

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**“Establecimiento de los patrones de identidad farmacognóstica de
Neurolaena lobata (L.) R. Br. ex Cass a partir de las características
anatómicas de seis poblaciones silvestres”**

Nathalia Granados Dieseldorff
Bióloga

Guatemala, Noviembre de 2007

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**“Establecimiento de los patrones de identidad farmacognóstica de
Neurolaena lobata (L.) R. Br. ex Cass a partir de las características
anatómicas de seis poblaciones silvestres”**

INFORME DE TESIS

Presentado por
Nathalia Granados Dieseldorff
Para optar al título de
Bióloga

Guatemala, Noviembre de 2007

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Mariesmeralda Arriaga Monterroso	Vocal IV
Br. José Juan Vega Pérez	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

Por su valiosa colaboración y orientación, agradezco a:

M. Sc. Ana Carolina Rosales de Zea

Ing. Agr. Jorge Mario Vargas

Licda. Roselvira Barillas de Klee

Lic. Armando Cáceres

Por su gran ayuda en el trabajo de laboratorio, agradezco a:

Tec. Vilma Ramírez Cervantes y al laboratorio del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, USAC.

Laboratorio del Departamento de Botánica, Recursos Naturales Renovables y Conservación de la Escuela de Biología, USAC.

Por su apoyo en las colectas de campo, agradezco inmensamente a:

Guillermo López, Diego Juárez, Vicente Xol, Marlene de Granados, Salvador Granados, Luz María Castañeda, Jan Baumgarten, Armando Cáceres, David Granados y Santiago Pezzarossi.

Por su valiosa ayuda en los dibujos de la micrografía, agradezco mucho a:

Enrique Medina Santa Cruz

DEDICATORIA

A Dios: por permitirme estar aquí y lograr todo lo que he hecho hasta ahora.

A mi padre, Salvador Granados: por ser mi ejemplo de perseverancia y rectitud. Por toda su ayuda y su amor.

A mi madre, Marlene de Granados: por ser mi fiel e incondicional amiga. Por todo su amor y humildad.

A mis hermanos Pablo, Diego, David, Amrei y Diletta: por estar conmigo siempre. Por haber compartido mis logros y mis fracasos. Por todo ese amor y unión que nos caracteriza.

A mi esposo Guillermo López: por ser mi compañero fiel estos últimos años. Por enseñarme a amar incondicionalmente y por su ejemplo de humildad. Por enseñarme que la Fe mueve montañas y que a pesar de todos los obstáculos, se sale adelante siempre con la frente en alto.

Y en especial, dedico este trabajo de tesis a mi razón de vivir, mi hija **CAMILA**.

INDICE

	Pag.
1. Resumen	10
2. Introducción	11
3. Antecedentes	13
3.1 Estudios relacionados	13
3.2 Importancia del tema	13
3.3 Generalidades de la especie	14
3.3.1 Clasificación de la especie	14
3.3.2 Hábitat	14
3.3.3 Descripción botánica	15
3.3.4 Usos medicinales atribuidos	15
3.3.5 Farmacología experimental	15
3.3.6 Composición química	16
3.3.7 Farmacognosia	16
3.3.8 Indicaciones terapéuticas	17
3.3.9 Toxicidad	17
3.4 Normalización de droga cruda y plasticidad fenotípica en plantas	17
3.5 Elaboración de monografías herbolarias	18
3.5.1 Autenticación	18
3.5.2 Identidad	19
3.5.3 Características macroscópicas y microscópicas	19
3.5.4 Características organolépticas	19
3.5.5 Perfil cromatográfico	19
3.5.6 Reacciones de identificación	20
3.5.7 Pureza	20
3.5.7.1 Humedad	20
3.5.7.2 Material volátil	20
3.5.7.3 Cenizas	20
3.5.7.4 Constantes físicas	21

3.5.7.5 Materia extraña	21
3.5.7.6 Contaminación microbiana	21
3.5.7.7 Metales pesados	21
3.5.7.8 Residuos tóxicos	21
3.5.7.9 Radioactividad	21
3.5.8 Adulteración	22
3.5.9 Valoración	22
3.6 Técnicas para establecer los caracteres macro y microscópicos de identidad farmacognóstica de la droga cruda	23
3.6.1 Técnicas histológicas	23
3.6.2 Pruebas histoquímicas	30
3.6.3 Macroscopía	31
4. Justificación	32
5. Objetivos	33
5.1 General	33
5.2 Específicos	33
6. Materiales y Métodos	34
6.1 Universo y Población	34
6.2 Del área de procedencia del material	35
6.3 Análisis estadístico	36
6.4 Medios	36
6.5 Materiales y equipo	37
6.5.1 Equipo de colecta	37
6.5.2 Equipo para cortes histológicos	37
6.5.3 Materiales para técnicas histológicas	38
6.5.4 Cristalería	38
6.5.5 Reactivos	38
6.6 Técnicas	39
6.6.1 Colecta	39
6.6.2 Técnicas histológicas (Microscopía)	39
6.6.2.1 Cortes a mano alzada de la lámina	39

6.6.2.2 Cortes con micrótomo de la lámina	39
6.6.2.2.1 Fijación	39
6.6.2.2.2 Deshidratación	40
6.6.2.2.3 Clarificación	40
6.6.2.2.4 Infiltración	40
6.6.2.2.5 Inclusión-Formación del bloque	40
6.6.2.2.6 Cortes	40
6.6.2.2.7 Pegado	41
6.6.2.3 Metodología modificada de cortes en micrótomo del pecíolo	41
6.6.2.4 Técnica de semidiafanizado y diafanizado	42
6.6.2.5 Técnica de disociado débil	42
6.6.2.6 Micrometría	43
6.6.3 Macroscopía	43
6.6.4 Cartilla micrográfica	44
6.6.5 Pruebas histoquímicas	44
7. Resultados	46
7.1 Caracteres microscópicos de las seis poblaciones	46
7.2 Propuesta de descripción anatómica	48
7.3 Cartilla micrográfica	53
7.3 Metabolitos secundarios en los tejidos	58
8. Discusión de resultados	61
9. Conclusiones	66
10. Recomendaciones	68
11. Bibliografía citada	69
12. Bibliografía consultada	72
13. Anexos	73

INDICE DE CUADROS Y TABLAS

	Pag.
Cuadro 1: Tiempo de deshidratación de material vegetal	25
Cuadro 2: Tiempo de clarificación para el material vegetal	26
Cuadro 3: Tiempos para parafina y tipos de corte	26
Cuadro 4: Tiempos y diluciones para infiltración	27
Cuadro 5: Listado de reactivos y pruebas histoquímicas	31
Cuadro 6: Resumen de las poblaciones y variables estudiadas para cada población	34
Tabla1: Características anatómicas microscópicas de la droga cruda de los individuos provenientes de seis poblaciones silvestres	47

1. RESUMEN

Neurolaena lobata es una planta medicinal ampliamente distribuida y utilizada en Guatemala principalmente para el tratamiento contra la malaria. Esta especie cuenta con algunos estudios farmacológicos pero todavía no han sido publicados estudios sobre la pureza e identidad de su droga. La siguiente investigación presenta los resultados del estudio de treinta individuos de seis poblaciones silvestres a partir de los cuales se identificaron las características anatómicas microscópicas, macroscópicas, organolépticas y de histoquímica que caracterizan a la droga cruda de la especie que se refiere al o los órganos o partes vegetales ya desecados que contienen el efecto terapéutico en una planta. En esta especie la droga cruda está constituida por la hoja.

Este estudio contribuye a definir los patrones sobre los que debe basarse la identificación y control de calidad de *Neurolaena lobata* en los laboratorios fitofarmacéuticos. Asimismo, ayudará a los investigadores centroamericanos que están trabajando en la elaboración de las monografías herbolarias de las plantas medicinales de la región.

Los procedimientos estadísticos realizados (Análisis de Cluster y Análisis de Componentes Principales) no revelaron diferencias intra o inter poblacionales. Con esto se concluyó que la hoja de *N. lobata* posee estomas anomocíticos, epidermis uniestratificada con abundantes tricomas osteolados de textura verrucosa y escasos tricomas glandulares de tipo surculado. El mesófilo es mayoritariamente indiferenciado aunque puede presentar diferenciación (parénquima en empalizada y esponjoso). La vena central presenta haces vasculares colaterales. El pecíolo presenta varias capas de colénquima angular y haces vasculares en su mayoría colaterales aunque algunas veces se observaron anfibasales y bicolaterales. Las características organolépticas más relevantes incluyen hoja dividida en tres lóbulos diferenciados (trilobada), hojas quebradizas, sabor muy amargo, olor suave y moderadamente dulce. Las pruebas realizadas en corte transversal para alcaloides fueron positivas, aunque la literatura no los reporta para esta especie. Probablemente se debía a un falso positivo. Las pruebas para evidenciar taninos fueron abundantemente positivas. La prueba de aceites dio positiva. Todos estos caracteres fueron incluidos en el dibujo de la cartilla micrográfica de la hoja.

2. INTRODUCCIÓN

El conocimiento farmacognóstico de una droga vegetal que incluye la definición de los estándares de identidad, pureza y actividad farmacológica está lejos de ser completo para las plantas medicinales de Centroamérica. En Guatemala, la farmacología experimental con plantas medicinales es una línea de investigación bien desarrollada. No obstante, la identidad botánica y la pureza recién comienzan a implementarse desde el enfoque farmacéutico, con muy pocos estudios realizados a la fecha en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Es una meta común en la región la elaboración de monografías herbolarias con el fin de recopilar una farmacopea herbolaria centroamericana, lo cual exigirá varios años de trabajo para cada una de las especies más promisorias.

La planta que se seleccionó para la presente investigación fue *Neurolaena lobata*(L.) R. Br. Ex Cass, conocida como tres puntas o mano de lagarto. Es una hierba de la familia Asteraceae, ampliamente distribuida en nuestro país. Su propiedad antimalárica, según los estudios publicados, está dada por sesquiterpenlactonas que combaten la forma asexual del parásito *Plasmodium falciparum*, uno de los causantes de la malaria. Esta planta cuenta con estudios farmacológicos pero no con investigación sobre la pureza y la identidad de la droga cruda de la misma. Es importante mencionar que la malaria, también conocida como paludismo, es, después de la tuberculosis, la enfermedad parasitaria tropical más importante y contagiosa causante de más muertes. En Guatemala, el 80% del territorio está considerado como una zona de riesgo de la malaria (1).

Con este estudio se pretende definir los caracteres anatómicos microscópicos, macroscópicos y organolépticos que permitan identificar la droga cruda (órgano(s) o partes desecadas de una planta que poseen la propiedad farmacéutica) para hacer controles de calidad, crear una cartilla que permita identificar esos caracteres y los metabolitos que pueden identificarse con pruebas sencillas.

Para esto, la identidad de la droga cruda se hizo a nivel microscópico y macroscópico. Aún cuando se acostumbra hacer estudios con individuos de una sola población, éste se hizo con treinta individuos de seis poblaciones silvestres diferentes

para hacer más confiable los resultados evitando las variaciones de plasticidad fenotípica. Los métodos utilizados fueron cortes histológicos a mano alzada y micrótopo, disociados, diafanizados, exámenes macro y microscópicos y pruebas de histoquímica usados en laboratorios de control de calidad.

3. ANTECEDENTES

3.1 Estudios relacionados

Existe un solo estudio sobre las características de identidad farmacognóstica de *Neurolaena lobata* cuyo artículo científico aún no ha sido publicado. Éste fue realizado por un equipo internacional latinoamericano, uno de cuyos autores permitió consultar un borrador con los resultados principales. Los datos fueron obtenidos a partir de individuos de una sola población de la especie, colectados en nuestro país. El estudio trata de los caracteres de identidad y pureza de la droga cruda y presenta la descripción y micrografía para la especie (2).

En Guatemala, los estudios sobre las plantas medicinales que se distribuyen naturalmente en nuestro territorio han estado orientados principalmente a la farmacología y composición química de las drogas. No obstante, en los últimos cuatro años se ha visto la producción de investigaciones sobre la descripción botánica, principalmente a través del nuevo Programa de Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales (MUPLAM). Se han realizado a la fecha dos investigaciones que son:

- “Determinación de estándares de identidad y pureza de cuatro plantas medicinales comercializadas en Guatemala.” Paredes, M.E.; Rosales, C.; Cáceres, A.; Martínez, V.
- “Caracterización botánica y análisis del contenido mineral de *Smilax domingensis* Willd.” Cleaves, C.; Orozco, R.

Existe también una tesis de licenciatura denominada “Autenticación citohistológica de cuatro plantas medicinales nativas”. Rodríguez Hernández, C.M.

3.2 Importancia del tema

Actualmente, la utilización de medicina alternativa, donde las plantas medicinales son la base medular, ha tomado un nivel de importancia mayor que el que tuvo en el pasado, ya que esto incluye la incorporación de medicina natural en programas de salud a nivel mundial, principalmente en países desarrollados. Para esto, ha sido necesario establecer patrones reconocidos a nivel internacional, que aseguren la

calidad de las plantas medicinales, aplicando técnicas y métodos modernos y adecuados (3).

En las últimas décadas se han estado desarrollando estudios exhaustivos sobre las plantas medicinales más utilizadas, y toda esta información se ha ido recopilando en monografías y farmacopeas herbolarias que tienen como fin, definir los criterios de identidad y de calidad así como la información terapéutica correspondiente a la planta (3).

3.3 Generalidades de la especie

3.3.1 Clasificación de la especie (4, 5, 6)

Nombre Científico: *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass.

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae.

Sinonimias: *Conyza lobata* L., *Neurolaena lobata* var. *indivisa* Donn.-Sm. (4, 6), *Conyza symphytifolia* Mill., *Pulchea symphytifolia* (Mill) Gillis. (6)

Nombres comunes: tres puntas, mano de lagarto, capitana, contragavilana, gavilana, hierba amarga, quina. (4)

Parte utilizada (droga cruda): hojas

3.3.2 Hábitat: Se encuentra en lugares pantanosos o pequeños bosques húmedos. A veces puede encontrarse en bosques de encino. Comúnmente se encuentra como sucesión secundaria, muy a menudo en campos cultivados, a lo largo de la maleza que se encuentra alrededor de los riachuelos y laderas o a la orilla de las carreteras. La altitud en la que se distribuye es desde el nivel del mar hasta los 1400 msnm. En Guatemala se ha descrito para los departamentos de Alta Verapaz, Chiquimula, Escuintla, Izabal, Petén, El Progreso, Quetzaltenango, Retalhuleu, San Marcos, Santa Rosa y Suchitepéquez (4, 5). Se encuentra distribuida en toda América Central, comenzando desde el sur de México, pasando por Honduras, El Salvador y Panamá. También se encuentra reportada para las islas del Caribe, norte y noroeste de Suramérica. (7, 8, 9, 10, 11, 12)

3.3.3 Descripción botánica: Hierba erecta, de 1-4 metros de altura, usualmente poco ramificada (anexo 1), los tallos son estriados, surcados (anexo 2), densamente pubescentes cuando son jóvenes; hojas cortamente pecioladas o casi sésiles, casi glabras en el envés, filotaxia alterna, acuminadas o agudas en la base, de 5-30 cm. de largo, dentadas o serradas, escabroso-hirsutulosas en el haz, densamente y cortamente pilosas en el envés y generalmente velutinosas. Inflorescencias corimbo-paniculadas, cabezas numerosas, pediceladas, discoides, de aproximadamente 20 flores (anexo 3), involucros de 5-6 mm de altura, filarios tetra o penta seriados, oblongos, redondeados en el ápice, 1-3 nervados; más o menos pulverulentos, páleas lineares, obtusas, de 4-5 mm de largo, corolas amarillas a anaranjadas amarillentas, de aproximadamente 4 mm de largo, aquenios de color negro, esencialmente glabros, de aproximadamente 1.5 mm de largo, vilano uniseriado, con 30 o más cerdas de aproximadamente 4 mm de largo, amarillento. (7)

3.3.4 Usos medicinales atribuidos: La infusión amarga de hojas es administrada por vía oral para el tratamiento de afecciones gastrointestinales (diarrea, cólicos), diabetes, malaria y otros procesos febriles, gonorrea e inflamaciones. Las hojas frescas machacadas se aplican tópicamente en áreas de comezón, el jugo es aplicado en la piel como repelente de garrapatas; la infusión se aplica para sanar diversos tipos de lesiones y úlceras. Se le atribuye propiedad antibiótica, antimalárica, aperitiva, carminativa, diurética, espasmolítica, febrífuga, hipoglicémica, hipotensora y tónica. (4, 10, 11, 12). Es utilizada también para curar dolores gástricos y úlceras (13)

3.3.5 Farmacología experimental: Estudios antimicrobianos demuestran que la tintura de hojas es activa contra bacterias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella aureus*, *Salmonella pyogenes*, *Salmonella typhi*) con CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para *Salmonella aureus* y *Salmonella typhi* de 1 mg/ml; es inactiva contra *Salmonella flexneri* y hongos levaduriformes (*Candida albicans*, *Candida neoformans*) y filamentosos (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum*). La infusión de hojas es activa *in vitro* contra esquizontes de *Plasmodium bergheii* (750 mg/kg), similar a la droga de

referencia (artemisina, 50 mg/kg). Los extractos alcohólicos ($DE_{50} = 25$ mg/ml) son activos contra epimastigotes *in vitro* y contra tripomastigotes *in vitro* e *in vivo* de *Trypanosoma cruzi*. (4, 10).

