilidad nacional, y para las que se utilizan particularmente diversas plantas aromáticas (Cáceres y Girón, 2002; Pöll, 2005).

El hombre, a lo largo de su historia, ha utilizado plantas aromáticas para aliviar algunas de sus dolencias y para aromatizar los sitios de sus rituales o los lugares donde moraba. Desde entonces, esos sabores y olores fueron formando parte de su cultura e idiosincrasia (Dey y Harbone, 2002).

Las plantas aromáticas constituyen un conjunto de especies vegetales de diversas familias, denominadas así debido a la presencia de glándulas secretoras que contienen aceites esenciales. Esas glándulas se encuentran localizadas en diversos tejidos y órganos, como flores, hojas, brotes, tallos, madera, corteza, frutos, semillas, raíces y rizomas. Vierten el producto de secreción al exterior o al interior de esa estructura. (Alleman, 2003; Domínguez y Castro, 2002). Los aceites esenciales presentan variadas propiedades organolépticas y actividades medicinales, tanto antioxidantes como antimicrobianas; de ahí que sean utilizadas en diferentes partes del mundo en medicina tradicional para tratar padecimientos gastrointestinales, respiratorios, fe-

briles, reumáticos y dermatológicos. En general, las plantas medicinales se comercializan de diversas formas: frescas, secas, fragmentadas, pulverizadas, en cápsulas, o en extractos líquidos. Como se consideran naturales, no están sujetas a las mismas regulaciones que tienen los medicamentos de síntesis; sin embargo, pueden causar problemas a la salud si no se utilizan correctamente o si se encuentran adulteradas o falsificadas.

Las drogas vegetales requieren el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura, desde su lugar de origen hasta su utilización con fines medicinales (Cuassolo y col., 2010).

Para asegurar la calidad de la materia prima son importantes los siguientes aspectos: identificación por medio de características botánicas, organolépticas, macroscópicas y microscópicas, así como el perfil cromatográfico, reacciones de identificación y parámetros de pureza, entre los que se incluyen humedad, cenizas y rendimiento de aceites esenciales.

Este estudio se enfocó en el establecimiento de los caracteres farmacobotánicos previamente mencionados, de tres especies aromáticas nativas de Guatemala y popularmente utilizadas para el tratamiento de afecciones gastrointestinales (Cáceres, 2006; Pöll, 2005): *Petiveria alliacea* L. (“apacín”), *Lippia graveolens* HBK. (“orégano”) y *Tagetes lucida* Cav. (“pericón”) en fase fenológica de follaje y floración. Con la finalidad de establecer caracteres diagnósticos que contribuyan a garantizar la identidad de estas especies, especialmente cuando se distribuyen secas y fragmentadas que dificulta su identificación botánica.

Materiales y métodos

Se elaboraron ejemplares de herbario de las tres especies en estudio atendiendo las recomendaciones de Giberti (1998); el material, botánico de *P. alliacea* fue recolectado en Samayac, Suchitepéquez, *L. graveolens* y *T. lucida* se recolectaron en la Colección y Huerto

Productivo de Plantas Medicinales y Aromáticas, de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC). La identificación y el depósito de ejemplares de las tres plantas se realizó en el Herbario de Biología de Guatemala (BIGU), de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC y fueron incorporadas con los números 52519, 52520 y 52521 respectivamente.

Para cada especie se elaboró una descripción botánica diagnóstica a fin de facilitar su identificación en el campo. En los estudios morfológicos se emplearon órganos en completo estado de desarrollo. La evaluación morfológica de la droga seca se realizó bajo microscopio estereoscópico.

Los caracteres microscópicos de las hojas, los tallos y la raíz se determinaron a partir de preparados de planta fresca obtenidos mediante cortes a mano alzada (Gattuso y Gattuso, 1999).

Los cortes fueron teñidos con safranina y fastgreen para la observación de estructuras histológicas (Gattuso y Gattuso, 1999). Además, se prepararon diafanizados en las hojas de las tres especies, y se analizaron ambas caras de las láminas foliares para establecer las características epidérmicas y el índice de estomas (Gattuso y Gattuso, 1999). Las observaciones fueron hechas en microscopio óptico Fisher Scientific Micromaster II y digitalizadas con el programa Micron USB, West Over Scientific.

Se determinaron los porcentajes de rendimiento de aceite esencial que contenía cada una de las plantas siguiendo la metodología de hidrodestilación (Henao y col., 2010; Solís y col., 2003).

Se realizaron pruebas de pureza de las cenizas totales y la humedad para garantizar la calidad del material vegetal utilizado en los ensayos. Las cenizas fueron determinadas por medio de la ignición de la materia seca en crisoles previamente tarados, en una mufla a 600 °C durante tres horas; luego de ese período, se evaluaron las cenizas, que estaban dentro de la gama de colores que iba desde el gris hasta el blanco; por lo tanto, los crisoles fueron pesados y las cenizas, determinadas. La humedad fue determinada por termogravimetría.

Se confirmó de manera cualitativa la presencia de cuatro metabolitos secundarios en las tres especies evaluadas: alcaloides, flavonoides, saponinas y taninos, por medio de cromatografía en capa fina, con los extractos vegetales obtenidos de estas especies por percolación y concentración en rotavapor

(Solís y col., 2003). Todos los análisis numéricos se realizaron en un mínimo de tres repeticiones.

Resultados

Descripción botánica y características organolépticas diagnósticas

Petiveria alliacea es una hierba perenne, de aproximadamente 60 cm de alto, tallos delgados, ramificados, con fuerte olor aliáceo, de actividad lacrimógena. Hojas simples con filotaxis alterna; forma elíptica a oblanceolada, ápice agudo, base redondeada, peciolada; de margen o borde ondulado, coloración verde, más oscura en el haz. Tiene raíz profunda, leñosa con coloración blanco-amari-llenta (Figura 1, A).

Su materia médica son las hojas y raíces desecadas.

En la droga seca, compuesta por las hojas, aumentan la tonalidad de la coloración verde, comparada con el espécimen fresco. Conservan su olor aliáceo, son quebradizas al tacto (Figura 1, B). La raíz seca es fuertemente aromática, presenta un color blanquecino opaco, es quebradiza al tacto y su textura es rugosa (Figura 1, C).

