

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

**PROPUESTAS DE NORMAS DE CALIDAD FARMACOBOTÁNICA
DE CUATRO ESPECIES DE LEGUMINOSAS CON ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA COMPROBADA.**



**PRESENTADO POR
CARMEN SOFÍA ROJAS SAZO
NELLY CARMINA CRUZ PALENCIA
ANDREA ROXANA ROMÁN ESCOBAR**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICAS BIÓLOGAS**

GUATEMALA, MAYO DE 2011

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M. A.	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M. A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. José Roy Morales Coronado	Vocal IV
Br. Cecilia Liska De León	Vocal V

ÍNDICE

I.	ÁMBITO DE INVESTIGACIÓN	1
II.	RESUMEN	2
III.	ANTECEDENTES	4
A.	Control de calidad de drogas vegetales	9
1.	Calidad de los medicamentos	9
a)	Identidad	10
b)	Potencia	10
c)	Calidad	10
d)	Pureza	10
e)	Concentración	10
f)	Uniformidad	10
g)	Biodisponibilidad	11
h)	Estabilidad	11
2.	Control de calidad de plantas medicinales	11
3.	Control de calidad de la materia prima	11
a)	Autenticación	11
b)	Identidad	12
c)	Características organolépticas	12
d)	Perfil cromatográfico	12
e)	Humedad	12
f)	Cenizas	13
g)	Materia extraña	13
h)	Caracterización e identificación botánica	13
B.	Material vegetal en estudio	14
1.	<i>Diphysa robinoides</i> Benth.	
a)	Sinonimia	14
b)	Descripción botánica	14
c)	Hábitat	15
d)	Usos medicinales	15

e) Farmacología	15
f) Composición química	16
2. <i>Hymenaea courbaril</i> Lasseigne.	
a) Sinonimia	16
b) Descripción botánica	16
c) Hábitat	17
d) Distribución	17
e) Usos medicinales	18
f) Farmacología	18
g) Composición química	18
3. <i>Phaseolus lunatus</i> Linn.	
a) Sinonimia	19
b) Descripción botánica	19
c) Hábitat	20
d) Distribución	20
e) Usos medicinales	20
f) Farmacología	20
4. <i>Senna occidentalis</i> Britt. & Rose.	
a) Sinonimia	21
b) Descripción botánica	21
c) Hábitat	21
d) Distribución	21
e) Usos medicinales	21
f) Farmacología	22
g) Composición química	23
IV. JUSTIFICACIÓN	24
V. OBJETIVOS	25
VI. HIPOTESIS	26
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	27
VIII. RESULTADOS	42
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	132
X. CONCLUSIONES	144

XI.	RECOMENDACIONES	146
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
XIII.	ANEXOS	153

I. ÁMBITO DE INVESTIGACIÓN

Este proyecto forma parte de la línea de investigación en plantas medicinales que se desarrolla en el departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, donde se realizó. Las plantas fueron seleccionadas porque en estudios previos demostraron actividad antimicótica *in vitro*, con estos resultados se espera ampliar la base de datos del departamento sobre dichas plantas y al mismo tiempo garantizar un adecuado control de la calidad del material a ser utilizado en estudios posteriores; sin importar si este se encuentra fresco, seco o fragmentado. Además estas propuestas incidirán en la elaboración de monografías de control de calidad de plantas medicinales, que facilitarán el registro de productos conteniendo estas drogas vegetales.

II. RESUMEN

Los productos medicinales de origen fitoterapéutico han tomado auge en los últimos tiempos como coadyuvantes en el tratamiento de afecciones comunes, debido a su amplia gama de acciones terapéuticas y sus bajos efectos secundarios en el organismo humano.

Guatemala es un país que contiene una extensa flora medicinal y por ende necesita de regularizaciones para que una droga vegetal cumpla con las especificaciones de control de calidad de los medicamentos vigentes en nuestro país.

Para una completa estandarización de los medicamentos herbarios, se debe de iniciar analizando la identidad de la planta, debido a que el material vegetal es el que forma parte activa del medicamento y la que tiene las características de potencia, eficacia y calidad del producto terminado.

Para lograr la calidad de un producto fitoterápico, es necesario describir parámetros que sirvan para verificar la calidad de una droga vegetal; por esta razón se realizó esta investigación, en la cual se establecieron propuestas de normas de control de calidad fármacobotánica empleando 4 especies de leguminosas: *Diphysa robinoides* Benth, *Hymenaea courbaril* Lasseigne, *Phaseolus lunatus* Linn y *Senna occidentalis* Britt & Rose, las cuales tienen actividad antifúngica comprobada.