El extracto de hojas secas contiene un terpenoide que es inactivo como agente antitumoral. El extracto alcohólico de hojas produce una disminución estadísticamente significativa de los niveles de azúcar en el ratón. (4)

Recientemente se ha demostrado la actividad de las principales sesquiterpenlactonas para combatir la forma asexual del parásito de la malaria (*Plasmodium falciparum*) dentro de los eritrocitos sanguíneos, y contra dos líneas de cánceres humanos *in vitro*. Este importante grupo de metabolitos secundarios es conocido por tener un amplio rango de actividad en varios sistemas biológicos. En particular, presentan considerable actividad contra insectos. (7)

En un reciente estudio, también se pudo demostrar que el extracto etanólico de *N. lobata* posee una actividad potencial macro y micro filarial. (14)

Existe un estudio realizado en ratones el cual demuestra que el extracto de la hoja contiene propiedades hipoglicemiantes. (15)

3.3.6 Composición química: Las hojas y tallos contienen un principio amargo constituido por sesquiterpenlactonas (germacranólidos) derivados del timol, más 11 flavonoides: cinco derivados de quercetagenina, cuatro kampferoles y dos luteolinas. (4, 16)

3.3.7 Farmacognosia: El estándar de las hojas desecadas no debe contener más de 2% de sustancias orgánicas extrañas y por incineración no debe contener más del 10% de cenizas ni más de 4% de cenizas insolubles en ácido. (4)

Del extracto diclorometánico han sido aisladas varias sesquiterpenlactonas, particularmente neurolenina A y B; ambas moléculas fueron inactivas contra sarcoma-180 en ratas; aparentemente las variedades geoclimáticas muestran variabilidad intraespecífica en los patrones de sesquiterpenlactonas. Otras moléculas bioactivas son las lobatitas A y B. (4)

A la fecha, *Neurolaena lobata* no es oficial en ningún país, por lo que no se encuentra en las farmacopeas, sin embargo la comprobación preliminar de su

actividad antiprotozoaria es interesante. Se consumen preparados domésticos como infusión y tintura. (4)

3.3.8 Indicaciones terapéuticas: Por su actividad antiprotozoaria, antibacteriana y sudorífica, su uso oral está indicado en el tratamiento sintomático de la malaria, fiebre, diarrea y dolor de estómago; por su actividad hipoglicemiante puede contribuir al manejo de la diabetes. Se recomienda administrar 2-3 veces/día en dosis de 1-3 g en infusión o 1-2 ml de tintura 1:8 en etanol al 35%. Por su actividad antiprotozoaria y sudorífica puede combinarse con aceituno (*Simarouba glauca*), borraja (*Borago officinalis*), copalchi (*Croton guatemalensis*) y verbena (*Verbena litoralis*); por su actividad hipoglicémica puede combinarse con cundeamor (*Momordica charantia*), fenogreco (*Trigonella foenum-graecum*), hierba del toro (*Tridax procumbens*) y timboco (*Tecoma stans*). (4)

3.3.9 Toxicidad: Son pocos los estudios realizados para determinar su toxicidad pero se ha demostrado que los tusilágenos que contiene no provocan ninguna toxicidad, ni aguda ni crónica incluso en cantidades elevadas, y no se encontraron pirrolizidinas tóxicas que posean dobles enlaces $\Delta 1, 2$. Por esta razón se considera que el uso de *N. lobata* como planta medicinal, no debería causar ningún efecto tóxico a causa de la toma de estos compuestos. (8)

Según un estudio realizado con el test de Irwin, el uso de *N. lobata* tiene muy poco o no tiene efecto en los signos del comportamiento, neurológico o autonómico. (17)

3.4 Normalización de droga cruda y plasticidad fenotípica en plantas

Droga cruda se refiere a las drogas vegetales o animales que han recibido sólo el proceso de recolección y secado, para estar en condiciones de ser almacenadas (3). La normalización de la droga cruda se refiere a elegirla por su interés comercial y terapéutico e incluye la definición de las características morfológicas, anatómicas, químicas y biológicas, que aseguran la calidad de las mismas. Para una buena normalización hay que considerar la selección de muestras de diferentes procedencias, ya que las drogas, por su naturaleza, pueden variar según el lugar de origen y forma de recolección (18). Debido a la plasticidad fenotípica, que es la capacidad de un

organismo de producir fenotipos diferentes en respuesta a cambios en el ambiente, las variaciones pueden ser a nivel del individuo, a nivel de la población y a nivel de la especie. Todo depende del tiempo y de la magnitud del cambio ambiental. (19)

El desarrollo y mantenimiento del aseguramiento de la calidad para las hierbas como drogas no es un fenómeno nuevo. Los farmacéuticos y botánicos italianos, desde los años 1400, hicieron lo que se considera hoy en día la primera farmacopea moderna, que es el libro oficial que cada país redacta y que es norma legal para la preparación y dispensación de los medicamentos. Todo esto lo hicieron con el fin de disminuir el error potencial en la identificación y la adulteración que podía existir en la droga. El amplio uso internacional de los medicamentos herbarios en las últimas décadas ha generado varios intentos para desarrollar farmacopeas que recopilan las monografías herbolarias (monografía significa tratado sobre un solo tema u objeto, usualmente, en este caso, un género o una especie particular de planta) con el fin de definir los criterios de identidad y de calidad así como la información terapéutica correspondiente, (20)

3.5 Elaboración de monografías herbolarias

Existen distintos tipos de monografías. En este caso se usará el modelo de la Farmacopea Europea. Los parámetros a incluir en estas monografías son los siguientes, de los cuales se tomarán en cuenta los incisos del 3.5.1 al 3.5.4.

3.5.1 Autenticación: Definición clara y científica. Las drogas vegetales son generalmente plantas enteras, fragmentadas o picadas, partes de plantas, algas, hongos, líquenes en un estado no procesado, generalmente en forma seca pero algunas veces fresca. De la planta debe establecerse la parte usada: tallo aéreo, rizoma, raíz, hoja, flor, parte de flores, inflorescencias, fruto, semilla, exudados. Las especificaciones se describen en el idioma nativo y en latín. Las especies vegetales utilizadas deben estar designadas por su nombre científico (en latín). La identificación se completa con el nombre de la familia botánica a la cual pertenece la planta. Además se debe indicar la cantidad estipulada de principio activo que la droga debe contener. (21, 22, 23)

3.5.2 Identidad: Se refiere a la confirmación de la identidad del material vegetal. Puede hacerse por comparación del material con los especímenes de herbario de la empresa que manufactura el producto. En otros casos, la confirmación puede hacerse en la inspección visual o microscópica del material vegetal comparándolo con las monografías de la farmacopea o con literatura de estándares. (24)

3.5.3 Características macro y microscópicas: El examen microscópico o análisis micrográfico a veces revela detalles significativos, no sólo para confirmar la identidad de la planta sino también para identificar la naturaleza de adulterantes mezclados, intencionalmente o no, en la droga. En muchas drogas, la descripción microscópica de la disposición característica de los diferentes tipos de tejidos, estomas, tricomas y/o fibras, brinda un medio valioso que asegura la calidad de la droga. En caso de drogas que contienen un número constante de algunos parámetros, por ejemplo granos de almidón, fibras o tricomas, la microscopía puede ser usada para propósitos cuantitativos. (24, 25, 26) Las características macroscópicas comprenden la forma, el tamaño, el color, la textura, los aspectos de fractura y características de la superficie cortada. (23)

3.5.4 Características organolépticas: Se refiere a la evaluación de la droga por los sentidos del olor, sabor, tacto y a veces el sonido o chasquido que produce la fractura que pueden servir para las evaluaciones del material vegetal. El color de la droga puede revelar información necesaria y valiosa sobre el manejo post cosecha. Las plantas secadas rápida y muy cuidadosamente retienen su color y frescura mientras que el follaje con sobresecado lo pone quebradizo. (24)

3.5.5 Perfil cromatográfico: Si se utiliza un procedimiento analítico especial, la droga cruda de un vegetal desconocido puede ser identificada o asignada a un grupo de sus constituyentes básicos. El análisis se lleva a cabo para los constituyentes activos principales siguientes: alcaloides, flavonoides, antraglicósidos, saponinas, arbutina, aceites esenciales, glicósidos

cardiotónicos, cumarinas y ácidos fenolcarboxílicos, principios amargos y valepotriatos. (25)

3.5.6 Reacciones de identificación: Las reacciones sólo se utilizan si las mismas son particularmente características de los constituyentes presentes en el material vegetal, y deben permitir una rápida identificación. Existen varios tipos de reacciones tales como: ionización, formación de sales de oxonio coloreadas, formación de quelatos y la formación de complejos coloreados luego de la adición de aniones inorgánicos polivalentes (histoquímica). (23)

3.5.7 Pureza: Las drogas vegetales deberán cumplir con una serie de estándares para garantizar su calidad. El análisis de pureza nos permite determinar la presencia de contaminantes químicos, biológicos y físicos. (25).

3.5.7.1 Humedad: El contenido de humedad varía según el órgano de la planta y según la especie. Las farmacopeas permiten cierto porcentaje de humedad que generalmente no puede ser mayor al 10%. (25)

3.5.7.2 Material volátil: La determinación de aceites esenciales en la droga se realiza por la destilación con agua. El contenido de aceite esencial puede ser un parámetro importante en la calidad del producto. (23, 24)

3.5.7.3 Cenizas: El porcentaje de ceniza producida es indicador del cuidado durante el procesamiento del material vegetal, especialmente para partes subterráneas. Las cenizas totales, cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en ácido suelen determinarse por procedimientos estándar. Las cenizas insolubles en ácido constituyen una fracción de las cenizas totales que no se solubiliza en ácido clorhídrico, el cual disuelve varias sustancias como el carbonato de calcio y los cloruros de metales alcalinos. Lo que queda como ceniza insoluble en ácido comprende casi totalmente sílice procedente de la tierra adherida a la droga o arena. (24, 25)

3.5.7.4 Constantes físicas: Esto se refiere a densidad, rotación óptica, viscosidad, índice de refracción, etc. Estas constantes son especialmente útiles para identificar aceites y grasas, oleorresinas, bálsamos y sustancias similares (21)

3.5.7.5 Materia extraña: Los elementos extraños se definen como materia que no es de origen animal ni vegetal. Cualquier material o parte vegetal que no sea reconocido oficialmente, constituye materia extraña. Con respecto al material inactivo u otras partes de la misma planta, las farmacopeas especifican los límites permitidos. El material que contiene excreta de animales e insectos o moho tiene que ser rechazado. (22, 24)

3.5.7.6 Contaminación microbiana: Los límites microbiológicos establecidos para los alimentos son aplicados a las drogas vegetales, aun cuando la cantidad de droga consumida no equivale a la cantidad de los comestibles. Se justifican los límites para bacterias patógenas y aflatoxinas. (24, 25)

3.5.7.7 Metales pesados: La contaminación del material vegetal medicinal con arsénico, cadmio y plomo puede resultar de la colecta del material en regiones contaminadas. Los límites de estos metales deben estar en las especificaciones de cada monografía. (25)

3.5.7.8 Residuos tóxicos: La contaminación de las plantas silvestres por residuos tóxicos puede resultar por la contaminación del suelo o del agua del área en que crecen, ya que de otro modo no estarían contaminadas. Existen actualmente métodos altamente sensibles para evaluar la presencia de residuos de pesticidas. (24, 25)

3.5.7.9 Radioactividad: La contaminación radioactiva puede ocurrir como resultado de efluentes industriales, y en estos casos hay que seguir los lineamientos de guía de la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés). (25)

3.5.8 Adulteración: En general existe adulteración cuando una materia prima vegetal escasea o cuando su precio es anormalmente alto. Los diferentes tipos de adulteraciones que se pueden encontrar son: manufactura de sucedáneos, sustitución por variedades comerciales de inferior calidad, sustitución por drogas crudas ya vencidas, sustitución por materias primas naturales de aspecto similar pero más baratas, adición de material sin valor y más pesados, adición de productos sintéticos para reforzar productos inferiores, presencia de materia adventicia o adulteración de materiales pulverizados. Existen diversos métodos para detectar las adulteraciones, entre los cuales pueden citarse: macromorfología, micromorfología, histoquímica, mediciones lineales microscópicas, luz ultravioleta, ensayos químicos cuantitativos y solubilidades. (27)

3.5.9 Valoración: Consiste en el análisis de los componentes activos o de marcadores. La calidad de la droga vegetal depende del contenido de los constituyentes activos. Cuando éstos se conocen con certeza, debe analizarse la cantidad de los mismos, y cuando la información es incompleta, cualquier componente de la planta es usado como referencia para la evaluación del material vegetal (25). Los métodos para determinar el contenido de principio activo en la droga cruda incluyen métodos cromatográficos (cromatografía en capa fina (TLC) la más utilizada por sus resultados rápidos y positivos en drogas vegetales, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y la cromatografía gaseosa (GC)). Los métodos espectrofotométricos incluyen espectrofotometría ultravioleta, espectrofotometría infrarroja, fluorometría y espectrofotometría por resonancia magnética nuclear (NMR). Últimamente se ha estado usando la combinación de los dos métodos (espectrofotometría y cromatografía) y los radioinmunoensayos, que son bastante sensibles y muy específicos. (24)

3.6 Técnicas para establecer los caracteres macro y microscópicos de identidad farmacognóstica de la droga cruda

3.6.1 Técnicas histológicas

Cortes a mano alzada

Los cortes a mano alzada pueden hacerse directamente sin ningún soporte cuando el material es lo suficientemente consistente y duro para hacerlo. En cambio, si el material es muy fino se toma un trozo de duroport, hinojo o raíz de zanahoria de aproximadamente 2 cm de longitud. Luego se secciona longitudinalmente por el centro a manera de obtener dos mitades iguales. Dentro de las dos mitades se coloca la porción del órgano de la planta a estudiar. Se juntan las dos mitades, se sostienen fuertemente con una mano y con la otra se toma la hoja de afeitar y se hacen los cortes ya acondicionando la mano de manera perpendicular y mojando la superficie de corte con agua. (28)

Cortes en Micrótopo

Toma y registro de material:

El material a incluir debe ser seleccionado con esmero ya que de lo contrario los errores se dan desde la fase inicial. Del material a estudiar se toma solamente una pequeña parte, por ejemplo una porción de pecíolo y de hoja y se incluyen separadamente. Los cambios post - mortum deben ser evitados y para ello el tiempo que transcurre desde la toma del material hasta que éste se coloca en el fijador debe ser lo más corto posible. (28, 29, 30)

Fijación

Como las preparaciones frescas sufren grandes alteraciones al poco tiempo de haber sido tomado el material, corresponde a la técnica histológica impedir el desarrollo de estos procesos post - mortum, fijando los tejidos en un estado lo más semejante posible al que poseía cuando estaba vivo. Para este objeto se utiliza, en la mayor parte de los casos, los llamados líquidos fijadores. Al examinar preparaciones fijas se debe tener presente que ninguno de los líquidos hasta ahora conocidos es capaz de conservar la estructura de los tejidos en el mismo estado que cuando éstos estaban vivos. (29, 31)

En la fijación es de gran importancia el poder de difusión del líquido fijador ya que la mayoría de las células periféricas se fijan más rápido y mejor que las centrales. Como consecuencia de ello, en los tejidos fijados hay siempre un gradiente de fijación que depende del poder de penetración del fijador y de su dilución progresiva en los líquidos celulares. Si el líquido fijador penetra lentamente durante la fijación, el material a fijar deberá ser dividido en fragmentos pequeños. Para facilitar la acción del fijador sobre todas las caras de la pieza, se cubre el fondo del recipiente donde se hace la fijación con papel filtro. (31)

La duración de la fijación varía según la composición del líquido y la naturaleza del material, así como también en atención a la clase de observaciones que se pretende llevar a cabo. Frecuentemente la fijación se hace lentamente, por lo cual no se deben sacar las piezas del líquido demasiado pronto; pero tampoco conviene prolongar indefinidamente la acción del fijador, pues muchos líquidos, con el tiempo, hacen al material quebradizo, dificultan su coloración ulterior, lo maceran, contraen o hinchan. La fijación se debe realizar en frascos cerrados y el volumen del líquido fijador no debe ser demasiado pequeño sino 50-100 veces por lo menos mayor que el de la pieza que se trata de fijar. (31)

No existe ningún líquido fijador con el cual puedan conservarse igualmente bien todos los elementos integrantes de las células y de los tejidos. Por esta razón es necesario seleccionar el fijador adecuado a los objetivos de trabajo. (31)

El fijador que más se usa en plantas es la combinación de formol, ácido acético y alcohol FAA

Alcohol etílico de 96 °	50 cc
Ácido acético glacial	5 cc
Formol	10 cc
Agua destilada	35 cc

Este reactivo fijador se emplea para cualquier material con fines de estudios anatómicos y morfológicos. Es inapropiado para estudios cariológicos. El mínimo tiempo de fijación es de 18 horas. Es empleado como conservador de piezas vegetales. (29, 30, 31)

Lavado

Es preciso casi siempre lavar la pieza fijada después de haberla desembarazado del exceso de líquido fijador. El tratamiento posterior a la fijación variará según el fijador utilizado y el propósito que nos haya guiado al practicar la fijación. El lavado se realiza de ordinario mediante agua o alcohol. (29, 31)

Deshidratación

a. Deshidratación con etanol - Clarificación con xilol

Cuando el material que proviene del fijador se ha lavado con agua, se procede a deshidratar con etanol de graduaciones ascendentes. De acuerdo al cuadro 1, los tiempos a emplear en cada reactivo varían según el material con que se esté trabajando. (31)

Cuadro 1: Tiempo de deshidratación de material vegetal

Callos –Apices	Material adulto
Alcohol 3°, 5°, 10°, 25°, 50°, ½ hr c/u	Alcohol 3°, 5°, 10°, 25°, 50° 12 hrs
Alcohol 70° 1 hr	Alcohol 70° 24 hrs
Alcohol 96° 1 hr	Alcohol 96° 24 hrs
Alcohol 96° 1 hr	Alcohol 96° 24 hrs
Alcohol 100° ½ hr	Alcohol 100° 12 hrs
Alcohol 100° ½ hr	Alcohol 100° 12 hrs

Fuente: Gattuso, M. 2006. Técnicas para cortes en micrótopo de rotación. Documento Técnico.

Clarificación

Como el alcohol y la parafina son insolubles, forman una emulsión; por lo tanto se hace necesario reemplazar el alcohol por un solvente que sea miscible con el alcohol y solubilice a la parafina; ese solvente puede ser xilol, toluol o benceno. Cuando el alcohol ha sido totalmente reemplazado por el xilol, el material será transparente y se dice que está “clarificado”. Los tiempos en cada solvente varían según el material (ver cuadro 2). (31)

Cuadro 2: Tiempo de clarificación para el material vegetal

Callos – Ápices	Material adulto
3 partes de alcohol - 1 parte de xilol 1 hr	3 partes alcohol - 1 parte de xilol 2 a 4 hrs
1 parte de alcohol – 1 parte de xilol ½ hr	1 parte de alcohol - 1 parte de xilol 2 a 4 hrs
1 parte de alcohol – 3 partes de xilol ½ hr	1 parte de alcohol - 3 partes de xilol 2 a 4 hrs
Xilol puro ½ hr	Xilol puro 1 hr
Xilol puro ½ hr	Xilol puro 1 hr
Xilo puro ½ hr a toda la noche	Xilol puro Toda la noche

Fuente: Gattuso, M. 2006. Técnicas para cortes en micrótopo de rotación. Documento Técnico.

Infiltración

La infiltración o impregnación consiste en la lenta penetración de parafina fundida en los huecos intra y extracelulares inicialmente rellenos de agua. La finalidad última del proceso es proporcionar a la pieza anatómica homogeneidad y dureza suficiente para que se pueda obtener secciones finas de calidad. Aunque se puede emplear diferentes medios de inclusión, algunos de ellos hidrosolubles, el método de elección hoy día sigue siendo la inclusión en parafina. Los tipos de parafina y los tipos de cortes de cada tipo de parafina se presentan en el cuadro 3. (29, 31)

Cuadro 3: Tiempos para parafinas y tipos de cortes

Tipo de Parafina	Punto de Fusión	Grosor del Corte	Temperatura del bloque
Blanda	50-52 °C	Grueso	Frío (4 °C)
Blanda	53-55 °C	Grueso	Frío (4 °C)
Dura	56-58 °C	Fino	Frío (4 °C)
Dura	60-68 °C	Fino	Templada

Fuente: Gattuso, M. 2006. Técnicas para cortes en micrótopo de rotación. Documento Técnico.

Si el material a infiltrar se encuentra en condiciones de ser impregnado, se vuelca la mitad del xilol puro del frasco que contiene el material y se agrega igual cantidad de parafina pura fundida. Se deja destapado el frasco dentro de la estufa durante el tiempo requerido. La infiltración debe realizarse en el menor tiempo posible para que no haya distorsión de los tejidos. La temperatura de la estufa debe ser 3-4 °C más alta que el punto de fusión de la parafina empleada. Las mezclas de xilol-parafina que se van desechando se vuelcan a un frasco ubicado próximo a la estufa. (29, 31)

- Infiltración luego del empleo del etanol - xilol

El pasaje del material desde el último xilol a la parafina de la infiltración es gradual, y de acuerdo al material, se emplea distintos tiempos en las distintas mezclas de infiltración. Éstos se presentan en el cuadro 4. (31)

Cuadro 4: Tiempos y diluciones para infiltración

Callos y ápices	Material adulto
1 parte xilol – 1 parte parafina	1 parte xilol – 1 parte parafina
1er cambio parafina pura 2hrs	1er cambio parafina pura 2-4hrs
2ndo cambio a parafina pura toda la noche	2ndo cambio a parafina pura toda la noche
3er cambio a parafina pura ½ hr	3er cambio a parafina pura 1 hr

Fuente: Gattuso, M. 2006. Técnicas para cortes en micrótopo de rotación. Documento Técnico.