Lippia graveolens, es un arbusto leñoso perenne de 1,6 m de alto, tallos leñosos, ramificados, delgados, con fuerte olor característico de la planta. Hojas simples con filotaxis decusada, de coloración verde, y es de mayor intensidad en el haz que en el envés; oblanceolada, ápice obtuso, peciolada; margen o borde crenado (Figura 1, D). La droga vegetal consiste en las hojas, que cambian su tonalidad de verde claro a verde fuerte, conserva su olor característico ligeramente picante y fresco, las hojas son delgadas y quebradizas al tacto (Figura 1, E).

Tagetes lucida es una hierba perenne de 45 a 58 cm de alto, tallo delgado, ramificado, con fuerte aroma anisado. Tiene hojas simples con filotaxis opuesta; son de forma oblanceolada, el ápice es agudo, base connada, son sésiles, de margen dentado, de 3 a 5 cm de largo y 2 a 3 cm de ancho. A trasluz las hojas presentan una gran cantidad de glándulas oleosas. Las flores son liguladas de color amarillo, se disponen en capítulos y estos, en inflorescencia tipo corimbo. Las partes aéreas (tallos, hojas y flores) (Figura 1, F) son las partes que se utilizan como droga vegetal.

Figura 1.- Ejemplares de las especies estudiadas



A. Ejemplar de *Petiveria alliacea* L.; B. Droga, hoja, desecada; C. Droga, raíz, desecada; D. Ejemplar de *Lippia graveolens* HBK.; E. Droga, hoja desecada; F. Ejemplar de *Tagetes lucida* Cav.

La droga seca de la materia vegetal de *T. lucida* cambia su tonalidad de verde fuerte a un verde un poco más atenuado, mientras que el color de las flores se intensifica. El olor característico dulce y anisado, persiste. La consistencia de las hojas es quebradiza al tacto.

Caracteres micromorfológicos e histológicos para la identificación

***Petiveria alliacea* L.**

Hoja

Vista superficial

La hoja de *P. alliacea* en vista superficial presenta venación cerrada reticulada de tipo broquidódroma (Figura 2, A). En la sección paradérmica y en el diafanizado de la hoja se observan células epidérmicas con paredes anticlinales gruesas y ligeramente onduladas que muestran puntuaciones primarias. La hoja es hipostomática con estomas de tipo paracítico (Figura 2, B). Presenta escasos tricomas simples pluricelulares aglandulares, que pueden tener de dos a más de diez células, y están ubicados en ambas caras de la hoja y sobre los nervios principales (Figura 2, C).

Corte transversal

En el corte transversal (CT) se observa mesófilo dorsiventral, epidermis unistrata con células de tamaño irregular en ambas caras; las células de la epidermis adaxial son más altas que las de la cara abaxial. En ambos lados se observa una cutícula delgada. El parénquima en empalizada es irregular y presenta de uno a dos estratos de células cortas y largas; el parénquima esponjoso, con aproximadamente cinco estratos de células, ocupa entre el 60 y el 70 % del mesófilo. El nervio medio está constituido por cinco a seis haces vasculares de tipo colateral abierto, están enclavados en el parénquima esponjoso y dispuestos en forma de arco; junto al floema se observan casquetes de esclerénquima. En la zona del nervio medio y adyacente a la epidermis adaxial encontramos colénquima laminar; junto a la epidermis abaxial observamos colénquima lagunar (Figura 2, E) En ambos parénquimas se observan grandes cristales estiloides de oxalato de calcio (Figuras 2, C y D).

Se evidencia además, la presencia de tricomas simples de bicelulares a pluricelulares situados en la epidermis en la zona del nervio medio (Figura 2, E).

Raíz

El CT de la raíz presenta una peridermis pluries-tratificada, y un cilindro vascular con estructura anómala; se observa una estructura con xilema compacto central, seguido por anillos de xilema alternando con anillos de parénquima que contienen islotes de floema. En todos los parénquimas se encuentran estiloides y cristales tetraédricos de oxalato de calcio.

***Lippia graveolens* HBK.**

Hoja

Vista superficial

La hoja de *L. graveolens* en vista superficial presenta venación simple, abierta y reticulada de tipo craspedódroma (Figura 3, A). El diafanizado del limbo foliar muestra una hoja anfistomática con estomas del tipo anomocítico. Las células epidérmicas de la cara adaxial presentan células con paredes anticlinales lisas y ligeramente gruesas, mientras que en la cara abaxial presentan paredes anticlinales sinuosas y delgadas (Figura 3, B). En las epidermis se observan gran cantidad de tricomas eglandulares y glandulares (Figuras 3, B y C).

Pelos

Tricomas eglandulares

Unicelulares, simples, verrucosos, de base ancha y extremo agudo y pueden estar en línea con la epidermis o elevados sobre columnas epidérmicas de dos o más células. Presentan cistolitos en la base de la célula tricomática (Figuras 3, D y E).