Para cada una de estas especies se establecieron parámetros de identidad macroscópicas en los cuales se determinó la identidad botánica a través de la observación de la planta y su correcta identificación a través de la elaboración de ejemplares de herbario. Los parámetros micromorfológicos, se determinaron por medio de la realización de láminas de referencia a través de las metodologías de cortes a mano alzada, diafanizado y disociado las cuales permitieron identificar aspectos distintivos de cada una de las especies siendo éstos el tipo y la disposición de los haces vasculares, el tipo y la ubicación de los estomas, los diversos tipos de tricomas, entre otros; con los que se elaboraron cartillas micrográficas de los aspectos distintivos de cada una de las especies. Para los parámetros fitoquímicos se realizaron cortes a mano alzada del folíolo, peciólulo y pecíolo de la planta fresca, en los

cuales se determinaron sus metabolitos secundarios siendo éstos alcaloides, mucílagos, taninos, saponinas, grasas y aceites; se determinaron flavonoides por los ensayos de cianidina y leucoantocianina; además de los constituyentes inertes lignina y únicamente aleuronas en las semillas de *P. lunatus*. Por último se realizó la metodología de cromatografía en capa fina para la cual se emplearon extractos de cada una de las especies en estudio evidenciando la presencia de los metabolitos secundarios tales como: saponinas, flavonoides, antraquinonas, alcaloides y aceites volátiles.

Respecto a los parámetros de pureza, se verificó el porcentaje de humedad del material vegetal resultando inferior al 10% tal y como lo establece la Organización Mundial de la Salud; el porcentaje de cenizas totales se obtuvo mediante 4 repeticiones, variando el resultado dependiendo de la especie.

Los parámetros anteriormente realizados a cada una de las especies de leguminosas con actividad antifúngica comprobada, contribuirán a la elaboración de monografías de control de calidad de las especies nativas en estudio; con la finalidad de garantizar que las drogas vegetales frescas o secas provenientes de estas plantas que se utilicen ya sea en investigación o en la elaboración de fitofármacos; estén plenamente identificadas antes de su uso.

III. ANTECEDENTES

En 1978 la Organización Mundial de la Salud (OMS), describe a una planta medicinal como cualquier planta que en uno o más de sus órganos contenga sustancias que poseen actividad farmacéutica; cuando es empleada con esta finalidad adquiere las características de un medicamento y por lo tanto, debe reunir ciertas cualidades a fin de asegurar: calidad, seguridad y eficacia (1).

Así uno de los aspectos más importantes para la elaboración de fitofármacos, se refiere al cumplimiento estricto de todas las normas de calidad. El control de calidad es el conjunto de técnicas necesarias para estandarizar las características y propiedades esenciales del producto natural que determinen las especificaciones requeridas para cumplir potencialmente con los propósitos para los cuales se destina (1, 2).

La función de dicho proceso consiste en la colección de muestras, análisis, caracterización de sus especificaciones, metodologías, procedimientos de organización, documentación y aprobación; de tal forma que los materiales sean autorizados para su uso y los productos aprobados para su distribución, venta y no se limita a las operaciones de laboratorio sino que debe estar presente en todas las decisiones concernientes a la calidad del producto (3).

La calidad es medida según las características del producto como si cumple o no cumple, en relación con los estándares de calidad contra los que los compara el fabricante, el cliente o consumidor. Así pues, se entiende por calidad el grado o lugar que ocupan los productos al ser comparados entre sí y por la medida en que satisfacen estándares tanto internos como externos.

El proceso que se realiza a las plantas medicinales, desde el punto de vista agrotecnológico, la elaboración y control de calidad de los fitofármacos se encuentra normado. Se cuenta con buenas prácticas, normas de cultivo, cosecha, lavado, secado, normas de elaboración y control de calidad de cada una de las plantas medicinales utilizadas (4).