Inclusión - Formación del bloque

Este proceso consiste en la obtención de un bloque sólido de parafina con tejido vegetal incluido, mediante un enfriamiento lento a 10-15 °C (temperaturas más bajas producirían un efecto brusco de enfriamiento que puede llevar a la fractura de bloque por contracción). Es necesario obtener un bloque fácil de manejar, de dureza homogénea, plasticidad y elasticidad adecuadas. (29, 31)

Se utiliza frecuentemente cajas o moldes confeccionados con papel bond grueso. Para hacer la inclusión se procede de la siguiente forma: se vierte cuidadosamente todo el contenido del frasco (parafina fundida y el material), en el molde, evitando la producción de burbujas de aire. Después, con ayuda de una aguja caliente se procede a orientar el material, es decir, colocarlo en la posición que convenga según la dirección en que ulteriormente ha de ser seccionado. Una vez orientado el objeto se aguarda a que en la superficie de la parafina se forme una

película sólida, cuya producción se puede acelerar soplando sobre ella. Después se toma el molde y estando éste en posición horizontal, se introduce el conjunto en agua fría. El agua debe cubrir rápidamente la superficie del bloque y al mismo tiempo todos los lados. Al cabo de quince minutos aproximadamente queda el bloque completamente solidificado y se puede desprender fácilmente del molde. (29, 31)

Cortes

Los tacos o bloques de material incluido en parafina se cortan con el micrótopo rotatorio o Minot, pudiéndose obtener tiras de cortes seriados. Para poder realizar los cortes se debe fijar el bloque al soporte del micrótopo; para ello se talla el bloque en forma de prisma, quitando, de cinco de sus caras, la parafina superflua, luego con una espátula metálica caliente se pone un poco de parafina fundida sobre el soporte del micrótopo, y antes de que se solidifique se aprieta sobre ella el bloque de parafina, ablandando de antemano con una espátula caliente, la cara del prisma que había quedado sin tallar. (29, 30, 31)

A continuación se ablandan también ligeramente con la espátula caliente las caras laterales del bloque y se sumerge todo en agua fría. Si el bloque fue guardado durante un largo período de tiempo, es necesario, antes de fijarlo al soporte del micrótopo, remojar por lo menos un día en una solución al 5% de glicerina en alcohol de 70°. (31)

Se lleva el soporte con el taco al micrótopo y se orienta de tal manera que la superficie de corte quede paralela al plano de la cuchilla. Al colocarse ésta se le da una inclinación aproximada de 8° con respecto a la vertical, además el borde inferior del bloque de parafina debe quedar paralelo al filo de la cuchilla. Luego se corre la cuchilla hasta que esté muy próxima de la cara a cortar. (29, 30, 31)

El grosor de los cortes varía entre 7 y 15 micrones, debiendo observarse los cortes con el microscopio de menor aumento a los fines de comprobar la perfecta orientación y el adecuado grosor. Se procede a cortar y a medida que se forma la tira de parafina, se la sostiene con un pincel y cuando tiene una longitud conveniente se la coloca sobre una bandeja negra. La tira tiene dos caras: una brillante y otra opaca, la primera ha de colocarse siempre hacia abajo, que es la posición que llevará en el porta objeto. (29, 30, 31)

Pegado

El pegado de los cortes al portaobjetos es una operación que consiste en los siguientes pasos: se toman los portaobjetos bien desengrasados que estarán en un frasco con alcohol de 80° y se secan. Sobre cada portaobjeto se coloca una gota de albúmina de Mayer y se la extiende, dejando un espacio en un extremo para colocar la etiqueta, se cubre con agua destilada tibia (40°C), luego se corta la tira de cortes con una aguja u hoja de afeitar, se pincha con una aguja la tira de cortes y se coloca en el agua tibia con el lado brillante hacia abajo; la parafina se extiende y los cortes se arreglan para que no queden pliegues ni superposiciones. (31)

Una vez logrado el paso anterior se vuelca el exceso de agua, se presiona el portaobjeto sobre un papel de filtro y se coloca en una caja de preparados, estas cajas se llevan a una estufa a 35°-40° durante 1-2 días, pasado este tiempo se puede proceder a desparafinar y colorear. El número de secciones o cortes que se van a pegar en cada portaobjeto varía con la naturaleza del material y con el objetivo del trabajo. (31)

Después de pegar los cortes se dejan en estufa a 42 ° C durante 48 horas, luego se desparafina y se colorea. (31)

Técnica de semidiafanizado

Esta técnica se utiliza en hojas delgadas. El resultado es la aclaración o eliminación completa de cualquier tipo de plastidio para poder observar de manera más clara las estructuras epidérmicas que presenta la hoja. Dentro de estas estructuras se puede mencionar las células normales, así como estomas, tricomas, etc. Las mezclas para este procedimiento se hacen con alcohol al 96% e hidróxido de potasio (KOH) (ver Metodología).

Técnica de diafanizado

Al igual que la técnica de semidiafanizado, ésta se utiliza para observar estructuras de la epidermis en hoja, pero a diferencia del semidiafanizado, esta técnica se utiliza para hojas más gruesas, o coriáceas. Para esto se utiliza alcohol al 96%, hidróxido de sodio (NaOH), cloro comercial e hidrato de cloral (ver Metodología).

Técnica de disociado débil

Se utiliza para hojas, tallos herbáceos y cortezas comerciales y su fin es disgregar o separar los tejidos de un órgano vegetal específico y así poder observar por separado las células y estructuras que lo conforman. Se utiliza hidróxido de sodio (NaOH).

Determinación del índice de estomas (28)

El índice de estomas es una constante dentro de ciertos límites que permite la caracterización de hojas por comparación con testigos o valores ya tabulados. Se procede de la siguiente manera: Se toman láminas fijas de hojas ya diafanizadas, cuidando que la epidermis inferior quede orientada hacia arriba. Se observa con un microscopio equipado con tubo de dibujo. Se dibuja en el papel el área observada de 2 mm de lado utilizando el micrómetro objetivo. Se dibuja dentro de esa área una cruz por cada célula epidérmica y un círculo por cada estoma y el índice se saca con la fórmula $I = (S \times 100) / (E + S)$, donde I es el índice de estomas, S el número de estomas en una superficie determinada de la hoja y E el número total de células epidérmicas en la misma área (incluyendo los tricomas que pudieran aparecer).

Micrometría (28)

Este método es utilizado para realizar mediciones de órganos o estructuras a nivel microscópico, como por ejemplo largo y ancho de tricomas, tamaño de células, etc. Se utiliza para tal objeto un ocular micrométrico y un micrómetro objetivo, además del microscopio. El micrómetro ocular común generalmente es de 8X con una escala entre las dos lentes. En dicha escala, 5 mm están divididos en 50 partes iguales, y el valor es arbitrario, pues depende del aumento que se emplea, o sea que variable para cada objetivo del microscopio. La escala constituye el ocular micrométrico. El micrómetro objetivo es un portaobjetos provisto de una escala grabada en la cual 1 mm está dividido en 100 partes. Cada parte o división es de 10 micras.

3.6.2 Pruebas histoquímicas (28)

Las pruebas histoquímicas pueden realizarse ya sea con cortes transversales del tejido a mano alzada y frescos o también con la preparación de infusiones de la droga curda. Sirven para evidenciar la presencia de un metabolito secundario en un

tejido vegetal. A continuación se presenta el cuadro 5 con reactivos y con qué metabolito secundario reaccionan.

Cuadro 5: Listado de reactivos y pruebas histoquímicas

Reactivo	Prueba
Dragendorff	Alcaloides
Sulfato Férrico	Taninos
Sudán IV	Aceites y grasas
Fluoroglucina	Lignina
Azul de Cresil	Mucílagos
Acetato Cúprico	Cristales de oxalato de calcio

Fuente: Gattuso, A.M y Gattuso, S.J. 1999. Manual de Procedimientos para el Análisis de Drogas en Polvo. UNR Editora. CYTED. Argentina.

3.6.3 Macroscopía

El examen macroscópico da detalles concernientes a la descripción, biometría y organolepsia de la droga cruda. La inspección visual es el medio más simple y rápido por medio del cual se puede establecer la identidad, pureza y calidad posibles. Se basa en la forma, tamaño, color, características de la superficie, textura, características de la fractura y apariencia de la superficie de fractura. (32)

4. JUSTIFICACION

A pesar de que Guatemala es un país en el que tradicionalmente se usan las plantas medicinales para tratar diversas enfermedades, no contamos con parámetros de calidad claramente establecidos para producir y comercializar las materias primas y los productos fitofarmacéuticos preparados a partir de las decenas de especies nativas que han demostrado su potencial medicinal. Es indispensable entonces, que antes de que se autorice la comercialización de las plantas y sus productos, se realicen estudios que permitan definir estos parámetros para cada una de ellas.

Dada la importancia que representa la búsqueda de soluciones para reducir la incidencia de la malaria en nuestro país y dado el avance en los estudios farmacológicos y fitoquímicos sobre la actividad antimalárica de *Neurolaena lobata*, en el presente estudio se pretende cubrir los vacíos existentes en la definición de los parámetros de calidad, aunque solamente en el aspecto de la identidad de la droga cruda de la especie. La descripción de las características anatómicas diagnósticas del material proveniente de seis poblaciones silvestres de la especie permitirán definir los parámetros de identidad farmacognóstica de la misma, lo que facilitará la posterior elaboración de la monografía farmacopéica correspondiente y el desarrollo de los exámenes de control de calidad de su materia prima y de los productos fitofarmacéuticos que a futuro se comercialicen para la planta.

5. OBJETIVOS

5.1 General:

Describir las características anatómicas diagnósticas de la droga cruda de seis poblaciones de *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass para definir los patrones de identidad con un enfoque farmacognóstico.

5.2 Específicos:

- ✓ Identificar las características anatómicas (macroscópicas, microscópicas y organolépticas) distintivas en hojas de seis poblaciones de *N. lobata* que permitan la correcta identificación botánica de la droga de la especie.
- ✓ Diseñar una cartilla micrográfica para la especie que reúna los caracteres diagnósticos para la correcta identificación de la droga cruda bajo estudio.
- ✓ Identificar y comparar la presencia de principios activos de la droga cruda de cada población utilizando pruebas histoquímicas.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Universo y Población

Se usaron hojas de 30 individuos de *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass. provenientes de poblaciones silvestres. En Guatemala, la especie se distribuye naturalmente en 11 departamentos y se escogieron 6 poblaciones en 6 departamentos ubicados en tres puntos cardinales del país (ver cuadro 6).

En cada población se escogieron 5 individuos (plantas) tomando en cuenta para su elección las siguientes características: estado vegetativo y hojas en diferentes edades de desarrollo sin enfermedades visibles (ver cuadro 6).

Las variables estudiadas en cada hoja se escogieron de acuerdo con Solís, *et al* (2005) quienes consideraron 31 caracteres útiles para identificar correctamente una droga cruda. A nivel microscópico se estudiaron 11 caracteres cualitativos y 10 cuantitativos y macroscópicamente se estudiaron 9 cualitativos y 1 cuantitativo (ver cuadro 6). (22)

Cuadro 6: Resumen de las poblaciones y variables estudiadas para cada población

Población	Número de Individuos	Muestras de cada individuo	Número de variables microscópicas		Número de variables macroscópicas		Total de variables tomadas por población
			Cualitativo	Cuantitativo	Cualitativo	Cuantitativo	
Izabal (Este)	5	2	11	10	9	1	310
Petén (Norte)	5	2	11	10	9	1	310
Alta Verapaz (Norte)	5	2	11	10	9	1	310
Retalhuleu (Suroeste)	5	2	11	10	9	1	310
Suchitepéquez (Sur)	5	2	11	10	9	1	310
Chiquimula (Este)	5	2	11	10	9	1	310
TOTAL							1860

Se enlistan a continuación las variables estudiadas en cada hoja:

Microscópicas

Cualitativas

1. Presencia de estomas en el haz.
2. Presencia de estomas en el envés.
3. Tipo de estomas del haz.
4. Tipo de estomas del envés.

5. Tipo de tricomas del haz.
6. Tipo de tricomas del envés.
7. Aspecto del parénquima esponjoso.
8. Forma de las células de la epidermis.
9. Tipo de haces vasculares.
10. Tipo de colénquima del pecíolo.
11. Tipo de haces vasculares del pecíolo.

Cuantitativas

1. Tamaño de tricomas del haz.
2. Tamaño de tricomas del envés.
3. Número de células que forman los tricomas del haz.
4. Número de células que forman los tricomas del envés.
5. Número de capas de parénquima en empalizada.
6. Número de capas de colénquima en el pecíolo.
7. Número de haces vasculares del pecíolo.

Macroscópicas

Cualitativas

1. Aspecto general (enteras, fragmentadas, pulverizadas)
2. Consistencia
3. Color
4. Forma
5. Olor
6. Sabor
7. Superficie de la lámina
8. Transparencia
9. Tipo de pecíolo

Cuantitativas

1. Tamaño

6.2 Del área de procedencia del material

La población de donde se tomó la muestra de la especie del departamento de Izabal se ubica en un terreno privado localizado en la playa denominada Campo Amor,

aproximadamente a un kilómetro del Río Quehueche, a 10 msnm. Las muestras de la población de Petén fueron tomadas a la orilla de la Laguna Sacnab, orientación norte, al oeste del sitio arqueológico Yaxhá-Naranjo, a 250 msnm. En cuanto a las muestras de la población de Chiquimula, éstas fueron tomadas a la orilla del Río Motagua, al norte de la cabecera municipal a 220 msnm. En el caso de las muestras de la población de Cobán, éstas fueron tomadas de la finca privada “La Flecha Cancuic”, en el municipio de Cobán, a una altura entre 400 y 600 msnm. La población de Retalhuleu se encontró sobre el camino que lleva a la reserva Tak´alik Ab´aj (500 msnm), aproximadamente a 7 km de Colomba Costa Cuca, Quetzaltenango. Por último, las muestras de la población de Suchitepéquez se tomaron en la “Ecoparcela El Cacaotal”, en Samayac, Suchitepéquez a unos 400 msnm.

6.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico para determinar si había o no diferencias inter e intra poblacionales fue un Análisis de Cluster y un Análisis de Componentes Principales. Estos análisis son para datos multivariados de exploración, es decir, sólo evidencian patrones, agrupando un grupo de variables. El coeficiente de similitud que se utilizó fue Distancia Eucladiana ya que se utiliza cuando las variables son mixtas (multiestado y doble estado). Con esto se construyeron matrices y se conformaron grupos de similitud para determinar si existían o no diferencias. (33)

6.4 Medios

Recursos humanos

- Investigadora: Nathalia Granados Dieseldorff
- Asesora: Licda. Carolina Rosales de Zea M. Sc. Departamento de Botánica, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- Revisor: Ing. Agrónomo Jorge Mario Vargas Ponce. Departamento de Botánica, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- Asesoría:
 - Lic. Armando Cáceres, Depto de Citohistología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
 - Licda. Roselvira Barillas. Departamento de Botánica, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

- Colaboradores para la fase de colecta:
 - Petén: Guillermo López y Diego Juárez.
 - Livingston: Vicente Xol, Marlene de Granados y Salvador Granados.
 - Chiquimula: Luz María Castañeda.
 - Cobán: Jan Baumgarten.
 - Suchitepéquez: Armando Cáceres
 - Retalhuleu: Guillermo López, David Granados y Salvador Granados
- Colaborador para la fase de cortes en micrótopo: Tec. Vilma Ramírez Cervantes
- Colaborador en la fase de dibujo de cartilla micrográfica: Enrique Medina Santa Cruz

Recursos de infraestructura

- Laboratorios del Departamento de Botánica, Escuela de Biología, USAC.
- Laboratorio del Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, USAC.

6.5. Materiales y equipo

6.5.1 Equipo de colecta:

- Bolsas plásticas
- Machete
- Tijera de podar
- Libreta de campo
- Lápiz
- Hielera
- Alcohol etílico al 96%
- Etiquetas autoadhesivas
- Etiquetas de identificación

6.5.2 Equipo para cortes histológicos:

- Micrótopo rotatorio equipado
- Refrigeradora
- Estufa
- Cajas o moldes para formar bloques de parafina
- Microscopio de luz

- Micrómetro objetivo
- Tubo de dibujo para microscopio

6.5.3 Material para técnicas histológicas

- Parafina
- Hielo
- Alcohol etílico a distintas concentraciones
- Merckoglass
- Gelatina glicerina
- Papel filtro
- Agua destilada
- Etanol
- Xilol
- Espátula de metal
- Pincel
- Agujas de disección
- Hojas de afeitar nuevas
- Cubreobjetos
- Portaobjetos
- Acido acético glacial

6.5.4 Cristalería

- Vasos de precipitar
- Varillas de vidrio
- Vidrios de reloj
- Cajas de Petri

6.5.5 Reactivos

- Hidróxido de potasio al 5%
- Hidróxido de sodio al 5%
- Hipoclorito de sodio al 50%
- Hidrato de cloral (2:5)
- Safranina al 1%
- Azul de toluidina

- Reactivo de Dragendorff
- Sudan III
- Sulfato férrico
- Fluoroglucina
- Azul de cresil
- Acetato cúprico

6.6. Técnicas

6.6.1 *Colecta*

En cada población se obtuvo con ayuda de tijeras de podar, muestras de ramas con diferentes estadios de hojas (nuevas, adultas). Se tomaron las ramas y se colocaron dentro de una bolsa grande y ésta, a su vez, dentro de una hielera. Las muestras fueron fijadas en FAA tan pronto fue posible. Las pruebas y técnicas que necesitaron realizarse con material en fresco (cortes para pruebas histoquímicas) se hicieron como máximo un día después de realizada la colecta.

6.6.2 *Técnicas histológicas (Microscopía)*

6.6.2.1 Cortes a mano alzada de la lámina

Las hojas de *Neurolaena lobata* son finas y blandas así que se utilizó duroport como soporte y portaobjetos para los cortes a mano alzada. Se tomó una hoja adulta y se cortó un cuadrado de aproximadamente 1.5 cm², tomado en cuenta dentro del corte la vena central. Luego, con una hoja de afeitar nueva, se procedió a realizar los cortes como se describieron en la sección 3.6.1.

6.6.2.2 Cortes en Micrótopo de la lámina

6.6.2.2.1 *Fijación*

Para esta parte se cortaron trozos de hoja de 2 cm², siempre tratando de incluir la vena central. También se cortaron secciones del pecíolo de la misma manera. Para cada individuo se preparó un frasco de vidrio de compota con una solución de FAA (formol, alcohol, ácido acético). Las muestras de cada individuo se colocaron dentro del frasco con el fijador y se quedaron por lo menos 24 horas dentro de la solución.

6.6.2.2.2 Deshidratación

Después de fijar el material se procedió a deshidratar las muestras vegetales con etanol a diferentes concentraciones, de manera gradual y ascendente, como se presenta en el cuadro 1.