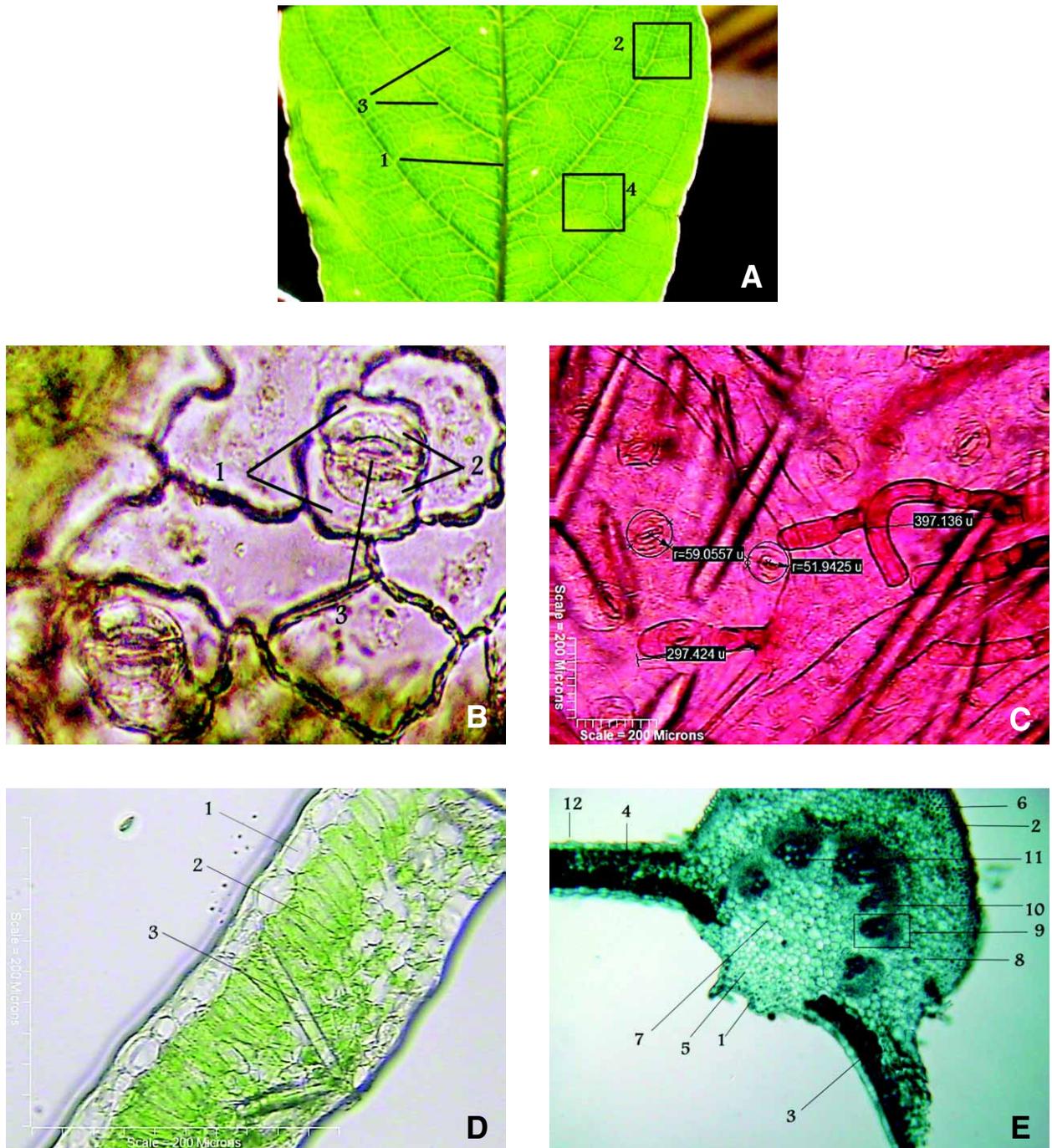
Tricomas glandulares

Sésiles, cabezuela unicelular (peltados), (Figura 3, D); pie 1-2 celular, cabeza unicelular achatada (Figuras 3, B y D); pie bicelular, corto y cabeza de dos células (Figura 3, C); pie pluricelular largo y cabeza unicelular pequeña (Figura 3, E).

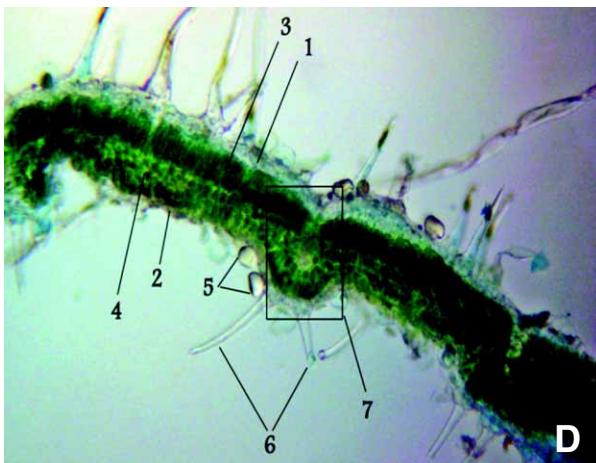
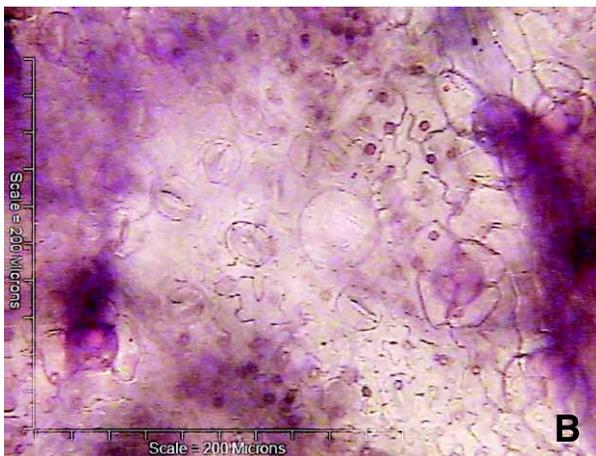
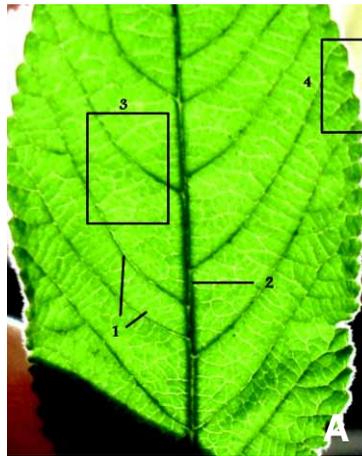
Corte transversal

En el CT del limbo foliar se observa el mesófilo dorsiventral con epidermis unistrata e irregular, formada por células rectangulares de paredes periclinales rectas y delgadas (Figuras 3 D y E). En la cara adaxial presenta una sola capa de parénquima en empalizada formada por células largas que aproximadamente ocupan la mitad del grosor de la hoja y tres capas irregulares de parénquima esponjoso.

Figura 2.- *Petiveria alliacea* L.



A. Tipo de venación de la hoja, materia fresca: vena primaria (1), venación cerrada (2), venas secundarias (3), venación reticulada (4) (10x); **B.** Sección paradérmica de la hoja, epidermis abaxial, se observan estomas paracíticos: células subsidiarias (1), células oclusivas (2), ostiolo (3) (400x); **C.** Tricomas no glandulares de la cara abaxial, cristales estiloideos de oxalato de calcio (200x); **D.** Corte transversal de la hoja: células de epidermis adaxial (1), células irregulares del parénquima en empalizada (2), estiloide de oxalato de calcio (3) (200x); **E.** Corte transversal de la hoja: epidermis adaxial (1), epidermis abaxial (2), parénquima en empalizada (3), parénquima esponjoso (4), colénquima (5-6), parénquima (7-8), haz vascular (9), floema, (10), xilema (11), epidermis abaxial (12) (100x).