La calidad es un requisito básico que los medicamentos a base de plantas deben de cumplir, su importancia se centra en que una vez que la materia prima utilizada cumpla con todos los requisitos será mucho más fácil seguir los pasos para su transformación industrial. En cambio si la materia prima no llena los requisitos de calidad aunque se disponga de un laboratorio altamente equipado para el control y procesamiento, no será posible cumplir con las normas establecidas para el producto final; por tanto es de vital importancia vigilar cada etapa del ciclo desde su plantación, colecta y selección para asegurar una fabricación correcta y la eficacia terapéutica del producto terminado, siendo este utilizado como una terapia causal y racional en el tratamiento de enfermedades (3, 5, 6).

En 1978 Cerón, en su manual fitoterapéutico menciona que las plantas medicinales contienen sustancias de valor terapéutico; por lo que se hace necesario establecer y aplicar criterios y métodos científicos para comprobar características de calidad como inocuidad, el establecimiento de normas y especificaciones internacionales de identidad, pureza y actividad de los productos derivados de plantas medicinales en países donde no se han establecido ejemplificándose en ésta Perú (7).

En varios países y también en Guatemala se han realizado estudios sobre diferentes plantas, dichos estudios enfatizan la importancia del control de calidad de las plantas medicinales. Así también hacen referencia a diversas técnicas que pueden emplearse con dichos propósitos, entre ellos podemos mencionar como ejemplo el de Girón y colaboradores, que presentaron en un Simposio sobre Biología de Salud Tropical el estudio “Control de calidad y sanitario en muestras de plantas medicinales distribuidas en la ciudad de Guatemala”, el cual consistió en el análisis de 13 muestras de plantas escogidas por su frecuencia de consumo en diferentes centros distribuidos en la ciudad capital; se realizaron observaciones macroscópicas, organolépticas y posteriormente se determinó si presentaron materias extrañas y exámenes microbiológicos sanitarios, lo cual se realizó para verificar la calidad de la droga vegetal comercializada (8).

En Argentina, Bela y otros presentaron su estudio “Control de calidad de materias primas vegetales con fines farmacéuticos, Manzanilla, *Matricaria recutita* L.”; la droga de dicha planta está constituida por las cabezuelas florales o inflorescencias (capítulos) secas, los

componentes más importantes que se obtienen de las cabezuelas de la planta son los aceites esenciales y los flavonoides (principalmente apigenina), quienes son los responsables prácticamente de todos los efectos farmacológicos de esta planta. Se evaluaron 3 marcas comerciales de fitofármacos, el control de calidad incluyó: 1. Identificación de la especie, observación macroscópica y microscópica, siendo la última evaluada por el método de Diafanizado de Sorem; 2. Ensayos de pureza, mediante la evaluación de material extraño; 3. Dosificación de aceites esenciales por el método de destilación con dispositivo tipo Claevenger y 4. Evaluación del estado de conservación de las muestras, evaluando características organolépticas del envasado y etiquetado del producto final. Se encontró que ninguna de las marcas cumplen con el requisito de calidad establecido por la VI edición de la Farmacopea Nacional de Argentina, la cual indica que debe de contener menos del 2% de materias extrañas y no más del 10% de otras partes del mismo vegetal; además ninguna está libre de impurezas lo que refleja una falta en el control de calidad de las técnicas de envasado lo que conlleva a una disminución de la calidad de la droga contenida afectando su seguridad y eficacia (9).

En Cuba, Trueba y colaboradores mostraron los resultados del estudio “Evaluación de la actividad antioxidante de *Justicia pectoralis* Jacq. (Tilo)”, para ello se empleó una muestra de polvo seca obtenida a partir de dicha planta mediante desarrollo tecnológico elaborado por el departamento de Productos Naturales del Centro de Investigación y Desarrollo de Fitofármacos. Para evaluar la actividad antioxidante de la planta, llevada a cabo por sus metabolitos secundarios, se realizó análisis del control de calidad en el cual se evaluaron las características organolépticas y la identificación de cumarinas, polifenoles totales, aminoácidos, aminos y flavonoides, mediante técnicas de caracterización de plantas, encontrándose que las muestras analizadas cumplían con los parámetros exigidos por la técnica del fabricante (10).

Varela y Gurni, presentaron los resultados de la tesis “Análisis micrográfico de dos hemiparasitarias argentinas usadas en medicina popular y su aplicación en el control de calidad de las especies *Loranthaceae* y *Psittacanthus cordatus* Hoff. ex Schult”. Para los fines se analizaron hojas y tallos de ejemplares que crecen sobre diferentes hospedantes y en árboles aplicando análisis macro y microscópico (fijados en formalina aceto-alcohólica y

coloración con safranina), determinación del índice de estomas y caracterización de cristales. Con dicho estudio se lograron establecer parámetros micrográficos que diferenciarán dichas especies además de proponer metodologías alternativas para el control de calidad de las mismas para ser utilizadas en el comercio (11).