6.6.2.2.3 Clarificación

Después de la deshidratación con etanol, fue necesario reemplazar el alcohol por una solución que solubilizara y que fuera miscible en parafina. Para esto se usó xilol y se hizo de la manera que presenta el cuadro 2.

6.6.2.2.4 Infiltración

Para esta parte se utilizó parafina dura en escamas con un punto de fusión de 55-58°C, especial para histología. Inicialmente se colocó una solución parafina-xilol, con las muestras vegetales. Luego las muestras fueron pasadas a parafina pura. El frasco se dejó destapado dentro de la estufa durante el tiempo requerido, como se presenta en el cuadro 4.

6.6.2.2.5 Inclusión - Formación del bloque

Se utilizaron moldes especiales de hule para hacer los bloques. La parafina se vertió cuidadosamente hasta llenar cada molde. Después, con ayuda de una pinza caliente, se procedió a disponer las piezas del material adentro de la parafina, orientándolas de manera que los cortes se ubicaran transversalmente. Luego se tomaron los moldes y estando éstos en posición horizontal, se introdujeron en una cámara fría. Por último se sacaron los cubos del molde y se pusieron sobre una bandeja de hielo para mantenerlos fríos para su corte.

6.6.2.2.6 Cortes

Cada bloque de parafina se colocó en el soporte del micrótopo, orientado de tal forma que los cortes de las muestras fueran transversales y que la superficie de corte quedara paralela al plano de la cuchilla. El grosor de los cortes fue entre los 15-20 micrones. Se procedió a cortar y a medida que se formaba la tira de parafina, se la sostenía con una pinza y cuando se lograba un corte se colocaba dentro de un baño de María con agua a 50°C.

6.6.2.2.7 Pegado

Se tomó un portaobjetos desengrasado. Sobre cada portaobjetos se colocó el corte y se fijó pasando el portaobjetos debajo de un mechero por 1-2 segundos. Los portaobjetos así preparados fueron colocados en una bandeja especial para guardarlos. Se desparafinaron dentro de la estufa durante 1-2 días. Luego se tiñeron con safranina 1% durante 50 minutos y se pasaron por alcohol etílico al 50, 70 y 96 %, durante un minuto cada uno. Cada corte se cubrió con un cubreobjetos que fue pegado con Merckoglass.

6.6.2.3 Metodología modificada de cortes en micrótopo para el pecíolo

La metodología utilizada para los cortes de pecíolo se basa en los mismos principios de fijación, deshidratación y aclaración que el método descrito anteriormente pero se utilizó una modificación de tiempos y materiales.

1. Se fijaron las muestras con FAA por 48 horas.
2. Se colocaron en un vaso de precipitar con alcohol isopropílico para deshidratarlas y se metieron en un horno graduado (56-66°C) en dos cambios de 1 hora cada uno.
3. Luego se clarificaron con 1 cambio de xilol, introduciendo las muestras durante media hora en el horno graduado.
4. Se embebieron las muestras en parafina durante 45 minutos, dentro del horno.
5. Las muestras se incluyeron en parafina para hacer los cortes permanentes.
6. Se hicieron los cortes con la ayuda de un micrótopo y se desparafinaron durante 20 minutos en un desparafinador eléctrico.
7. Luego se colocaron en 3 cambios de xilol y uno de alcohol isopropílico, de 5 minutos cada cambio.
8. Se hidrataron 10 minutos en agua corriente y se tiñeron con safranina al 1%, durante 45 minutos.
9. Se les eliminó el exceso de colorante en 2 cambios de alcohol isopropílico y se fijaron en xilol (anexo 4).
10. Se fijaron con Merckoglass (anexo 5).

6.6.2.2 Técnica de semidiafanizado y diafanizado

Debido a que las hojas de esta planta son grandes, sólo se utilizó secciones de la parte media de la hoja que cupieran en un portaobjetos. Después de seleccionado el material, se procedió a realizar una mezcla de las técnicas de semidiafanizado y diafanizado de la siguiente manera:

1. Las secciones de hojas fueron colocadas en un vaso de precipitar que contenía una mezcla de alcohol al 96% e hidróxido de potasio al 5% en partes iguales y se colocó en una estufa a 60°C durante media hora.
2. El material se sacó del vaso de precipitar, estilándolo lo mejor posible, pero sin lavarlo con agua para no dañar los trozos de hoja.
3. Se pasó el material con mucho cuidado a una caja de Petri que contenía hipoclorito de sodio al 50% y se dejó hasta que las secciones de hoja quedaron blanco-transparentes.
4. Se lavaron con agua destilada, hasta eliminar totalmente el hipoclorito de sodio.
5. Se colocaron en hidrato de cloral (2:5) durante 10-15 minutos como mínimo, hasta que se tornaron transparentes.
6. El material se coloreó con safranina al 1% y agua y se montó con gelatina-glicerina (anexo 6).
7. Las láminas fijas se observaron en un microscopio a aumentos de 40X y 100X, para ver detalles de estructuras como estomas, tricomas y células de la epidermis, tanto del haz como del envés de la hoja.

6.6.2.3 Técnica de disociado débil

1. Se utilizaron secciones de la parte media de la hoja y se cortaron finamente.
2. El material se colocó en una solución de hidróxido de sodio al 5% y se hirvió por 5 minutos.
3. Se lavó con agua destilada hasta que el líquido quedó limpio.
4. Se colocó una porción del material en el portaobjetos con la ayuda de un pincel o aguja histológica y se disgregó lo más que se pudo. (anexo 7)
5. El material se tiñó con safranina al 1% y agua y luego se montó con gelatina-glicerina.

6. Las láminas fijas se observaron al microscopio para notar detalles de estructuras y tejidos aislados de la hoja como lo son tricomas, células de la epidermis y células del mesófilo, así como elementos del sistema conductor y células de sostén, como el colénquima.

6.6.2.4 Micrometría

Se utilizó un micrómetro ocular común (10x), que se graduó con un micrómetro objetivo.

6.6.3 *Macroscopía*

Para esta parte se preparó el estándar de calidad, secando el material fresco y luego colocándolo en una bolsa de plástico bien sellada. Estando el material dentro de la bolsa, se procedió a fragmentar la droga cruda un poco y luego se analizó realizando las siguientes observaciones:

- Aspecto general: Observar y describir las características de las hojas fragmentadas. (22)
- Consistencia: Si eran duras, flexibles, coriáceas, membranáceas, papiráceas, carnosas o suculentas. (22)
- Color: Este carácter tiene un valor relativo para la diagnosis ya que depende del sistema de secado y conservación que se haya realizado. Es importante, si la hoja fue discolora, indicar qué color presentó en la cara ventral y la dorsal. (22)
Para esta parte se determinó el color de la muestra con la ayuda del Libro de Color Munsell de 1976.
- Forma: Si la hoja se encontraba entera, se observó el ápice, base, borde, contorno, nerviación, simetría, si poseía o no pecíolo, si era simple o compuesta, si llevaba anexos, etc. (22)
- Olor y sabor: Debido a que éstos son característicos de cada especie, se determinó si el olor era ligero, franco, fuerte o sin no había olor y luego se definió la sensación del olor que podía haber sido aromático, frutal, a viejo, a moho, rancio, fétido, etc. El sabor podía ser dulce, ácido, salado, amargo, etc. (22, 32)
- Superficie de la lámina: Por el tacto se determinó si era lisa, sedosa, áspera o tomentosa y por la visión, si era glabra, pubescente, rugosa, ondulada, hirsuta o verrucosa. (22)

- **Transparencia:** Algunas hojas pueden presentar puntos transparentes, relacionados con la estructura interna del órgano, por ejemplo la presencia de glándulas, idioblastos, cavidades secretoras, etc. (22)
- **Pecíolo:** se indicó si era estriado, liso, rugoso, piloso, alado, su forma de inserción, etc. (22)

6.6.4 *Cartilla micrográfica*

Después de haber observado todas las láminas fijas de cortes transversales, disociados y diafanizados, se procedió a seleccionar solamente las características que fueran comunes de la especie en general. Con esto se hizo una descripción completa de la droga cruda y se hicieron los dibujos de la microscopía con tinta china, de la manera más exacta y precisa, así como esquemas utilizando las claves de Metcalfe y Chalk (28).

6.6.5 *Pruebas histoquímicas*

Las pruebas histoquímicas fueron realizadas en tres cortes frescos a mano alzada de cada individuo de las 6 poblaciones. A continuación se presentan las pruebas que se realizaron.

Alcaloides: Se colocaron los cortes sobre el portaobjetos y se agregó una gota del reactivo de Dragendorff. Se dejó actuar durante unos minutos. Ante la presencia de alcaloides aparecería un precipitado color rojo ladrillo.

Grasas y Aceites: Se colocaron los cortes sobre el portaobjetos y se agregó una gota del reactivo Sudán III o IV. Se dejó actuar durante 10 minutos y se lavó rápidamente con alcohol al 70%. Las grasas y aceites debieron teñirse de color rojo así como la cutina y suberina.

Lignina: Se colocó el material sobre el portaobjetos y se agregó una gota de fluoroglucina. Se colocó el cubreobjetos y se flameó suavemente. Se retiró la llama y se colocó, por el borde del cubreobjetos, una gota de ácido clorhídrico al 25%. Con este procedimiento las paredes con lignina, se teñirían de rojo.

Taninos: Se colocaron los cortes sobre el portaobjetos, se agregó una gota de sulfato férrico y se dejó actuar de 2-3 minutos. Luego se lavó con agua destilada. Los taninos dan una coloración azul-verdosa.

Mucílagos: Se colocaron los cortes sobre el portaobjetos y se agregó una gota de azul de cresil al 1%. Los mucílagos darían una coloración azul Francia.

Oxalato de Calcio: Se colocaron los cortes en el portaobjetos, se agregó una gota de ácido clorhídrico. Los cristales de oxalato de calcio en contacto con el ácido hacen efervescencia.

Otro método utilizado para evidenciar la presencia de principios activos (taninos y alcaloides) fue el siguiente.

1. Se tomaron aproximadamente de 20 a 30 fragmentos de varias (3-5) hojas de cada individuo y se colocaron en un vaso de precipitar con agua.
1. Se llevaron a ebullición durante 2 minutos.
2. Luego de dejar enfriar el líquido, se tomaron 5 ml para colocarlos en varios tubos de ensayo.
3. Se agregó una gota de cada reactivo a cada tubo.
4. El reactivo de Dragendorff, en presencia de alcaloides formó un precipitado rojizo.
5. El reactivo de sulfato férrico, en presencia de taninos, presentó un cambio de coloración a verde oscuro, con presencia de precipitado.

Esto se repitió para los 5 individuos de cada una de las 6 poblaciones estudiadas.

7. RESULTADOS

7.1 Caracteres microscópicos de las seis poblaciones

Se evaluó a nivel microscópico la presencia y tipo de doce caracteres cualitativos en hojas de *N. lobata*. No se encontró diferencias inter poblacionales para los caracteres, y las diferencias intrapoblacionales no fueron estadísticamente significativas como para poder subdividir las poblaciones.

Caracteres cualitativos

En general se observó que las hojas de todas las poblaciones son anfiestomáticas, los estomas son anomocíticos en el haz y en el envés y los tricomas observados son pluricelulares de tipo osteolado. La epidermis de todos los individuos es uniestratificada y el mesófilo generalmente es indiferenciado aunque en algunos casos (individuo 1 de Suchitepéquez y 3 de Petén), existe diferenciación entre parénquima en empalizada y parénquima esponjoso (ver tabla 1).

Además, se observó que todos los individuos presentan los mismos tejidos y la misma distribución de ellos en el pecíolo, con capas de colénquima angular debajo de la epidermis. Se observaron variaciones en el tipo de haz vascular dentro del pecíolo ya que, como puede observarse en la tabla 1, las poblaciones estudiadas de Izabal, Retalhuleu y Alta Verapaz presentaron individuos con haces colaterales y anfibasales, en cambio, la población de Petén presentó solamente colaterales y la población de Chiquimula y Suchitepéquez presentaron colaterales, anfibasales y bicolaterales.

Caracteres cuantitativos

En cuanto a los caracteres cuantitativos, los análisis estadísticos que se llevaron a cabo con las 17 variables de cada individuo, muestran que no hay diferencias entre las poblaciones. Según las gráficas de los procedimientos (descriptivos) realizados, los grupos que se forman en el análisis de Cluster no tienen índices de similitud lo suficientemente altos como para ser tomados como diferentes poblaciones; más bien, se forman 3 grupos que poseen características similares (ver anexo 8).

Esto se confirma con el análisis de componentes principales ya que, como se observa en la gráfica del anexo 9, los únicos individuos que están fuera del 95% del área son los individuos 1 y 5 de Retalhuleu.

Se encontró que para los tricomas del haz existe una variación en el tamaño con un promedio de 220 micras y un rango que va desde las 70 hasta las 550 micras. En el envés el tamaño promedio es de 314 micras, mientras que el rango va desde 100 a 570 micras. En cuanto al número de células que forman los tricomas se encontró, para los del haz, una variación en el número de células con un promedio de 3 células y un rango que va desde 2 hasta 6 células. En el envés, el número promedio es de 4 células y el rango varía desde 2 hasta 9 células.

Tabla 1: Características anatómicas microscópicas de la droga cruda de los individuos provenientes de 6 poblaciones silvestres

Variable	Izabal	Retalhuleu	Suchitepéquez	Alta Verapaz	Petén	Chiquimula
Presencia de estomas en el haz	+	+	+	+	+	+
Presencia de estomas en el envés	+	+	+	+	+	+
Tipos de estomas del haz	Anomocítico	Anomocítico	Anomocítico	Anomocítico	Anomocítico	Anomocítico
Tipos de estomas del envés	Anomocítico	Anomocítico	Anomocítico	Anomocítico	Anomocítico	Anomocítico
Tipos de tricomas del haz	Osteolado	Osteolado	Osteolado	Osteolado	Osteolado	Osteolado
Tipos de tricomas del envés	Osteolado	Osteolado	Osteolado	Osteolado	Osteolado	Osteolado
Promedio del tamaño de tricomas del haz (Rango)	88-332 micras (80 – 380 micras)	90 - 368 micras (70 - 550 micras)	84 - 358 micras (80 – 380 micras)	88-320 micras (80 - 400 micras)	96-352 micras (80-400 micras)	98-356 micras (90-400 micras)
Promedio del tamaño de tricomas del envés (Rango)	116-438 micras (90 – 520 micras)	100 - 554 micras (90 – 800 micras)	108- 456 micras (100-520 micras)	118-558 micras (100-700 micras)	138-570 micras (120-700 micras)	100-510 micras (100-600 micras)
Número de células de los tricomas del haz (Rango)	2 – 4.8 (2-5)	2 - 4.8 (2-5)	2 - 4.8 (2-5)	2-4.8 (2-5)	2-4.8 (2-5)	2-5 (2-6)
Número de células de tricomas del envés (Rango)	2 – 5.2 (2-6)	2 - 5.2 (2-6)	2 - 5.2 (2-6)	2-5.6 (2-9)	2-5.6 (2-7)	2-5.2 (2-6)
Diferenciación del mesófilo	Indiferenciado	Indiferenciado	Indiferenciado (1 individuo con mesófilo diferenciado en parénquima en empalizada y esponjoso)	Indiferenciado	Indiferenciado (1 individuo con mesófilo diferenciado en parénquima en empalizada y esponjoso)	Indiferenciado
Forma de las células de la epidermis vistas en corte transversal de hoja	Rectangulares y alargadas horizontalmente	Rectangulares y alargadas horizontalmente	Rectangulares y alargadas horizontalmente	Rectangulares y alargadas horizontalmente	Rectangulares y alargadas horizontalmente	Rectangulares y alargadas horizontalmente
Tipos de haces vasculares	Colateral	Colateral	Colateral	Colateral	Colateral	Colateral
Promedio capas de colénquima en pecíolo (Rango)	8 (5 - 9)	6.6 (5 - 8)	4.6 (4-5)	5.4 (4-7)	6 (4-8)	5 (4-7)
Tipo de colénquima del pecíolo	Angular	Angular	Angular	Angular	Angular	Angular
Número promedio de haces vasculares del pecíolo	11 (10 - 13)	11.2 (9 – 13)	11.6 (7 – 18)	10.6 (8-14)	11 (10-13)	9.8 (7-18)
Tipos de haces vasculares del pecíolo	Colateral anfigasal	Colateral y anfigasal	Colateral, anfigasal y bicolateral	Colateral, anfigasal	Colateral	Colateral, anfigasal y bicolateral

7.2 Propuesta de descripción anatómica

Caracteres microscópicos para identificar la droga cruda

La epidermis de la hoja es simple y uniestratificada y en corte transversal se encuentra dispuesta de manera horizontal (Fig. 1 y Fig. B2). Posee células

rectangulares con paredes moderadamente onduladas en vista superficial (Fig. 2 y Fig. C). La hoja es anfiestomática y posee una cutícula delgada. Los estomas son anomocíticos en ambos lados de la hoja (Fig. 3 y Fig. G). En el haz, los tricomas son pluricelulares de tipo osteolado (Fig. 4 y Fig. D) y de textura verrucosa (Fig. 5 y Fig. E). Los tricomas pueden estar formados por 2 a 6 células, aunque la mayoría de los tricomas posee un máximo de 5 células. La célula basal del tricoma suele ser más gruesa que el resto de las células, mientras que la célula terminal suele ser fina y puntiaguda. Los tricomas más pequeños del haz miden en promedio 80 micras y los más grandes pueden llegar a medir hasta 550 micras. La epidermis del haz presenta con poca frecuencia tricomas glandulares de tipo surculado (Fig. 6, 7 y Fig. F). La epidermis del envés es muy parecida a la del haz ya que los tricomas en su mayoría son pluricelulares y osteolados (Fig. 4 y Fig. D), no obstante cada tricoma consta desde 2 a un máximo de 9 células, aunque la mayoría de tricomas presenta un máximo de 7 células. Los tricomas pueden medir desde 100 hasta 800 micras. Al igual que la epidermis del haz, se observan con poca frecuencia tricomas glandulares de tipo surculado (Fig. 6, 7 y Fig. F).

La constitución del mesófilo es variable. En algunas hojas se puede diferenciar el parénquima en empalizada (de una a dos capas) del parénquima esponjoso (Fig. 8 y Fig. I y O), pero en la mayoría de las hojas el parénquima no está bien desarrollado (Fig. 9, 10 y Fig. B y L).

En las hojas donde puede diferenciarse el parénquima en empalizada y parénquima esponjoso, el primero suele tener células alargadas verticalmente, de forma rectangular y en general de 4 a 5 veces más largas que anchas. Estas células se encuentran dispuestas una a la par de la otra, muy juntas, formando una sección compacta y homogénea por debajo de la epidermis del haz. Algunas hojas presentan una sola capa de parénquima en empalizada y otras pueden presentar hasta dos capas. Cuando el parénquima esponjoso está diferenciado, éste es de aspecto irregular. Las células suelen ser más pequeñas y un poco más redondeadas que las células del parénquima en empalizada y con menor cantidad de cloroplastos. Son de diferentes tamaños y se encuentran distribuidas en todo el mesófilo de forma irregular formando espacios intercelulares.