Figura 3.- *Lippia graveolens* HBK.

A. Hoja en vista superficial; **B.** Diafanizado de limbo foliar, células epidérmicas y estomas anomocíticos, epidermis abaxial y adaxial (200x); **C.** Corte transversal de hoja, dos tipos de tricomas glandulares pluricelulares (400x); **D.** Corte transversal de hoja gran cantidad de tricomas: haz (1), envés (2), parénquima empalizada (3), parénquima esponjoso (4), tricomas glandulares peltados (5) y capitados (6), nervadura secundaria (7) (50x); **E.** Corte transversal por nervio medio, tricomas glandulares de base larga y no glandulares sobre proyecciones (200x).

En el transcurso se observa gran cantidad de tricomas glandulares y no glandulares, como los descritos en la vista superficial. (Figuras 3, D y E). El nervio medio del limbo foliar está constituido por 5 a 6 haces vasculares colaterales abiertos, dispuestos en arco y enclavados en el parénquima esponjoso (Figura 3, E).

***Tagetes lucida* Cav.**

Hoja

Vista superficial

La hoja de *T. lucida* en vista superficial presenta una venación abierta y reticulada de tipo craspedódroma (Figura 4, A). En el diafanizado del limbo foliar se observa una hoja hipostomática, con estomas anisocíticos y anomocíticos. Las células epidérmicas presentan paredes anticlinales gruesas y sinuosas (Figura 4, B). Se observan escasos tricomas glandulares en ambas epidermis.

Corte transversal

En el CT del limbo foliar se observa un mesófilo unifacial o equibilateral. Presenta epidermis unistrata en ambas superficies de la hoja, seguida en ambos lados por una capa de parénquima en empalizada, cuyas células son más altas hacia la epidermis adaxial que hacia la epidermis abaxial. El parénquima esponjoso, situado entre ambos parénquimas en empalizadas, presenta grandes cavidades secretoras (Figura 4, C). El nervio medio del limbo foliar es poco prominente y presenta tres haces vasculares de tipo colateral abierto, uno más grande y central, y dos laterales de menor tamaño. Los haces presentan casquetes de esclerénquima pertenecientes al floema y una vaina de células grandes esclerificadas (Figura 4, D). Debajo de las epidermis adaxial y abaxial, y reforzando los haces vasculares encontramos colénquima tipo laminar. Se observan escasos tricomas glandulares en ambas epidermis y sobre el nervio central.

Tallo

Corte transversal

En el CT del tallo se puede observar la forma poligonal, epidermis uniestratificada seguida de una a dos hileras de colénquima tipo laminar, más desa-

rollado en los ángulos; el cilindro vascular presenta hasta 24 haces colaterales y de 10 a 12 casquetes de esclerénquima, dispuestos en una eustela muy compacta; cercanos a la epidermis se observan conductos secretores (Figura 4, E).

En las tablas 1, 2 y 3 se presentan los datos correspondientes a las estructuras identificadas de las tres especies estudiadas.

Tamizaje fitoquímico

La presencia de metabolitos secundarios se evaluó por medio de la técnica de cromatografía en capa fina. Los resultados de esas pruebas se presentan en la tabla 4.

Alcaloides

Para la prueba de CCF se utilizaron los estándares de atropina que presentó un Rf de 0,85 y el de papaverina, que no dio una banda identificable. Tres de las muestras analizadas presentaron bandas en esa región, con Rf de 0,88 (hoja de *P. alliaceae*, hoja de *L. graveolens* y hoja de *T. lucida*). El resto de bandas no pudieron ser identificadas.

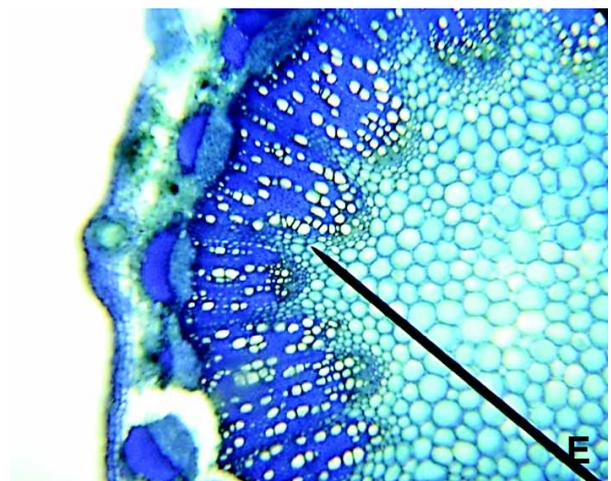
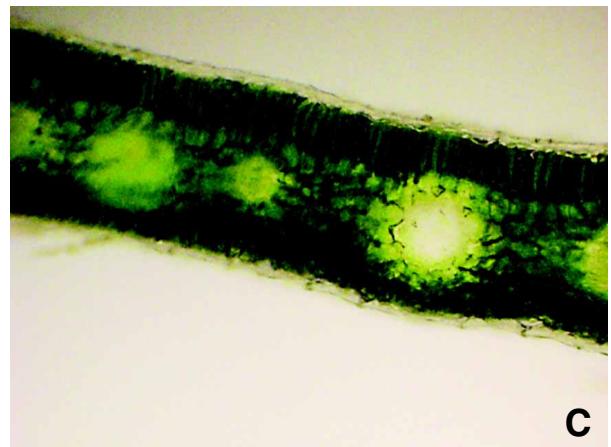
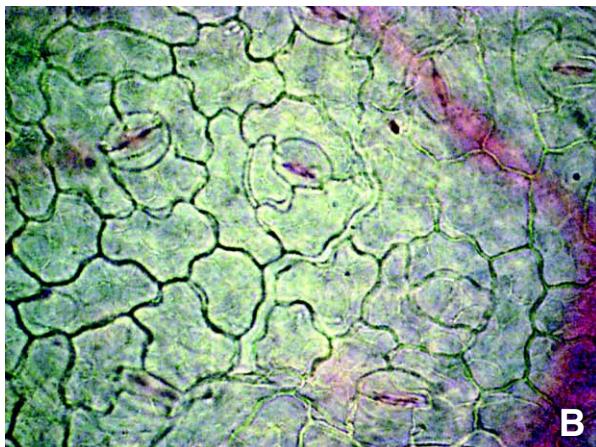
Polifenoles

Para la identificación de los polifenoles se utilizaron los estándares de quercetina (Rf: 0,61), rutina (Rf: 0,14), hiperósido (Rf: 0,34 y ácido clorogénico (Rf: 0,29). Las dos muestras analizadas de *T. lucida* (pre-floración y floración) presentaron una banda cercana a la región de la rutina. Las hojas de *T. lucida* en prefloración presentaron ácido clorogénico, y las hojas de *P. alliacea* presentaron una banda en la región del hiperósido. El resto de bandas no pudieron ser identificadas.