En la región de la vena central la epidermis uniestratificada presenta estomas de forma muy similar al resto del limbo. Bajo la epidermis hay de 2 a 4 capas de colénquima angular y entre los haces vasculares y el colénquima se encuentra una capa gruesa de parénquima que probablemente sea de almacenamiento. Las células de éste son isodiamétricas y difieren en tamaño dependiendo de la región donde estén. Las células más cercanas al colénquima son en general, más pequeñas y aumentan de tamaño hacia el centro. Presenta haces vasculares colaterales dispuestos de manera circular. (Fig. 11 y Fig. J y N).

En el corte transversal de pecíolo se puede observar una epidermis uniestratificada con estomas anomocíticos y tricomas osteolados, al igual que el resto del limbo. Por debajo de la epidermis se puede observar una sección de colénquima angular de 4 a 9 capas y por debajo de éste se observa una capa gruesa de parénquima con las mismas características que las de la vena central (Fig. 12, 13 y Fig. K3 y M3). La mayoría de haces vasculares son colaterales (Fig. 13) pero con frecuencia pueden presentarse de tipo anfigasal y raramente se presentan haces de tipo bicolateral. El número de haces vasculares que puede tener el pecíolo depende del tamaño del mismo y varía entre 7 y 18 haces situados en la parte central del pecíolo, por debajo del parénquima (Fig. 12 y 13).

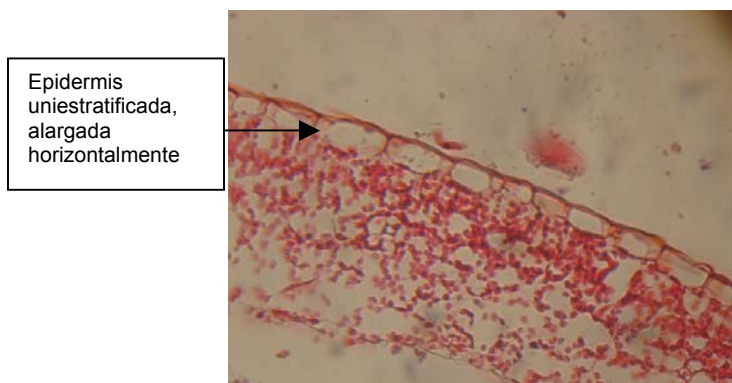


Fig.1 Corte transversal de hoja de *N. lobata* (100x) tinción: Safranina al 1%

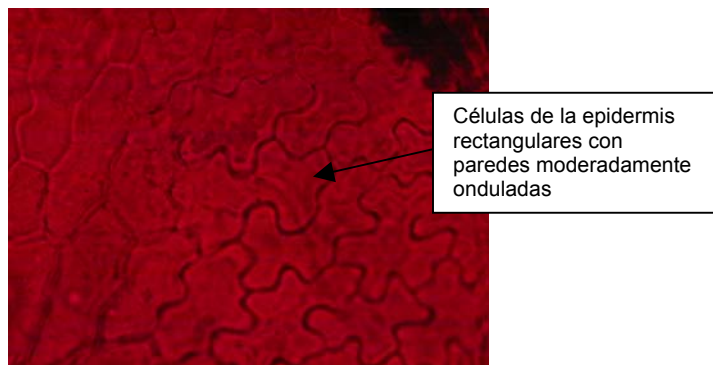


Fig. 2 Diafanizado de hoja de *N. lobata* (400x) tinción: Safranina al 1%

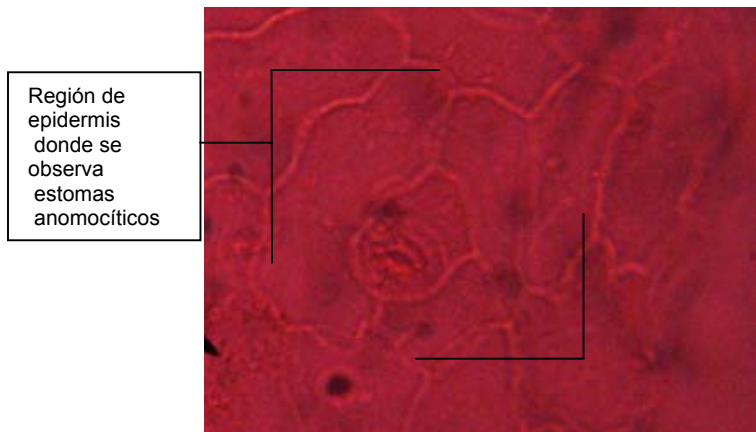


Fig.3 Disociado débil de hoja de *N. lobata* (400x) tinción: Safranina al 1%

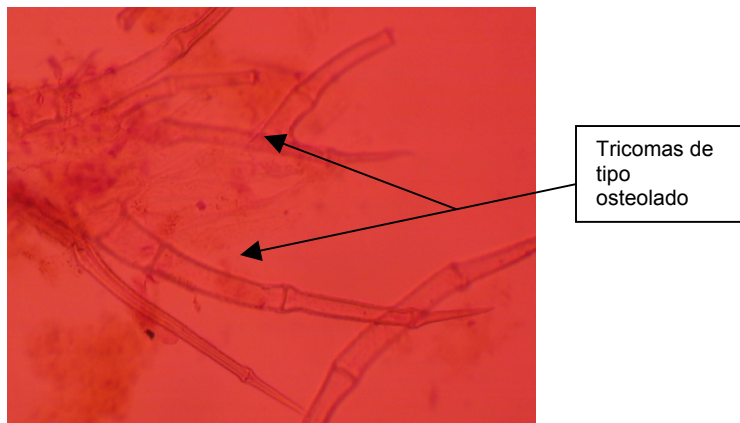


Fig. 4 Diafanizado de hoja de *N. lobata* mostrando tricomas (400x) tinción: Safranina al 1%

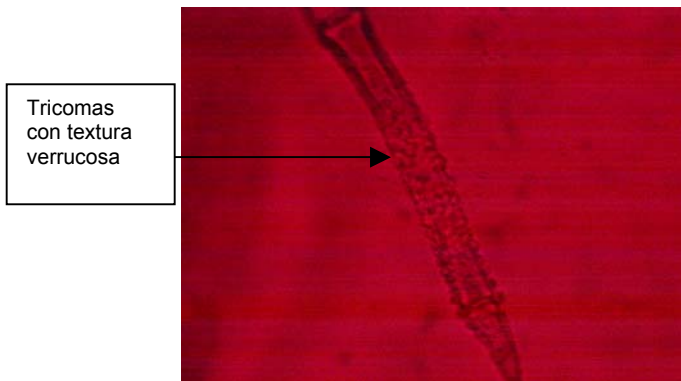


Fig. 5 Diafanizado de hoja de *N. lobata* mostrando tricoma verrucoso (400x) tinción: Safranina al 1%



Fig. 6 Corte transversal de hoja de *N. lobata* mostrando tricoma surculado (400x) montaje en agua destilada

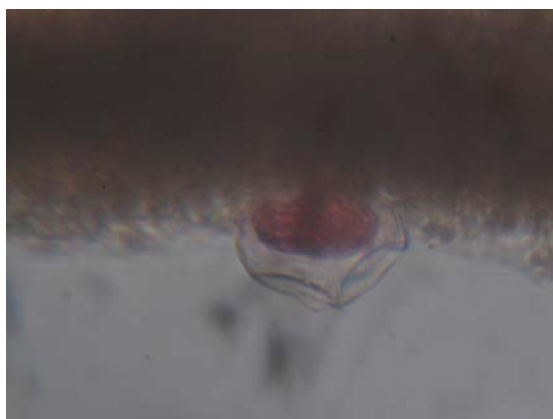


Fig. 7 Corte transversal de hoja de *N. lobata* mostrando tricoma surculado (400x) Tinción: Safranina al 1%

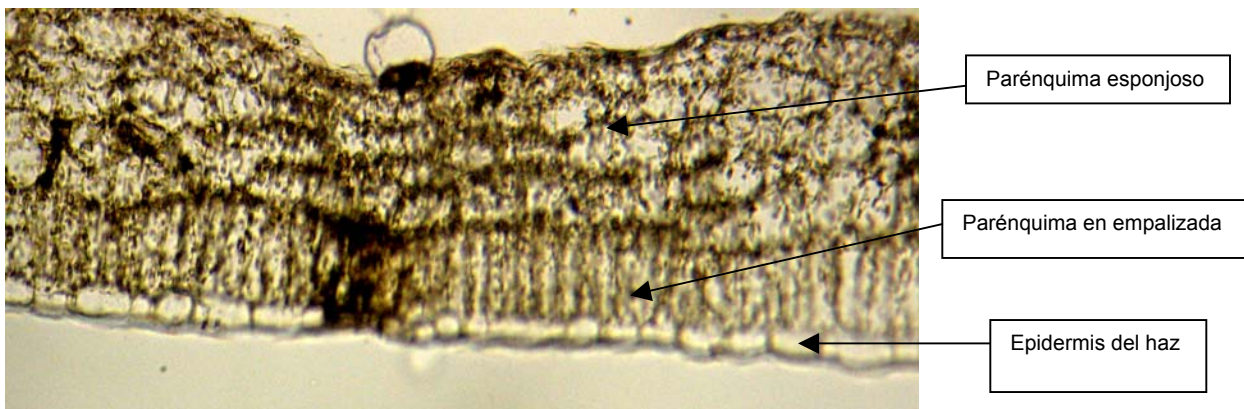


Fig.8 Corte transversal de hoja de *N. lobata* (100x) Montaje en agua destilada



Fig. 9 Corte transversal de hoja de *N. lobata* mostrando mesófilo indiferenciado (100x) Montaje en agua destilada

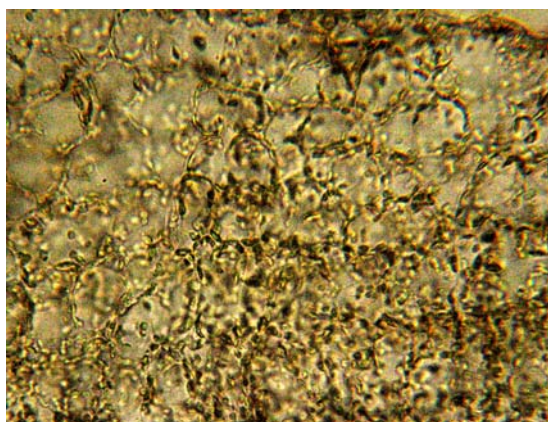


Fig. 10. Corte transversal de hoja de *N. lobata* mostrando mesófilo indiferenciado (400x) Montaje en agua destilada

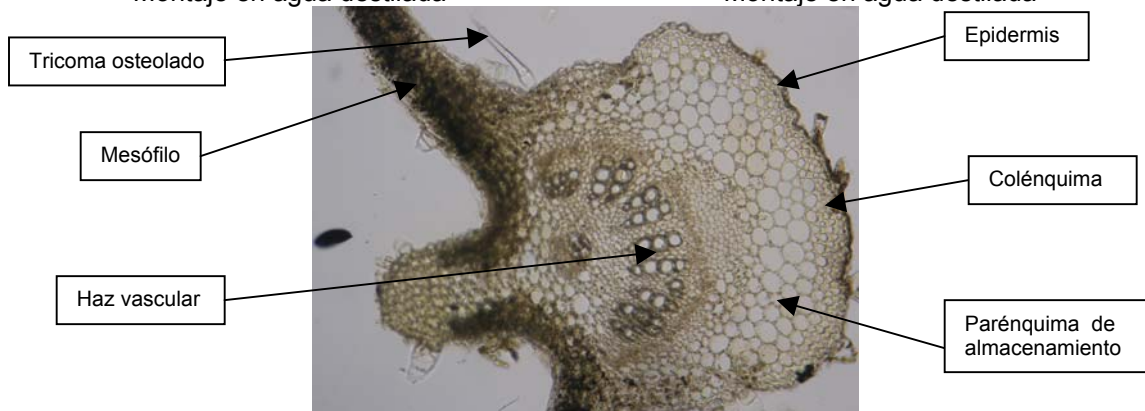


Fig. 11 Corte transversal de hoja de *N. lobata* mostrando vena central (100x) Montaje en agua destilada

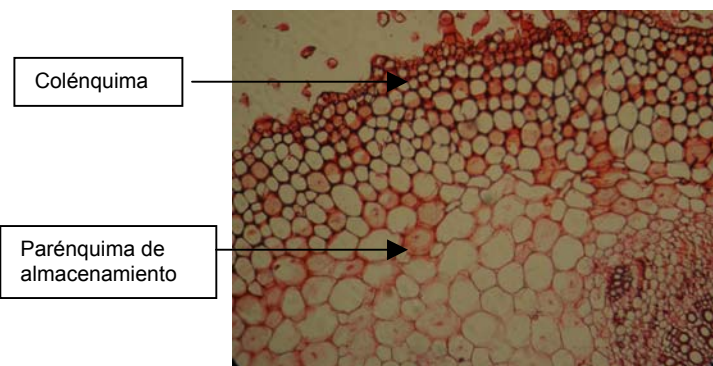


Fig. 12 Corte transversal de peciolo de *N. lobata* (400x) Tinción: Safranina al 1%

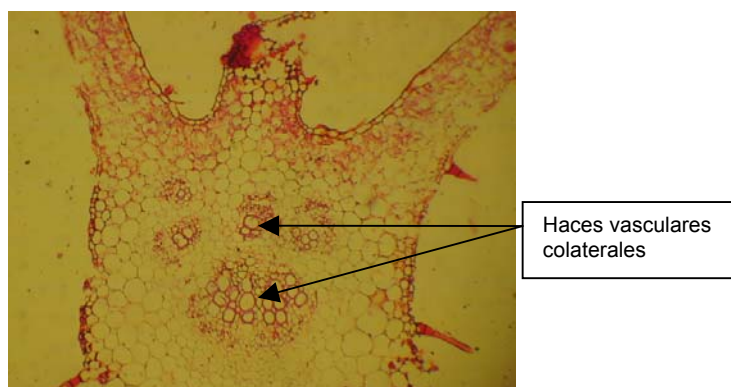


Fig. 13 Corte transversal de peciolo de *N. lobata* Tinción: Safranina al 1%

Caracteres macroscópicos para identificar la droga cruda

Las hojas desecadas listas para su uso son quebradizas, se encuentran fragmentadas, son delgadas y de aspecto papiráceo (Fig. 14). Las hojas enteras jóvenes son ovo-lanceoladas, sin embargo, las adultas tiene forma trilobada porque posee tres lóbulos bien definidos (Fig. 15 y Fig. A). El haz de la hoja posee numerosos tricomas rígidos que le dan una textura áspera con pubescencia escabrosa-hirsuta, en cambio, en el envés los tricomas son más cortos y suaves, lo que le da una textura más suave y sedosa, debido a una pubescencia densa y cortamente pilosa. El ápice de la hoja suele ser caudado, la base atenuada o cuneada y el margen serrado. No posee puntos de transparencia y el peciolo es de tipo alado. Las hojas pueden ser sésiles o cortamente pecioladas. La nerviación es reticulada pues forma una redcilla de areolas. La nervadura de la hoja tiene un nervio principal recto, del cual se desarrollan venas secundarias de manera pinnada que tienden a curvarse hacia el ápice de la hoja. El extremo de estos nervios secundarios no llega al margen de la hoja sino se vuelven a unir con otras venas secundarias, por lo que la venación de la hoja es camptódroma (Fig. A).



Fig.14 Droga cruda de *N. lobata*



Ápice dividido en 3 lóbulos bien marcados

Fig. 15 Fotografía de la hoja de *N. lobata*

Características organolépticas para identificar la droga cruda

Las hojas desecadas son de color verde oscuro. Según el Libro de Color Munsell, de 1976, el color del haz es el número 10Y 3/4 y el del envés es 2.5 GY 4/4. Su sabor es muy amargo, el olor es suave y moderadamente dulce.

7.3 Cartilla Micrográfica

Utilizando los símbolos de Metkalfe y Chalk como base, se presentan las figuras que resumen los caracteres distintivos de la droga cruda de *N. lobata*.

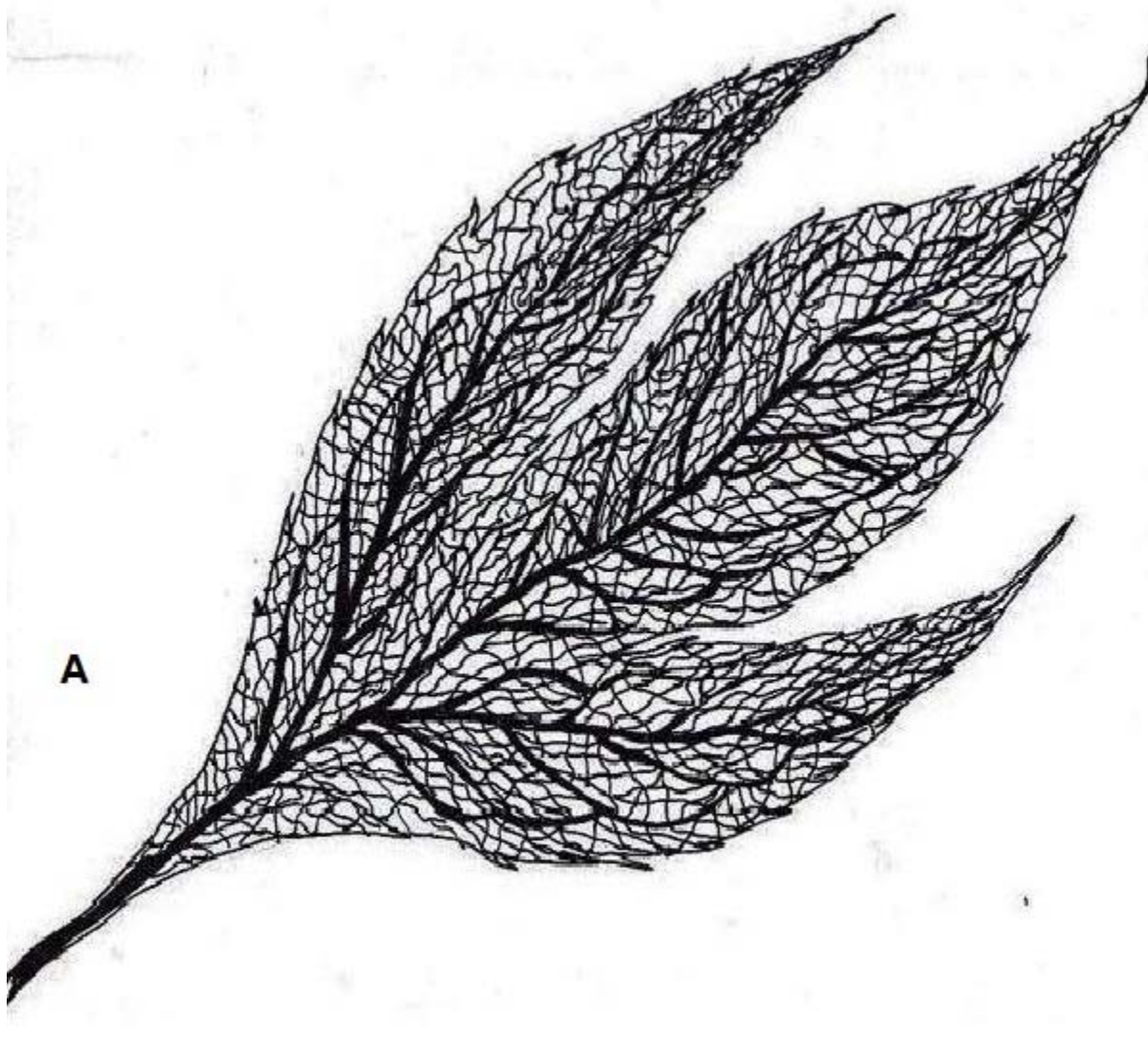


Fig. A. Hoja adulta de *Neurolaena lobata*, mostrando su forma trilobada, venación pinnada, camptódroma y reticulada.