Saponinas

Se utilizó el estándar de saponina que dio un Rf de 0,78 y una coloración violeta, el estándar de diosgenina con un Rf de 0,88 y el estigmasterol con un Rf de 0,97. Todas las muestras presentaron bandas en la región visible para los tres estándares utilizados, a excepción de *T. lucida* en floración, que solo presentó una banda correspondiente al estándar de saponina.

Figura 4.- *Tagetes lucida* Cav.



A. Hoja vista superficial; B. Diafanizado de limbo foliar células epidérmicas, estomas anomocíticos y anisocíticos (200x); C. Corte transversal de hoja mesófilo isobilateral con cavidades secretoras; D. Corte transversal del limbo a nivel del nervio medio: epidermis adaxial y colénquima (1), casquete de esclerénquima (2) (200x); E. Transcorte de tallo (100x).

Tabla 1.- Morfoanatomía de hoja y raíz de *Petiveria alliacea* L.

Estructura	Características	Resultados
Hoja	Nervación	Cerrada reticulada, broquidódroma.
	Estomas	Hoja hipostomática, estomas del tipo paracíticos.
	Epidermis	Unistrata en ambas caras, células epidermis adaxial más altas con irregularidades.
	Mesófilo	Dorsiventral. Parénquima en empalizada uni o biestratificado e irregular. Otros: cristales estiloides de oxalato de calcio.
	Nervadura central	Haces vasculares del tipo colateral abierto.
Raíz	Indumento	Tricomas pluricelulares predominando los no glandulares o tectores.
	Estructura secundaria	Cilindro vascular con estructura anómala, se observa una estructura con xilema compacto central.

Tabla 2.- Morfoanatomía de hoja de *Lippia graveolens* HBK.

Estructura	Características	Resultados
Hoja	Nervación	Abierta reticulada simple, craspedódroma.
	Estomas	Anfistomática, estomas anomocíticos.
	Epidermis	Uniestrada en ambas caras.
	Mesófilo	Dorsiventral. Una capa de parénquima clorofiliano en empalizada con células largas.
	Nervio medio	Haces vasculares: 5 a 6 colaterales abiertos dispuestos en arco.
	Indumento	Tricomas glandulares con cabeza unicelular y bicelulares, no glandulares largos y cortos sobre proyecciones epidérmicas.

Tabla 3.- Morfoanatomía de hoja y tallo de *Tagetes lucida* Cav.

Estructura	Características	Resultados
Hoja	Nervación	Abierta reticulada pinnada, craspedódroma.
	Estomas	Hipostomática, estomas anisocíticos y anomocíticos.
	Epidermis	Uniestratificada en ambas superficies.
	Mesófilo	Equilibrilateral, parénquima en empalizada bajo ambas caras y esponjoso central con gran cantidad de cavidades secretoras.
	Nervio medio	Tres haces vasculares colaterales abiertos.
	Indumento	Escasos tricomas glandulares unicelulares y no glandulares pluricelulares.
Tallo	Estructura primaria	Presenta haces colaterales abiertos. Tiene euestela. Colénquima laminar. Conductos secretores.

Tabla 4.- Cromatografía en capa fina para confirmar la presencia de metabolitos secundarios de interés

Metabolitos	<i>P. alliacea</i>		<i>L. graveolens</i>	<i>T. lucida</i> (prefloración)	<i>T. lucida</i> (floración)	Estándares utilizados	
	Rf de la droga vegetal evaluada					Rf	
	H	R	H	H	H		
Alcaloides	0,88	0,33	0,51	0,88	ND	Atropina	0,85
			0,67	0,94	ND	Papaverina	ND
			0,88				
Polifenoles	0,33	0,42	0,45	0,18	0,18	Rutina	0,14
			0,93	0,29	0,45	Ac. clorogénico	0,29
				0,43	0,93	Hiperósido	0,34
				0,93		Quercitin	0,61
Saponinas	0,74	0,76	0,76	0,76	0,78	Saponina	0,78
	0,85	0,87	0,91	0,90		Diosgenina	0,88
	0,97	0,97	0,97	0,97		Stigmasterol	0,97

H: hoja; R: raíz.

Porcentajes de rendimiento de aceites esenciales y extracto vegetal

Se determinaron los porcentajes de rendimiento tanto de la extracción de aceites esenciales como la obtención del extracto vegetal. Al evaluar los resultados de las tres plantas, el mayor porcentaje en la obtención, tanto de extracto vegetal como de aceite esencial, lo mostró *L. graveolens*; en cuanto a la comparación de las dos etapas fenológicas de *T. lucida*, la etapa de floración fue la que obtuvo el mayor rendimiento de estos dos parámetros.

Parámetros de pureza (humedad y cenizas totales)

En la determinación de cenizas totales, la hoja de *P. alliacea* mostró los mayores porcentajes de cenizas totales con un promedio de 16,42 %, *L. graveolens*, 12,01 %, raíz de *P. alliaceae*, 11,83 %, *T. lucida* en fase de prefloración, 10,58 %, y en fase de floración, 8,62 %. El porcentaje de humedad para todas las muestras fue menor del 10 %.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron establecer caracteres farmacobotánicos útiles

para el control de calidad de las especies aromáticas: *P. alliacea*, *L. graveolens* y *T. lucida*.

Las características botánicas encontradas en *P. alliacea* coinciden con las descripciones realizadas por otros autores para la familia Phytolaccaceae y el género *Petiveria* (Cáceres, 2006; Di Stasi y Hiruma-Lima, 2002; Rzedowski y de Rzedowski, 2000). El olor aliáceo y la propiedad lacrimógena de esta especie se debe a que, tanto la raíz como la hoja cuentan con un alto contenido de derivados del aminoácido cisteína, compuesto sulfurado como petivericina, tiosulfinato, petiveriina, etc., pero en especial, se atribuye a la sulfina (Cáceres, 2006). Estas características le confieren actividad antifúngica y antibacteriana y los compuestos polisulfurados son los más activos (López y Pérez, 2010; Muñoz, 2011).

Los caracteres micromorfológicos observados en el CT del limbo foliar como, mesófilo bifacial, epidermis unistrata y la presencia de colénquima en la nervadura central, es propia de la familia Phytolaccaceae; sin embargo, Duarte y Lopes (2005), informaron para la especie, colénquima angular; en nuestro estudio el colénquima adyacente a la epidermis abaxial es de tipo lagunar y el adyacente a la epidermis adaxial es de tipo laminar. Cáceres (2006) informa para esta especie, solo colénquima laminar. La presencia de grandes

cristales estiloides de oxalato de calcio ha sido informada por otros investigadores (Cáceres, 2006; Metcalfe y Chalk, 1972), lo cual coincide con este estudio, no así con los informes de Duarte y Lopes (2005), quienes expresaron pequeños cristales prismáticos, además, informaron un máximo de cinco haces vasculares en arco en CT del nervio medio, mientras que en este estudio se encontraron hasta seis, al igual que lo expresado por Metcalfe y Chalk (1972). Se encontraron tricomas pluricelulares de tipo no glandular o tectores, que además de tener un valor en la identificación de las especies, garantizan protección ante los insectos, incluso de estar relacionados en la regulación de la temperatura y la hidrofugación (Duarte y Lopes, 2005; Martínez y col., 2004).

En este estudio, al igual que lo sostenido por Duarte y López (2005), se encontró una hoja hipostomática con estomas de tipo paracítico; no se encontraron los estomas anisocíticos informados por Cáceres (2006). En el CT del limbo foliar se observó un parénquima en empalizada irregular con una o dos capas de células cortas.

Para *L. graveolens*, la descripción botánica realizada coincide con lo observado por Cáceres (2009) y Pöll (2005). Las observaciones del cambio de color de la droga vegetal al secarse, así como volverse frágil y conservar su olor característico, corresponde a lo evaluado por Nuñez y col. (2007) que describieron a la familia Verbenaceae.

También para otras especies del género se ha descrito la presencia de mesófilo bifacial y colénquima asociado a ambas epidermis en la zona del nervio medio, así como haces vasculares colaterales abiertos dispuestos en forma de arco (Milaneze-Gutierrez y col., 2003); sin embargo, la presencia de uno a tres haces accesorios puede considerarse importante, ya que otras especies de Verbenaceae, presentan diferente distribución y cantidad de haces accesorios. Las hojas anfistomáticas son características de la familia (Bonzani y Col., 1997). Los tricomas tectores cumplen funciones de defensa, mientras que los glandulares colaboran en la secreción de sustancias de interés, como aceites esenciales, entre otras (Bonzani y col., 1997; Molina, 2008). La variabilidad de tricomas encontrados en *L. graveolens*, tanto glandulares como no glandulares, son característicos de la familia (Bonzani y col., 1997; Martínez-Natarén y col., 2011; Metcalfe y Chalk, 1972). Cáceres (2006), describe los tricomas glandulares

con cabeza bicelular y pie unicelular, con cabeza unicelular y pie bicelular observados en este estudio; sin embargo, no describe los tricomas peltados, que sí son descritos por Martínez-Natarén y col. (2011), quienes además, mencionan el efecto de los factores ambientales sobre la densidad de los tricomas. Concluyeron que la densidad de tricomas aumenta con la humedad del lugar de crecimiento de *L. graveolens*.

Para *T. lucida*, la descripción botánica corresponde a lo descrito por otros autores (Cáceres, 2009; García Sánchez y col., 2012; Pöll, 2005), la identificación organoléptica, tanto en su etapa de follaje como floración, se caracteriza porque el aroma de sus hojas es fuertemente anisado, hecho que ha ocasionado que en muchas poblaciones rurales, donde es ampliamente utilizado, se lo conozca como "anisillo" (García Sánchez y col., 2012).

En la etapa de floración la hoja tiene una gran cantidad de glándulas oleosas, que coincide con lo encontrado por Visintin y Bernardello (2005), quienes describieron a la familia Asteraceae, y en específico al género *Tagetes*.

La descripción micromorfológica de la materia fresca indica que tiene una epidermis uniestratificada en ambas superficies de la hoja, tal y como Metcalfe y Chalk (1950) y Mercado y col. (2006), señalaron para la familia Asteraceae, aunque no se considera de valor diagnóstico debido a que puede variar en condiciones ambientales (Milán y col., 2006). Asimismo, estos autores describieron que la familia Asteraceae comúnmente tiene hojas con mesófilo del tipo dorsiventral. Sin embargo, en este estudio *T. lucida* presentó un mesófilo tipo isobilateral, que según los autores mencionados es común encontrarlo en hojas erguidas o pendulares y está relacionado con condiciones ambientales. Nuestros resultados coinciden con lo informado por García-Sánchez y col. (2012) quienes también informaron el mesófilo bifacial y cavidades secretoras, tanto en el mesófilo como en la nervadura central.

En nuestro estudio, la nervadura central presenta de uno a tres haces vasculares, lo cual difiere de lo mencionado por García Sánchez y col. (2012) quienes mencionan que la nervadura central tiene dos haces vasculares. Sin embargo, la presencia de esclerénquima y una vaina esclerosada sí es informada por ellos. La nervadura central poco prominente ha sido descrita en otras especies de Asteraceae (Zambare y col., 2010). Para *T. lucida*, el indumento

está formado por escasos tricomas de tipo no glandular, que para este estudio fueron más abundantes en la cara adaxial, contrario a lo informado por García Sánchez y col. (2012); estos autores informan solo estomas de tipo anomocítico, y en este estudio se encontraron además, anisocíticos.

En cuanto al tamizaje fitoquímico de las tres especies en estudio, en la cromatografía en capa fina, se confirma que los alcaloides encontrados para *L. graveolens*, la hoja de *P. alliacea* y la hoja de *T. lucida* en follaje corresponden a atropina, al compararlos con el Rf del estándar utilizado,

En la cromatografía en capa fina, los Rf^o encontrados para *L. graveolens*, *P. alliacea* y *T. lucida* en follaje pueden compararse con los tres estándares utilizados, la saponina, la diosgenina y el stigmasterol; en consecuencia, se confirma que las tres plantas tienen estos tipos de saponinas (Martínez Pilar y col., 2003; Cáceres, 2006, Teleguario, 2008).