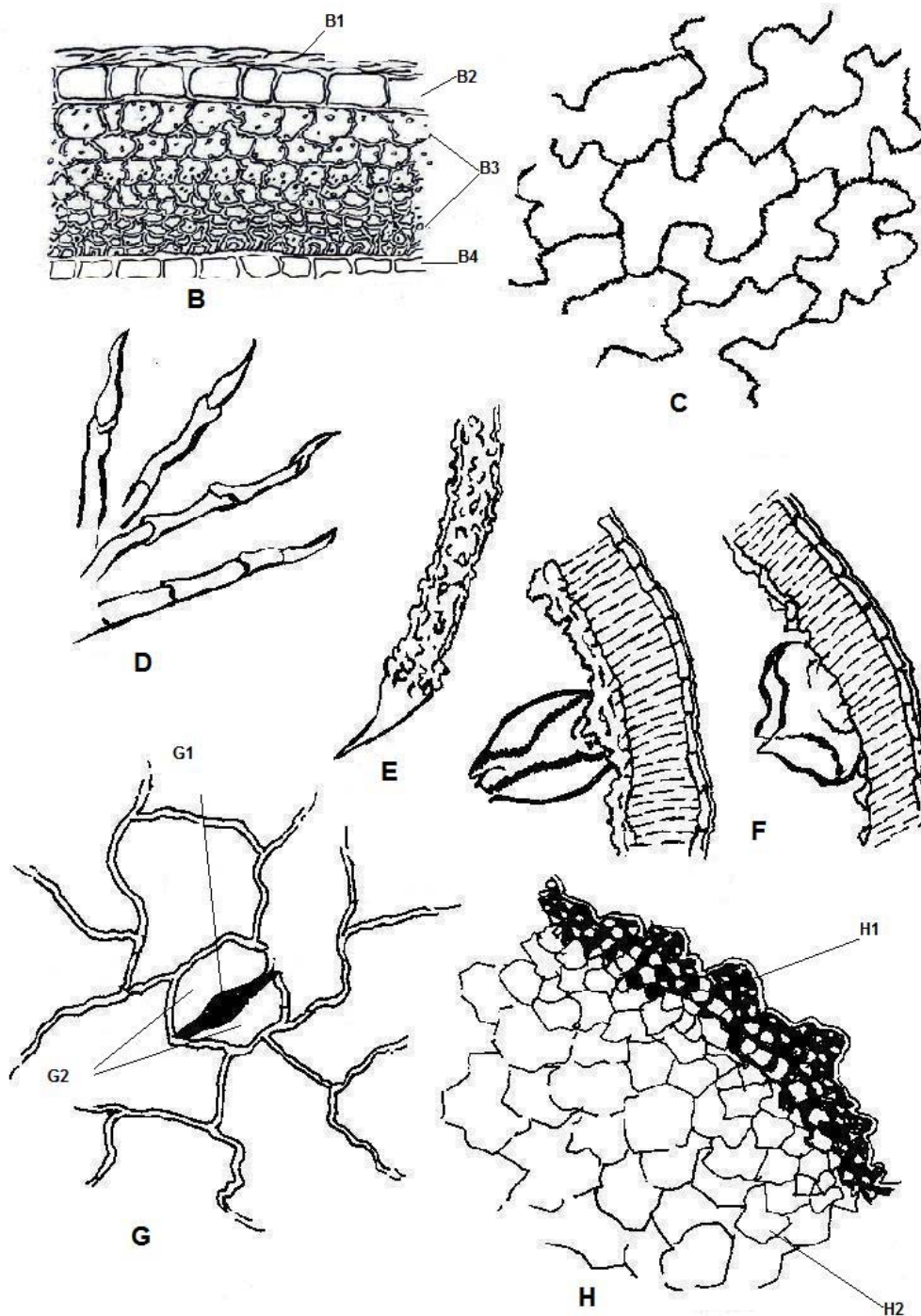


Fig. B. Corte transversal de hoja de *N. lobata* donde se observa **B1** cutícula, **B2** epidermis del haz, **B3** mesófilo indiferenciado, **B4** epidermis del envés **Fig. C.** Células de epidermis en vista superficial. **Fig. D.** Tricomas tectores de tipo osteolado. **Fig. E.** Tricoma tector con textura verrucosa. **Fig. F.** Tricomas glandulares de tipo surculado. **Fig. G.** Estoma de tipo anomocítico. **G1.** Poro estomático **G2.** Células oclusivas. **Fig. H.** Colénquima angular en corte de pecíolo. **H1** Colénquima angular. **H2.** Parénquima.

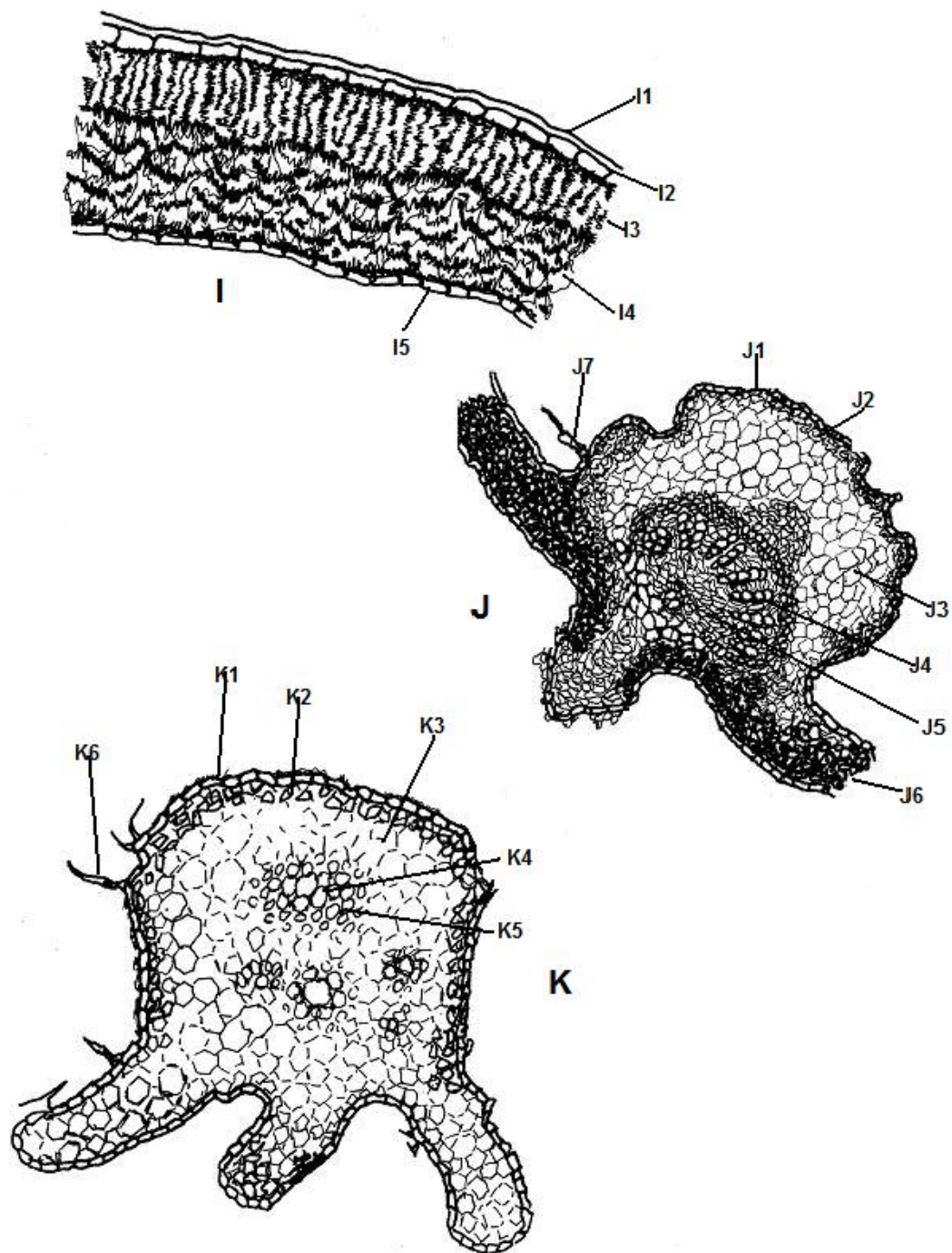
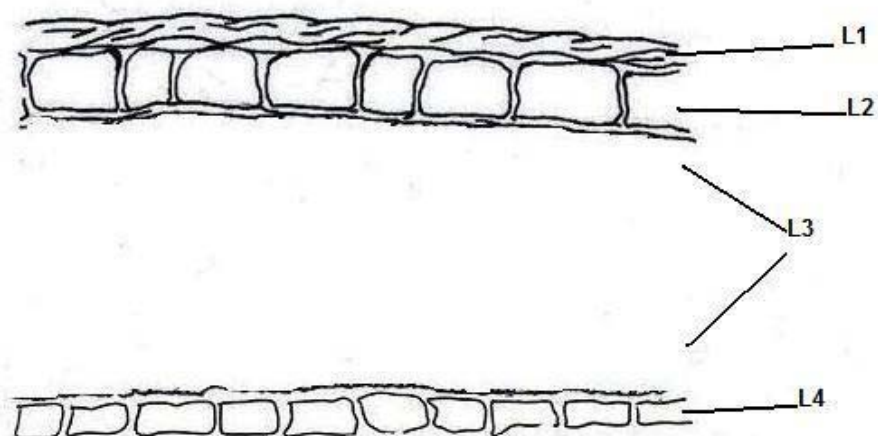
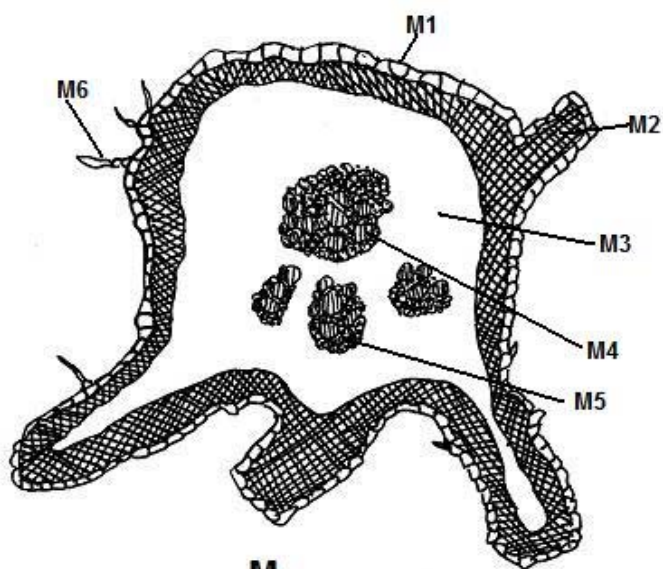


Fig. I. Corte transversal de hoja de *Neurolaena lobata* mostrando mesófilo diferenciado I1. Cutícula I2. Epidermis del haz I3. Parénquima en empalizada I4. Parénquima esponjoso I5. Epidermis del envés. **Fig. J.** Corte transversal de vena central de *Neurolaena lobata* J1. Epidermis J2. Colénquima angular J3. Parénquima J4. Xilema J5. Floema J6. Parénquima esponjoso J7. Tricoma tector tipo osteolado J3. **Fig. K.** Corte transversal de peciolo de *Neurolaena lobata* K1. Epidermis K2. Colénquima angular K3. Parénquima K4. Xilema K5. Floema K6. Tricoma tector tipo osteolado.



L



M

Fig. L. Corte transversal de hoja de *N. lobata* (esquema basado en Metcalfe & Chalk) donde se observa **L1** cutícula, **L2** epidermis del haz, **L3** mesófilo indiferenciado, **L4** epidermis del envés. **Fig. M.** Corte transversal de pecíolo de *N. lobata* (esquema basado en Metcalfe & Chalk) **M1.** Epidermis **M2.** Colénquima angular **M3.** Parénquima **M4.** Xilema **M5.** Floema **M6.** Tricoma tector tipo osteolado.

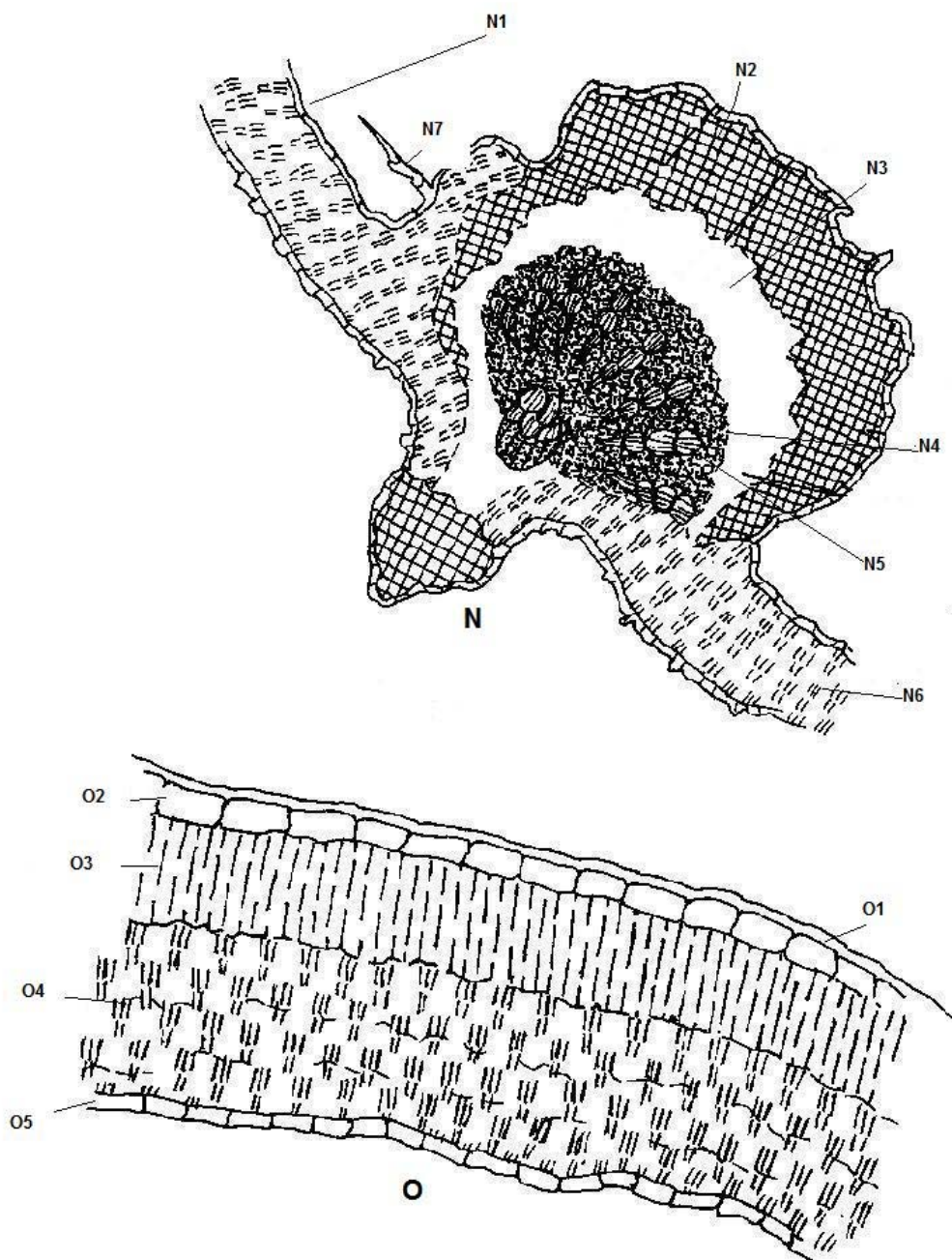


Fig. N. Corte transversal de vena central de *Neurolaena lobata* (esquema basado en Metcalfe & Chalk) N1. Epidermis N2. Colénquima angular N3. Parénquima N4. Floema N5. Xilema N6. Parénquima esponjoso N7. Tricoma tector de tipo osteolado.

Fig. O. Corte transversal de hoja de *Neurolaena lobata* mostrando mesófilo diferenciado (esquema basado en Metcalfe & Chalk). O1. Cutícula O2. Epidermis del haz O3. Parénquima en empalizada O4. Parénquima esponjoso O5. Epidermis del envés.

7.4 Metabolitos secundarios en los tejidos

Las pruebas positivas para los cortes de hoja de todos los individuos de las seis poblaciones fueron las de taninos (sulfato férrico), alcaloides (reactivo de Dragendorff) y aceites (Sudán III). Por ser pruebas cualitativas de presencia/ausencia de las sustancias ergásticas en los tejidos, se usó una escala de 1 a 3 en los casos positivos, en donde 1 se refiere a la poca presencia, 2 a la presencia intermedia y 3 a la presencia abundante de los mismos (anexo 10).

La presencia de taninos fue abundante y dio como resultado una coloración café verdoso intenso y oscuro con precipitados pequeños de color negro (Fig. 16a y 16b) en el mesófilo, epidermis y en algunos tricomas.

En el caso de alcaloides, la prueba positiva fue intermedia ya que solamente el tejido del mesófilo presentaba regiones con precipitados de color café casi negro (Fig. 17a y 17b).

En el caso de la prueba para grasas (Sudán III), que incluye aceites volátiles y fijos, con excepción de la población de Suchitepéquez, la cual fue negativa para los cinco individuos sometidos a estudio, todas las poblaciones dieron positivo. Además de que la epidermis, mesófilo y tricomas se colorearon de rojo, lo cual indica que hay grasas o aceites en el material estudiado, también se formó un precipitado color rojizo en todos los tejidos de la lámina foliar (anexo 10). (Fig. 18a, 18b, 18c, 18d)

El resto de las pruebas realizadas a la hoja y pecíolo de *N. lobata* dieron negativo. No hubo presencia de lignina, mucílagos y cristales en ninguno de los individuos examinados (anexo 10).

Paralelo a las pruebas histoquímicas por irrigación directa a los cortes, también se realizaron pruebas histoquímicas para taninos y alcaloides usando infusiones del material. La prueba para taninos dio positiva en todos los individuos; en cambio la prueba para alcaloides dio positiva solamente para 5 individuos de los 30 (anexo 10).