El porcentaje de humedad de las tres especies evaluadas se encontraba dentro de los rangos aceptables especificados por la OMS (<10 %), lo cual garantiza que el material vegetal utilizado en este estudio se encontraba seco adecuadamente.

El porcentaje de ceniza indica el contenido de sustancias inorgánicas. El valor límite según la OMS es de 12 %, con todas las muestras evaluadas dentro de los límites establecidos a excepción de la hoja de *P. alliacea*; sin embargo, en otros estudios se informan valores de cenizas totales de 17,61 % y de 15 %. (Cáceres, 2006). Este parámetro puede ser influenciado por muchas variables, entre las que se pueden mencionar la época del año en que fue recolectada la muestra, las propiedades físicas del suelo en el que es cultivada la planta. A pesar de que este valor presenta gran variabilidad, incluso en repeticiones del mismo material evaluado, puede llegar a carecer de valor en la caracterización de la materia de estudio, aunque al igual que el valor de porcentaje de humedad, garantiza la calidad del material vegetal utilizado (Solís y col., 2003).

Una característica de las tres especies evaluadas es que sus aceites esenciales también son de importancia médica; en *P. alliacea* el rendimiento de aceites esenciales fue de 0,68 %. Considerando que se ha reconocido al aceite esencial de la raíz como de mayor actividad medicinal, sería interesante comparar los componentes tanto del aceite de las hojas como el de la raíz (Martínez Pilar y col., 2003).

El porcentaje de rendimiento obtenido para *L. graveolens* fue de 1,45 %; un estudio previo (Quezada, 2008) determinó que para las hojas de *L. graveolens* el porcentaje de rendimiento experimental es de entre 1,252 a 1,528 % dependiendo del área; al hacer las correspondientes comparaciones se determina que los porcentajes de rendimiento son muy similares (Quezada, 2008).

El porcentaje de rendimiento para *T. lucida* en etapa fenológica de prefloración presentó un rango de 0,75 %; para este porcentaje no se cuenta con un dato teórico que sirva para comparación. Para *T. lucida* en etapa de floración el porcentaje de rendimiento fue de 0,84 %, mientras que el obtenido en un estudio previo, fue de 0,26 %. Este dato puede verse influenciado por la época de recolección, ya que el contenido de aceite esencial aumenta con la mayor cantidad de precipitación pluvial. Además, se ha informado mayor cantidad de aceite si la recolección se realiza por la mañana (Samol y Santizo, 2011).

Igualmente al determinarse los porcentajes de rendimiento de los extractos vegetales se concluye que tanto los porcentajes de extracto sólido como de aceite esencial dependen mucho de las condiciones climáticas y de estrés de la planta, lo que puede interferir igualmente en la producción de metabolitos secundarios. Entre esos factores podemos mencionar tanto la falta como el exceso de lluvia, las cantidades de sol que recibe, el clima de la región donde se encuentra el cultivo, si la región es distinta a la nativa. Puede interferir igualmente el tipo de suelo en el que se asienta la planta, su inclinación y la vegetación circundante (Moriconi y col., 2009).

Concluimos que las tres especies estudiadas presentan características organolépticas muy particulares, especialmente *P. alliacea* y *T. lucida*, sin embargo, existen otras plantas medicinales con olores similares, por lo que al encontrarse secas y fragmentadas, los caracteres micromorfológicos de las hojas aportan herramientas muy útiles para el establecimiento del control de calidad de las tres especies, especialmente los de la vena media, el mesófilo, y los tipos de tricomas y estomas. Sería importante realizar índices numéricos que pueden ser muy útiles para diferenciar adulteraciones con plantas del mismo género. De igual forma las características fitoquímicas y fisicoquímicas pueden contribuir a determinar la calidad de las drogas vegetales.

Agradecimientos

A la Facultad de Agronomía, especialmente al ingeniero agrónomo Vicente Martínez y a su equipo de trabajo y al Departamento de Ecología, por la valiosa ayuda brindada para la realización de la fase botánica experimental. Al Laboratorio de Bioensayos, al Departamento de Citohistología y al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por su colaboración y supervisión en la fase fitoquímica y la interpretación de los resultados.