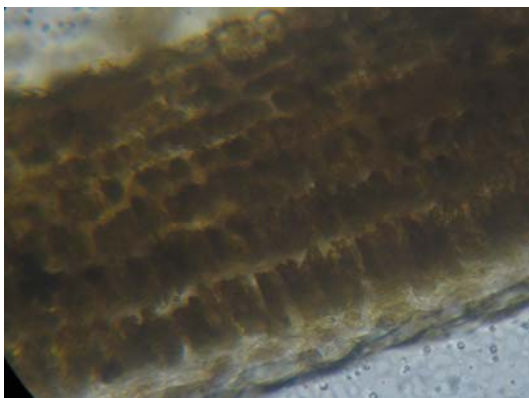


Fig. 16a Corte transversal de hoja de *N. lobata* mostrando positiva la prueba de taninos (400x) Medio de montaje: sulfato férrico



Fig. 16b Corte transversal de hoja de *N. lobata* mostrando positiva la prueba de taninos (100x) Medio de montaje: sulfato férrico

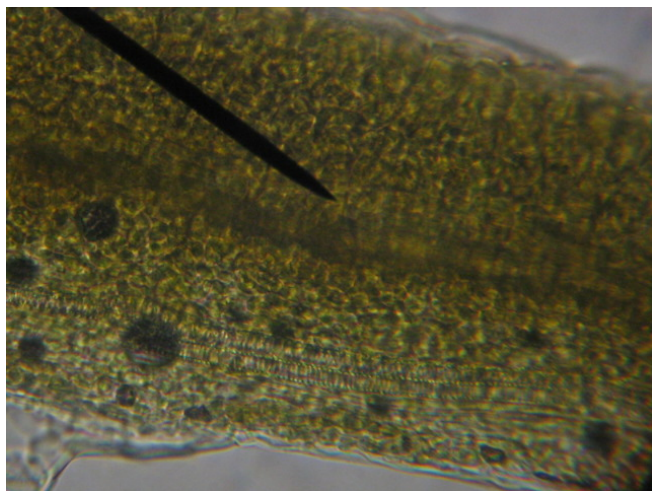


Fig. 17a Corte transversal de hoja de *N. lobata* mostrando positiva la prueba de alcaloides (400x) Tinción: Dragendorff



Fig. 17b Corte transversal de hoja de *N. lobata* mostrando positiva la prueba de alcaloides (100x) Tinción: Dragendorff

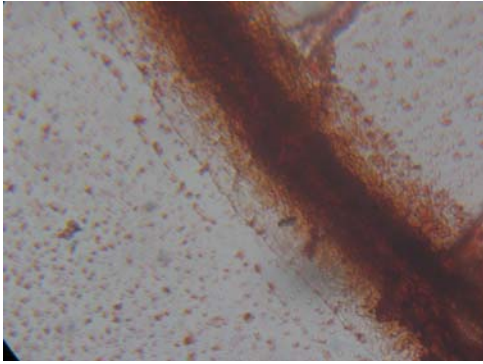


Fig. 18a Corte transversal de hoja de *N. lobata* mostrando positiva la prueba de aceites (100x)
Tinción: Sudán III

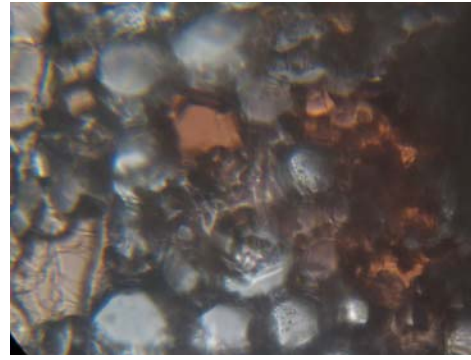


Fig. 18b Corte transversal de hoja de *N. lobata* mostrando positiva la prueba de aceites (400x)
Tinción: Sudán III

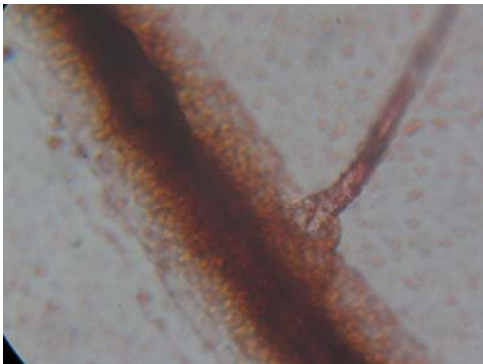


Fig. 18c Corte transversal de hoja de *N. lobata* mostrando positiva la prueba de aceites (100x)
Tinción: Sudán III

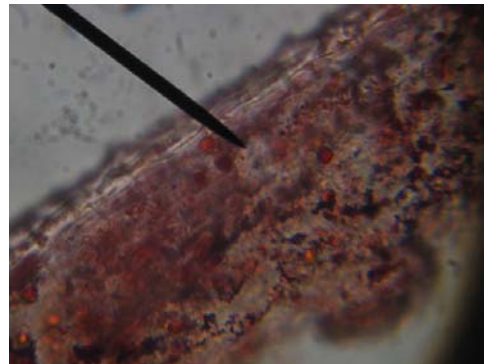


Fig. 18d Corte transversal de hoja de *N. lobata* mostrando positiva la prueba de aceites (100x)
Tinción: Sudán III

8. DISCUSION DE RESULTADOS

Los datos que se obtuvieron en el estudio de la descripción botánica macro y microscópica de la hoja de *Neurolaena lobata* demuestran que existe gran similitud entre los individuos que conformaron la muestra del estudio. Las características microscópicas cualitativas fueron prácticamente iguales a excepción de algunas variantes como el tipo de haces vasculares en el pecíolo. Tres de las poblaciones presentaron haces colaterales y anfibasales, mientras que las poblaciones de Suchitepéquez y Chiquimula presentaron además, haces bicolaterales y la población de Petén solamente presentó haces colaterales. La literatura informa que a lo largo de una misma planta pueden encontrarse varios tipos de haces vasculares, lo que explica la amplia variación observada (34). Asimismo se observó que el mesófilo fue indiferenciado en la mayoría de las poblaciones, aunque se encontraron dos individuos de dos poblaciones distintas con diferenciación entre parénquima esponjoso y empalizada (Suchitepéquez y Chiquimula).

En cuanto a los caracteres cuantitativos se pudo observar algunas variaciones entre individuos y no entre poblaciones. Entre estos caracteres están el tamaño de los tricomas, número de células que forman los tricomas, número de capas de colénquima en el pecíolo y número de capas de parénquima en empalizada. Una de las razones posibles por la cual estas variables cuantitativas pudieron presentar diferencias observables entre individuos puede deberse a la edad de la planta o del estadio del ciclo fenológico en que fue colectada, ya que por ejemplo, las capas de colénquima van aumentando de número al ser la hoja, el pecíolo, u órgano donde se presenta, más grande y por consiguiente, con necesidad de más soporte para su peso. Cabe mencionar que en este estudio no se tomó en cuenta ni el tamaño ni la edad de la planta.

Una observación interesante que se puede ver en la tabla 1 es que la población de Retalhuleu obtuvo el rango más amplio en cuanto al tamaño de los tricomas del haz y del envés, es decir los más cortos y los más largos de las seis poblaciones estudiadas. En el resto de las poblaciones estos valores fueron más homogéneos. Al

ser los tricomas estructuras que almacenan metabolitos secundarios, es posible que existan diferencias en la cantidad de sustancias que pueden acumularse dependiendo del tamaño de los mismos, por lo que este caracter podría ser de interés para escogerse en estudios enfocados a la fitoquímica de la especie.

Respecto al número de células que conforman los tricomas del haz y del envés, se observó que en el envés están conformados por mayor número de células. La mayoría de pelos más largos del haz presentaba cinco células. De igual modo, en los tricomas del envés el promedio de células de tricomas fue de seis. Solo un individuo (población de Chiquimula) presentó tricomas de seis células en el haz, asimismo un solo individuo (población de Alta Verapaz) presentó en el envés nueve células. Esta observación puede deberse también al tamaño de la hoja de donde se tomó la muestra ya que se escogieron al azar estando algunas menos desarrolladas. Otros caracteres como el número de capas de colénquima y el número de haces vasculares en el pecíolo también fueron variables. En promedio, los individuos de las poblaciones de Izabal y Retalhuleu presentaron números mayores para los caracteres de tamaño de tricomas del haz y tamaño de tricomas del envés.

En cuanto al tipo de tricomas, se encontraron los tectores pluricelulares con forma osteolada y los glandulares con un pie de forma surculada. En los datos preliminares de Gatusso, *et al* sobre la microscopía de la hoja de esta misma especie no se reporta la forma de los tricomas glandulares que en este estudio se determinó que era surculada, así como la forma del tricoma tector que es osteolado. Asimismo se encontró rangos más amplios en el tamaño de los tricomas osteolados y mayor número de capas de colénquima en el pecíolo que lo encontrado por el equipo de Gatusso. Es importante mencionar que ese estudio contó únicamente con muestras colectadas en el departamento de Suchitepéquez, es decir que el muestreo fue menor, lo cual podría de alguna manera explicar las variaciones. Las diferencias también podrían deberse al estadio fenológico de las plantas.

Tomando en cuenta los análisis estadísticos realizados, se pudo observar en el análisis de cluster (anexo 8) que no se da una separación de grupos, sino la conformación de un solo grupo con los individuos de las distintas poblaciones. La gráfica del anexo 9 que representa el análisis de componentes principales muestra un solo grupo formado por 28 de los 30 individuos estudiados. Solo los individuos 1 y 6 de Retalhuleu quedaron excluidos del grupo formado por el 95% del área. Si se comparan los resultados de ambos análisis se observa que el individuo 1 de la población de Retalhuleu es el que presenta mayores diferencias en relación al resto de individuos, no obstante, no proporcionan diferencias significativas estadísticamente.

En cuanto a las características macroscópicas organolépticas, se pudo observar que los individuos estudiados no presentaron diferencia entre ellos. Todos poseían el mismo color, olor, sabor, forma, textura y tipo de nervadura. Esto permite aseverar que, para fines farmacognósticos, a nivel macroscópico, las poblaciones estudiadas son iguales. Con esto, la descripción de la droga cruda en este estudio podría servir como estándar de calidad de la especie.

Las características organolépticas y macroscópicas más relevantes para uso de diagnóstico farmacognóstica son el sabor amargo tan característico de la especie así como la hoja madura que presenta una forma trilobada. En cuanto a las microscópicas, los caracteres que pueden observarse con mayor facilidad son la presencia de pelos de tipo osteolado en el haz y en el envés, así como tricomas glandulares de tipo surculado y el pecíolo con colénquima de tipo angular.

En cuanto a los resultados de la cartilla micrográfica, es importante mencionar que no se desechó ninguna característica establecida inicialmente ya que éstas eran las mismas para todos los individuos. Es decir, que los 20 caracteres cualitativos y 8 cuantitativos eran iguales para todos los individuos.

Los metabolitos secundarios presentes en mayor cantidad para todos los individuos fueron los taninos, seguidos por alcaloides y por último aceites esenciales.

Todos los individuos de las poblaciones estudiadas presentaban más o menos la misma cantidad de metabolitos secundarios, con excepción de la población de Suchitepéquez, que no dio positiva la prueba para aceites esenciales. La presencia en grandes cantidades de taninos en la planta refuerza lo consultado en la literatura, donde se menciona que éstos son una clase de flavonoides, y estudios fitoquímicos realizados a la planta demuestran la presencia de 11 tipos de flavonoides para la especie (4). La prueba de alcaloides dio positiva aunque no está reportada la presencia de los mismos en los estudios químicos realizados en la especie. Podría ser entonces que la prueba para alcaloides haya dado un falso positivo. Respecto a esto, se conoce que reactivos como el de Dragendorff pueden reaccionar con taninos y otras sustancias como proteínas (sustancias albuminosas, peptonas y tomaínas), alfa pironas, algunas cumarinas e hidorflavonas, ciertos glicósidos y carbohidratos, betaína, colina, purinas, aminas etiladas y sales de amonio, dando un falso positivo (35, 36). En las pruebas de identidad de esta especie probablemente no deba utilizarse el reactivo de Dragendorff ya que la presencia en grandes cantidades de taninos podría alterar los resultados. En cuanto a la presencia de grasas o aceites, la reacción química tomada como positiva es la coloración de estas sustancias que se observan como gotas de color rosado. En el presente estudio, además de esta reacción, se obtuvo la presencia de precipitados rojizos con el reactivo Sudán III. Esta última reacción no es típica para los aceites etéreos, por lo que puede haber presencia de otros metabolitos oleosos tan diversos como ceras, productos resinosos, cutina y suberina (37).

En las pruebas histoquímicas hechas con infusiones de la hoja, la prueba para taninos fue abundantemente positiva, y en cambio, la prueba para alcaloides, en este caso salió negativa. Este resultado coincide mejor con la literatura. Es por esta razón que es necesario realizar estudios fitoquímicos más formales para establecer de manera adecuada exámenes de laboratorio simples pero confiables para la identidad básica de los metabolitos en la planta, especialmente para aceites y alcaloides.

Si se comparan los caracteres anatómicos y metabolitos secundarios encontrados en *N. lobata* con los descritos para la generalidad de las especies de la

familia Asteraceae, vemos que la familia se caracteriza también por presentar estomas anomocíticos, pelos glandulares y/o tectores, presencia de sesquiterpenos (especialmente sesquiterpenlactonas) y aceites esenciales volátiles.

En cuanto a los procedimientos histológicos utilizados en este estudio, no se logró, después de varios meses de reproducir con calidad, la técnica de cortes transversales de la lámina en el micrótopo recomendada por Gatusso por lo que fue necesario hacer las descripciones de la lámina a partir de cortes a mano alzada. Las fallas de la técnica pudieron deberse a que la hoja de esta especie es muy delgada, por lo que se descompone fácilmente en la temperatura de fusión de la parafina, los tiempos de las técnicas no fueron los adecuados o simplemente la técnica no era la adecuada para la hoja. En cuanto a las variables de índice de estomas y número de haces vasculares de la vena central, no se pudo estudiar con el equipo de microscopía con el que se contó.

9. CONCLUSIONES

1. La hoja de *N. lobata* es anfiestomática, con estomas anomocíticos y una epidermis uniestratificada con células alargadas horizontalmente en corte transversal y rectangulares con paredes moderadamente onduladas en vista superficial.
2. La hoja presenta abundantes tricomas tectores pluricelulares de tipo osteolado y de textura verrucosa, en cambio, los tricomas glandulares son escasos y de tipo surculado.
3. El mesófilo de la hoja de *N. lobata* suele ser indiferenciado aunque pueden encontrarse hojas que presentan diferenciación del mesófilo en una o dos capas de parénquima en empalizada y parénquima esponjoso.
4. La vena central presenta los mismos tejidos que el limbo y además, de dos a cuatro capas de colénquima angular y haces vasculares colaterales.
5. El pecíolo presenta una epidermis uniestratificada, seguida por varias capas de colénquima angular (de cuatro a nueve capas) y parénquima. Los haces vasculares fueron en su mayoría de tipo colateral pero en algunas ocasiones se encontraron de tipo anfiervasal y bicolateral.
6. Las características organolépticas más relevantes de la droga cruda de la especie son: hoja dividida en tres lóbulos bien diferenciados, hojas quebradizas y ásperas al tacto, sabor muy amargo, olor suave y moderadamente dulce.
7. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a caracteres cuantitativos ni cualitativos entre las seis poblaciones silvestres estudiadas.
8. En corte transversal con irrigación del reactivo de Dragendorff, la presencia de alcaloides dio medianamente positiva en el mesófilo. La literatura no reporta la presencia de los mismos en la planta y este reactivo no es específico para alcaloides, por lo que pudo haber reaccionado con otras sustancias como taninos, proteínas, cumarinas y otros.

9. En corte transversal con irrigación de sulfato férrico, la presencia de taninos dio abundantemente positiva en el mesófilo y tricomas asimismo fue positiva en infusión de las hojas.
10. En corte transversal con irrigación del reactivo Sudán III, la presencia de aceites dio medianamente positiva en el todo el mesófilo y algunas veces en tricomas y vena central.
11. Los caracteres útiles para el diseño de la cartilla micrográfica fueron 8 caracteres cuantitativos y 20 cualitativos estudiados en los individuos de las seis poblaciones.

10.RECOMENDACIONES

1. Para poder realizar estudios estadísticos paramétricos y así aumentar la confiabilidad del estudio, se recomienda aumentar el número de muestras de las poblaciones y tomar las muestras al azar para disminuir el posible error estadístico.
2. Tomar en cuenta dentro del muestreo la variable edad o estadio fenológico de las plantas de las diferentes poblaciones para controlar mejor algunas de las variables cuantitativas, como lo son el número de capas de colénquima y el número de haces vasculares en pecíolo y vena central así como también el tamaño y el número de células de tricomas.
3. Buscar otra técnica para cortes con micrótomo para obtener cortes más finos, precisos y completos.
4. Realizar estudios más específicos que permitan hacer efectiva la identidad de presencia/ausencia de metabolitos secundarios como lo son los diferentes tipos de cromatografía y espectrofotometría.

11. BIBLIOGRAFIA CITADA

1. Noticias de los Periódicos del Mundo: Los Casos de malaria en Guatemala superan ya los 2000 semanales. Madrid, España. Disponible en: http://www.acnur.org/index.php?id_pag=3814.
2. Gattuso M *et al.* Analytical Micrographic Characters of *Smilax dominguensis*, *Tagetes lucida*, *Neurolaena lobata* and *Solanum Americanum*. Datos de investigación no publicados.
3. Soler BA. Farmacognosia. Guatemala: USAC. Doc. Tec. MUPLAM: Curso de Farmacognosia y Control de Calidad, 2005. 6p.
4. Cáceres A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala: Guatemala USAC. 1999. 402p.
5. Missouri Botanical Garden. Database online. 2005. Disponible en: <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>
6. Stevens WD, Ulloa C, Pool A, Montiel M. Flora de Nicaragua. EEUU: Vol. 85, Tomo I, Missouri Botanical Garden, 2001. 943p.
7. Nash D, Williams LO. Flora of Guatemala. Fieldiana Botany. USA: Vol. 24, Tomo 12, Chicago Field Musseum, 1976. 603 p.
8. Passreiter CM, Isman MB. 1997. Antifeedant Bioactivity of Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena lobata* and their Antagonism by λ -Aminobutyric Acid. *Biochemical Systematics and Ecology* 1997;25(5):371-377.
9. Passreiter CM. 1998. Pyrrolizidine Alkaloids from *Neurolaena lobata*. *Biochemical Systematics and Ecology* 1998;26:839-843.
10. Kufer J, Forther H, Poll E, Heinrich M. Historical and modern medicinal plant uses - the example of the Ch'orti' Maya and Ladinos in Eastern Guatemala. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2005;57(9):1127-1152.
11. Berger I, Passreiter C, Cáceres A, Kubelka W. Antiprotozoal Activity of *Neurolaena lobata*. *Phytotherapy Research* 2001;15:327-330.
12. Girón L, Freire V, Alonzo A, Cáceres A. Ethnobotanical Survey of the Medicinal Flora used by the Caribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology* 1991;34: 173-1778.

13. Gracioso JS, Hiruma-Lima CA, Brito ARMS. Antiulcerogenic effect of a hydroalcoholic extract and its organic fractions of *Neurolaena lobata* (L.) R.BR. *Phytomedicine* 2000;7(4): 83-289.
14. Fujimaki, Y. Macrofilaricidal and microfilaricidal effects of *Neurolaena lobata*, a Guatemalan medicinal plant, on *Brugia pahangi*. *Journal of Helminthology* 2005;79(1): 23-28
15. Gupta ML, Solis NG, Esposito Avella M, Sánchez C. Hypoglycemic activity of *Neurolaena lobata* (L.) Br. *Journal Ethnopharmacol* 1984;10:323-327.
16. Passreiter CM, Wendisch D, Gondol D. 1995. Sesquiterpenlactones from *Neurolaena lobata*. *Phytochemistry* 1995;39(1):133-137.
17. Morales C, Gómez-Serranillos MP, Iglesias I, Villar L, Cáceres A. Preliminary screening of five ethnomedicinal plants of Guatemala. *Il Fármaco*; 56: 523-526.
18. Fernández M. Introducción del programa a la asignatura de Farmacognosia. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, España. Disponible en: <http://www.unav.es/farmytec/farmacognosia/default.html>.
19. Gianoli E. 2004. Plasticidad Fenotípica en Plantas. Chile: Fisiología Ecológica en Plantas: Mecanismos y Respuestas a Estrés en los Ecosistemas, 2004. (p13-25).
20. Soler BA. Monografías sobre Plantas. Guatemala: USAC. Doc. Tec. MUPLAM: Curso de Farmacognosia y Control de Calidad, 2005. 6p.
21. Soler BA. Aspectos de Control de Calidad. Guatemala; USAC. Doc. Tec. MUPLAM: Curso de Farmacognosia y Control de Calidad, 2005. 8p.
22. Solís PN, Guerreo N, Gattuso S, Cáceres A. Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterápicos. OEA/AICD/AE 089/03: Proyecto Desarrollo y Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitofármacos. 2005. 132p.
23. Sharapin N. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Colombia: CYTED, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma X Química Fina Farmacéutica, 2000.