Referencias bibliográficas

- Alleman, J.; Robberts, P.J.; Hammes, P.S. (2003). "Organographic and anatomical evidence that the edible storage organs of *Plectranthus esculentus* N.E.Br (Lamiaceae) are stem tubers". *Field Crops Research* 83(1): 35-39.
- Bonzani, N.; Filipa, E.; Barboza, G. (1997). "Particularidades Epidérmicas en algunas especies de Verbenaceae". *Anales del instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 68 (2), 47- 56.
- Cáceres A. (2006) *Propuesta de Monografías Farmacopéicas de 10 Plantas Medicinales Centroamericanas*. Guatemala, OEA: 21-26, 35-49.
- Cáceres, A. (2009). *Vademécum Nacional de Plantas Medicinales*. Editorial Universitaria, Guatemala: 83-85; 287-289.
- Cáceres, A.; Girón, L.M. (2002). "Desarrollo de medicamentos fitoterápicos a partir de plantas medicinales en Guatemala". *Revista de Fito-terapia* 2(1): 41-46.
- Cuassolo, F.; Ladio, A.; Ezcurra, C. (2010). "Aspectos de la comercialización y control de calidad de las plantas medicinales más vendidas en una comunidad urbana del NO de la Patagonia Argentina". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9(3): 166-176.
- Dey, J.; Harbone, J. (2002). "Methods in Plant Biochemistry". *Plant Phenolics*, I(52): 28-31.
- Di Stacy, L.C.; Hiruma-Lima, C.A. (2002). *Plantas medicinais na Amazonia e na Mata Atlantica*. São Paulo: UNESP.
- Domínguez-Vasquez G.; Castro-Ramírez E. (2002). "Usos medicinales de la familia Labiatae en Chiapas, México". *Etnobiología* 2: 19-31.
- Duarte, M.; Lopes, J. (2005). "Leaf and stem morphoanatomy of *Petiveria alliacea*". *Fitoterapia* 76: 599-607.
- García-Sánchez, F.; López-Villafranco, M.E.; Aguilar-Rodríguez, S.; Aguilar-Contreras, A. (2012). "Etnobotánica y morfo-anatomía comparada de tres especies de *Tagetes* que se utilizan en Nicolás Romero, estado de México". *Botanical Sciences* 90(3): 221-232.
- Gattuso, M.; Gattuso, S. (1999). *Manual de procedimientos de drogas en polvo*. Argentina : UNR Editora.
- Giberti, G.C. (1998). "Herborización y herbarios como referencia en estudios técnico-científicos. Herbarios de la Argentina". *Dominguezia* 14(1): 19-39.
- Henao, J.; Muñoz, L.J.; Padilla, L.; Ríos, E. (2010). "Extracción y caracterización del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K. Orégano de monte, cultivado en el Quindío y evaluación de la actividad antimicrobiana". *Revista de Investigaciones Universidd del Quindío* 21: 82- 86.
- López, J.; Pérez, J. (2010). "Fitoquímica y valor ecológico del olor a ajo en los vegetales". *Medicina Naturista*, 4(1), 15-23.
- Martínez, J.; Arizaleta, M.; Sanabria, M.; Brito, L. (2004). "Características de los estomas, densidad e índice estomático y su variación en función a la injertación en *Annona muricata* L. y *A. montana*. MADFAC". *Bioagro* 16(3): 213-218.
- Martínez-Natarén, D.A.; Parra-Tabla, V.; Dzib, G.; Calvo-Irabién, L.M. (2011). "Morphology and density of glandular trichomes in populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K, Verbenaceae), and the relationship between trichome density and climate". *Journal of the Torrey Botanical Society* 138: 134-144.
- Martínez Pilar, M.M.; Baracaldo Barrera, N.; Santos Obregón, M.; Guzmán, D.N. (2003). "Estudio farmacognóstico, fitoquímico, microbiológico de *Petiveria alliacea* Lin 1998". *Gaceta Médica Espirituria*: 5(1). En línea <[http://bvs.sld.cu/revistas/gme/pub/vol.5.\(1\)_02/p2.html](http://bvs.sld.cu/revistas/gme/pub/vol.5.(1)_02/p2.html)>.
- Mercado, M.I.; Ponessa, G.I.; Grau, A. (2006). "Morfología y anatomía foliar de "Yacón", *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae), con fines de control de calidad". *Acta Farmacéutica Bonaerense* 25(4): 526-32.

- Metcalf, C.R.; Chalk, L. (1950). *Anatomy of Dicotyledons*, Vol. I. Clarendon Press, Oxford: xi-xxi.
- Metcalf, C.R.; Chalk, L. (1972). *Anatomy of Dicotyledons*. Vol. II. Clarendon Press, Oxford: 1030-1041.
- Milan, P.; Hissae, A.; Apezato da Glória, B. (2006). "Comparative leaf morphology and anatomy of three Asteraceae species". *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49(1): 135-144.
- Milaneze-Gutierrez, M.A.; Mello, J.C.P.; Delaporte, R.H. (2003). "Efeitos da intensidade luminosa sobre a morfo-anatomia foliar de *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. (Verbenaceae) e sua importância no controle de qualidade da droga vegetal". *Revista Brasileira de Farmacognosia* 13(1): 23-33.
- Molina, M. (2008). "Variación de la pubescencia foliar en plantas y sus implicaciones funcionales a lo largo de gradientes altitudinales". *Ecosistemas* 17(1): 146-154.
- Moriconi, J.I.; Fernández, E.A.; Martínez, E.; Giulietti, A. (2009). "Rendimiento de materia seca y composición del aceite esencial de *Lippia turbinata* Griseb. "poleo" (Verbenaceae), en plantas de San Luis (Argentina)". *Horticultura Argentina* 28(65): 34-38.
- Muñoz, I. (2011). *Evaluación de los contenidos metabólicos en cultivos de células de "P. alliacea"*. Tesis de graduación Magister en Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Medellín.
- Núñez, M.; Aguado, M.; Bela, A.; Vonka, C.; Sansberro, P. (2007). "Farmacognosia y Fitoquímica de *Lippia* G. Verbenaceae". *Boletín Latinoamericano y del Caribe Plantas Medicinales y Aromáticas* 6(5): 262-263.
- OMS. (2003). *Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales*. Ginebra.
- Pöll, E. (2005). "Medicinal and aromatic plants of Guatemala and the need for their conservation". *Acta Horticulturae* 676: 167-170.
- Quezada, A. (2008). Evaluación del rendimiento de extracción del aceite esencial crudo de orégano (*Lippia graveolens*) provenientes de dos zonas de distinta altitud, por medio del método de arrastre de vapor a nivel de planta piloto. *Tesis de Grado, Ingeniería*, Universidad de San Carlos de Guatemala, Escuela de Ingeniería Química, Guatemala.
- Rzedowski, J.; de Rzedowski, G. (2000). "Phytolaccaceae". *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*. Instituto de Ecología. Patzcuaro, Michuacan: Centro Regional del Bajío. Fascículo 91: 1-31.
- Samol, V.; Santizo, B. (2011). Actividad inhibitoria de extractos y aceites esenciales de especies condimentarias, alimenticias y medicinales contra *Campylobacter jejuni*. *Tesis de Grado, Licenciatura*, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
- Solís, P.N.; Guerrero, N.; Gattuso, S.; Cáceres, A. (2003). *Manual de caracterización y análisis de drogas vegetales y productos fitoterapéuticos*. Proyecto Desarrollo de Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos, OEA/AICD/AE 089/03, Panamá: 132.
- Teleguario, C. (2008). Caracterización y Cuantificación de Flavonoides, Sapogeninas, Esteroides en extractos de tres plantas mesoamericanas, *Lippia graveolens* (orégano), *Passiflora edulis* (maracuyá) y *Smilax domingensis* (zarparrilla). *Tesis de Grado, Licenciatura*, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
- Visintin, A.; Benardello, G. (2005). "Morfología y Anatomía floral de *Tagetes* (Asteraceae)". *Arnaldoa* 12(1-2): 8-15.
- Xiu-Chacón, G. (1998). "El arte curativo de los Mayas y los primeros médicos de la península de Yucatán, México". *Revista Biomédica* 9: 38-43.
- Zambare, A.V.; Chakraborty, G.S.; Banerjee, S.K. (2010). "Pharmacognostic studies of potential herb – *Tridax procumbens* Linn.". *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 1(9): 58-62.