24. Vasisht K. Standarization of Herbal Medicine. Guatemala: Doc. Tec. Production and Quality Evaluation of Medicinal and Aromatic Plants, 2001. 11p.
25. Paredes ME. Determinación de Algunos Estándares de Identidad y Pureza de Cuatro Plantas Medicinales Comercializadas en Guatemala. Guatemala: USAC (tesis de graduación, MUPLAM) 2005.
26. Soria R. Farmacobotánica. Perú: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 1994. 48p.
27. Cañigueral S. La Fitoterapia: ¿Una terapéutica para el tercer milenio? Revista de Fitoterapia 2002; 2:101-121.
28. Gattuso M, Gattuso SJ. 1999. Manual de Procedimientos para el Análisis de Drogas en Polvo. Argentina: CYTED, UNR Editora, 1999.
29. Curtis J. Microtecnia Vegetal. México D.F, México: Editorial Trillas, 1986. 106pp.
30. Johansen DA. Plant Michrotechniques. USA: Mc.Graw-Hill Book Company, 1940. 524 p.
31. Gattuso M. Técnicas para cortes en micrótopo de rotación. Argentina: Doc. Tec. para Exposición, 2006.
32. Soler BA. Análisis Farmacobotánico. Guatemala: USAC, Doc. Tec. MUPLAN: Curso de Farmacognosia y Control de Calidad, 2005. 10p.
33. OEA. Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. Washington, D.C, USA: Serie de Biología. Monografía No. 26. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, 1983. 132 p.
34. Esau K. Plant Anatomy. 2 Ed. USA: John Wiley & Sons, 1965.
35. Bruneton J. Farmacognosia: Fotoquímica de Plantas Medicinales. 2da Edición. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A. 2001.
36. Santa Cruz LU. Selección Fitoquímica: Guía Práctica para los Laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímica.
37. Proenca Da CUNHA. Farmacognosia y Fotoquímica. Lisboa, Portugal: Fundación Calouste Gulben Kiam.

12. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Brizuela MM, *et al.* Estudio de la Variación Morfológica de Tres Procedencias de *Prosopis flecuosa* y su manifestación en Cultivo Bajo Condiciones Uniformes. *Multequina* 2000;9: 07-15.
- Caviares LA. Variación Morfológica de *Phacelia secunda* a lo largo de un gradiente altitudinal en Chile Central. *Gayana Bot.* 2000;57(1).
- Cortadi A, *et al.* Caracteres Anatómicos de Tres Especies Medicinales de la Familia Myrtaceae. *Acta Farm. Bonaerense* 1996;15(2):109-123.
- Ekong RM, *et al.* Comparison of in vitro activities of quassinoids with activity against *Plasmodium falciparum*, anisomycin and other inhibitors of eukaryotic protein synthesis. NCBI, PubliMed and National Library of Medicine. *Biochemical Pharmacology*, 1990;40(2):297-301.
- Fischer DCH, *et. al.* In Vitro Screening for Antiplasmodial Activity of Isoquinoline alkaloids from Brazilian Species. *Acta Tropica* 2004;261-266.
- Him Y, Péaz J. Anatomía Foliar Comparada de Plantas de Jengibre (*Zingiber officinalis* Roscoe) Cultivadas en Tres Ambientes de Crecimiento. *Bioagro* 2004;16(1): 27-30.
- Primot S *et al.* Variación Morfológica de tres especies de cucurbas y sus híbridos en el Valle del Cauca (Colombia). *Rev. Bras. Fructic* 2005;27(3).
- Rodríguez CM. Autenticación Citohistológica de Cuatro Plantas Medicinales Nativas. Guatemala, USAC (tesis de graduación), 2000.
- Wright CW *et al.* Quasinoids exhibit greater selectivity against *Plasmodium falciparum* than against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* or *Toxoplasma gondii* in vitro. NCBI, PubliMed and National Library of Medicine. *Eukaryot Microbiology* 1993;40(3):244-246.

13. ANEXOS

Anexo 1: Hábito herbáceo de *N. lobata* mostrando su poca ramificación



Fuente: Fotografía de Nathalia Granados Dieseldorff, Livingston, Izabal. 2007

Anexo 2: Detalle del tallo estriado y surcado de *N. lobata*



Fuente: Fotografía de Nathalia Granados Dieseldorff, Reserva Tak'alik Ab'aj, Retalhuleu. 2007

Anexo 3: Inflorescencia corimbo paniculada de *N. lobata*



Fuente: www.nybg.org/bsci/belize/Neurolaena_lobata.jpg



Fuente: Fotografía de Nathalia Granados Dieseldorff, Livingston, Izabal. 2007

Anexo 4: Procedimiento de tinción de cortes histológicos

(Fuente: Fotografías de Nathalia Granados Dieseldorff, Laboratorio de Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria, USAC)



Laminillas en una gradilla al momento de ser sumergidas dentro de una pila con el tinte.



Laminillas al momento de ser escurridas, después de la tinción.



Llenado de las pilas con alcohol para eliminar el exceso del colorante.



Al momento de escurrir las laminas después de los cambios de alcoholes.

Anexo 5: Procedimiento del montaje y fijación de cortes en micrótomos

(Fuente: Fotografías de Nathalia Granados Dieseldorff, Laboratorio de Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria, USAC)



Recipientes con diferentes cambios de alcohol y xilol



Laminillas en el proceso de deshidratación y fijación



Laminillas fijadas en merckoglass



Laminillas secándose después de ser fijadas

Anexo 6: Fotografía de diafanizados

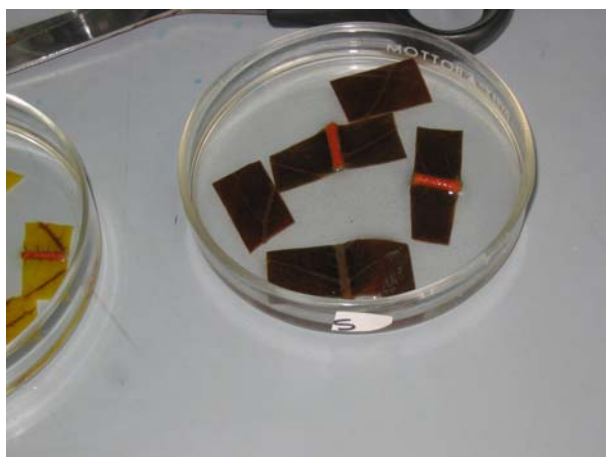
(Fuente: Fotografías de Nathalia Granados Dieseldorff, Laboratorio de Farmacobotánica, Facultad de CCQQ y Farmacia, USAC)



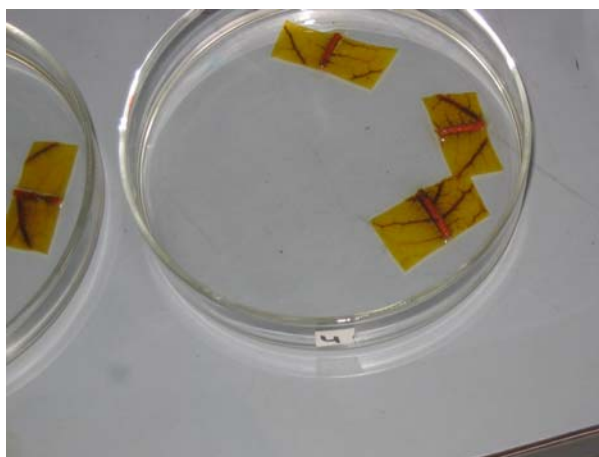
Fragmentos de hoja iniciando el proceso de desclorofilación



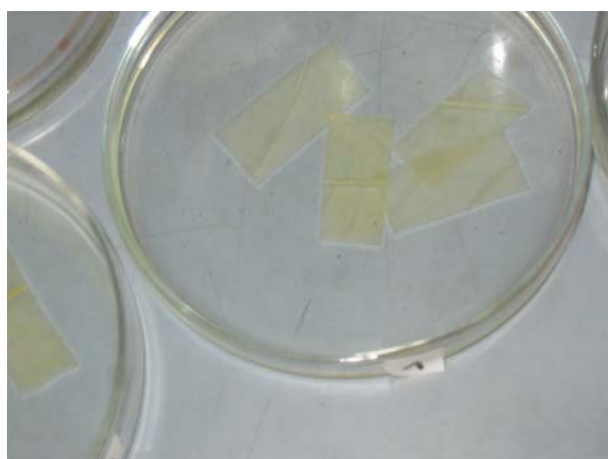
Fragmentos de hoja en KOH y alcohol



Fragmentos de hoja iniciando el proceso de clarificación el cloro



Fragmentos de hoja ya clarificados



Hojas blanqueadas en Hidrato de cloral



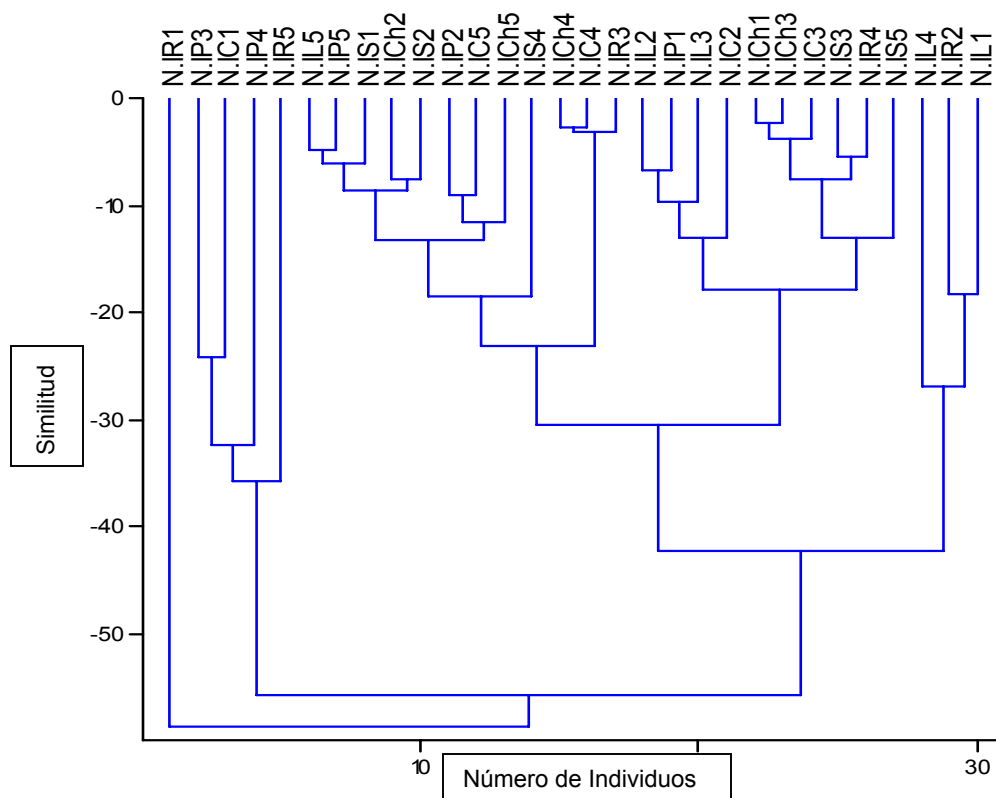
Hojas diafanizadas y teñidas en Safranina al 1%

Anexo 7: Laminillas con el disociado débil de *N. lobata*.

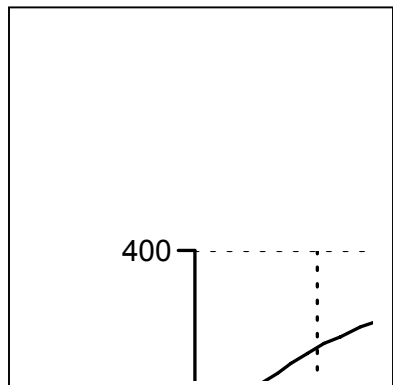


(Fuente: Fotografías de Nathalia Granados Dieseldorff, Laboratorio de Farmacobotánica, Facultad de CCQQ y Farmacia, USAC)

Anexo 8: Gráfica del Análisis de Cluster



Anexo 9: Gráfica del Análisis de Componentes Principales



Componente 1

En los anexos 8 y 9 se presentan abreviaciones que indican la especie *Neurolaena lobata* (N.l) seguidas de una letra que representan la población de donde fue colectada (R: Retalhuleu, L: Livingston, Ch: Chiquimula, C: Cobán, S: Suchitepéquez, P: Petén) y éstas, a su vez, seguidas de un número del 1 al 5, que se refieren al número del individuo que se colectó en x población.

Anexo 10: Tablas de los resultados de pruebas histoquímicas

Pruebas histoquímicas en cortes transversales de Izabal

	ALCALOIDES (Dragendorff)	TANINOS (Sulfato Férrico)	GRASAS (Sudán IV)	LIGNINA (Fluoroglu cina)	MUCILAGO (Azul de Cresil)	CRISTALES (HCl al 1%)
Ind. 1	+++ (en mesófilo)	+++ (mesófilo y tricomas)	++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 2	++ (mesófilo)	+++ (mesófilo y tricomas)	++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 3	++ (mesófilo)	++ (mesófilo y tricomas)	++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 4	+ (mesófilo)	+++ (mesófilo y tricomas)	++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 5	+++ (mesófilo)	+++ (en todo el tejido)	++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-

Fuente: Datos Experimentales

Pruebas histoquímicas con infusión, Izabal

	ALCALOIDES (Dragendorff)	TANINOS (Sulfato Férrico)
Individuo 1	-	+++
Individuo 2	-	++
Individuo 3	-	+++
Individuo 4	-	+++
Individuo 5	+	+++

Fuente: Datos Experimentales

Pruebas histoquímicas en cortes transversales, Alta Verapaz

	ALCALOIDES (Dragendorff)	TANINOS (Sulfato Férrico)	GRASAS (Sudán IV)	LIGNINA (Fluorogluc ina)	MUCILAG O (Azul de Cresil)	CRISTALES (HCl al 1%)
Ind. 1	+++ (en mesófilo)	+++ (mesófilo)	+++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 2	++ (mesófilo)	+++ (mesófilo y tricomas)	+++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 3	++ (mesófilo)	+++ (mesófilo y tricomas)	+++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 4	+++ (mesófilo y tricomas)	+++ (mesófilo y tricomas)	+++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 5	+++ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	+++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-

Fuente: Datos Experimentales

Pruebas histoquímicas en infusión, Alta Verapaz

	ALCALOIDES (Dragendorff)	TANINOS (Sulfato Férrico)
Individuo 1	+	+++
Individuo 2	-	+++
Individuo 3	-	+++
Individuo 4	+	+++
Individuo 5	-	+++

Fuente: Datos Experimentales

Pruebas histoquímicas en corte transversal, Petén

	ALCALOIDES (Dragendorff)	TANINOS (Sulfato Férrico)	GRASAS (Sudán IV)	LIGNINA (Fluorogluc ina)	MUCILAG O (Azul de Cresil)	CRISTALES (HCl al 1%)
Ind. 1	+ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	-	-	-	-
Ind. 2	++ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	++ (en vena central)	-	-	-
Ind. 3	+ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	+++ (en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 4	+ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	+ (en todo el mesófilo)	-	-	-
Ind. 5	++ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	++ (mesófilo)	-	-	-

Fuente: Datos Experimentales

Pruebas histoquímicas en infusión, Alta Verapaz

	ALCALOIDES (Dragendorff)	TANINOS (Sulfato Férrico)
Individuo 1	-	+++
Individuo 2	-	++
Individuo 3	-	+++
Individuo 4	-	+++
Individuo 5	-	++

Fuente: Datos Experimentales

Pruebas histoquímicas en cortes transversales, Retalhuleu

	ALCALOIDES (Dragendorff)	TANINOS (Sulfato Férrico)	GRASAS (Sudán IV)	LIGNINA (Fluorogluc ina)	MUCILAG O (Azul de Cresil)	CRISTALES (HCl al 1%)
Ind. 1	++ (en mesófilo)	+++ (mesófilo)	+++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 2	+++ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	++ (precipitación roja en todo el	-	-	-

			tejido)			
Ind. 3	++ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 4	++ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 5	+++ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-

Fuente: Datos Experimentales

Pruebas histoquímicas en infusión, Retalhuleu

	ALCALOIDES (Dragendorff)	TANINOS (Sulfato Férrico)
Individuo 1	-	+++
Individuo 2	+	+++
Individuo 3	-	+++
Individuo 4	-	+++
Individuo 5	+	+++

Fuente: Datos Experimentales

Pruebas histoquímicas en cortes transversales, Suchitepéquez

	ALCALOIDES (Dragendorff)	TANINOS (Sulfato Férrico)	GRASAS (Sudán IV)	LIGNINA (Fluorogluc ina)	MUCILAG O (Azul de Cresil)	CRISTALES (HCl al 1%)
Ind. 1	+ (en mesófilo)	+ (mesófilo)	-	-	-	-
Ind. 2	++ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	-	-	-	-
Ind. 3	+++ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	-	-	-	-
Ind. 4	++ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	-	-	-	-
Ind. 5	++ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	-	-	-	-

Fuente: Datos Experimentales

Pruebas histoquímicas en infusión, Suchitepéquez

	ALCALOIDES (Dragendorff)	TANINOS (Sulfato Férrico)
Individuo 1	-	+
Individuo 2	-	++
Individuo 3	-	+++
Individuo 4	-	+++
Individuo 5	-	+++

Fuente: Datos Experimentales

Pruebas histoquímicas en cortes transversales, Chiquimula

	ALCALOIDES (Dragendorff)	TANINOS (Sulfato Férrico)	GRASAS (Sudán IV)	LIGNINA (Fluorogluc ina)	MUCILAG O (Azul de Cresil)	CRISTALES (HCl al 1%)
Ind. 1	+++ (en mesófilo)	+++ (mesófilo)	+++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 2	+++ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 3	+++ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 4	+++ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-
Ind. 5	+++ (mesófilo)	+++ (mesófilo)	++ (precipitación roja en todo el tejido)	-	-	-

Fuente: Datos Experimentales

Pruebas histoquímicas en infusión, Chiquimula

	ALCALOIDES (Dragendorff)	TANINOS (Sulfato Férrico)
Individuo 1	-	+++
Individuo 2	-	++
Individuo 3	-	+++
Individuo 4	-	+++
Individuo 5	-	++

Fuente: Datos Experimentales

Nathalia Granados Dieseldorff de López
Autora

M.Sc. Ana Carolina Rosales Zamora de Zea
Asesora

Ing. Agr. Jorge Mario Vargas Ponce
Revisor

Licda. Ana Rosalito Barrios de Rodas
Directora Escuela de Biología

Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto
Decano Facultad de C.C.Q.Q. y Farmacia