Pérez y colaboradores, mostraron los resultados de la “Caracterización y estudio fitoquímico de *Cassia alata* L., distribuida en Cuba”. Con esta finalidad se analizó el extracto fluido y se caracterizó el extracto crudo de la planta junto con la determinación de los metabolitos secundarios que le dan actividad antiherpética, anticatarral, diurética y contra infecciones cutáneas. Para la obtención del extracto etéreo, acuoso y alcohólico, se realizaron extracciones sucesivas con disolventes de polaridad creciente. En la identificación de los metabolitos secundarios se emplearon pruebas o técnicas selectivas para un determinado compuesto, realizándose en cada extracto los ensayos específicos para los metabolitos de estudio. Los metabolitos encontrados fueron quinonas, flavonoides, saponinas, entre otros. Por tratarse de una droga cruda con miras de uso fitoterapéutico se aplicó el control de calidad fitoquímico, encontrándose que los metabolitos mencionados con anterioridad son los que desarrollan su actividad medicinal (12).

Rodríguez, presentó la caracterización de extractos farmacéuticos de 4 árboles de uso medicinal en Guatemala. Dicho trabajo presentaba como finalidad caracterizar y estandarizar los extractos de los árboles: *Simarouba glauca* DC. (Aceituno), *Psidium guajava* L. (Guayaba), *Byrsonima crassifolia* L. Kunth. (Nance) y *Tecoma stans* L. Juss. ex Kunth. (Timboco), especies vegetales con actividad medicinal. Dichos procesos se llevaron a cabo mediante el análisis organoléptico, fisicoquímico y fitoquímico, los cuales respaldaron el control de calidad de dichas esencias al momento de usarlas con fines medicinales. Las partes analizadas fueron hojas y corteza, en las cuales se han encontrado propiedades medicinales importantes, *S. glauca* presentó actividad antiplasmódica; *P. guajava* actividad antibiana y antibacteriana; *B. crassifolia* actividad antifúngica y antiinflamatoria; y *T. stans* acción hipoglucemiante (13).

Peña, Rodríguez y otros presentaron los resultados del estudio “Estandarización y tamizaje fitoquímico de extractos de frutos de *Punica granatum* L., comercializados en Cuba”, esta

es una especie vegetal cuyo fruto es rico en vitamina C, antocianinas, tiamina y riboflavina; presenta otros componentes químicos que le atribuyen importantes propiedades biológicas para el tratamiento de enfermedades tumorales y es utilizada en medicina tradicional por sus propiedades antiparasitarias, antiinflamatorias y anticatarrales, de ahí la importancia de realizar control de calidad del material vegetal; en este se obtuvo la pureza de la droga y en la estandarización de los diferentes extractos sus propiedades físicas fueron similares y en el tamizaje fitoquímico, el extracto hidroalcohólico presentó alcaloides, glucósidos cardiotónicos, taninos y flavonoides (14).

Durante 1983-1989, se realizaron 5 trabajos de tesis en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia -USAC-, en los cuales se detectaron 100 plantas usadas para tratamiento de infecciones dérmicas; solo a 44 se determinó la actividad contra dermatofitos, mediante pruebas de CIM en tubo, de las cuales 20 (45.5%) inhibieron algunos de los dermatofitos ensayados, para el cual *D. robinoides* B. (Guachipilín) mostró actividad contra *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *algodonosa* y *Trichophyton mentagrophytes* var. *granulare*, en concentraciones de 7.9 y 3 mg/dL (15).

En 1993 García, evaluó la actividad antimicrobiana de la hoja, corteza y raíz de *D. robinoides* mediante un modelo experimental *in vitro*; la fase experimental fue dividida en 3 partes. En la primera las tinturas de los órganos se probaron contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *T. mentagrophytes* var. *algodonosa*, *Trichophyton rubrum* y *E. floccosum*; para ello se empleó el método de difusión en disco para bacterias y dilución en agar para dermatofitos; encontrando que la corteza y la raíz provocaban sensibilidad a *S. aureus*, mientras que *T. rubrum* sólo fue sensible a la corteza, el resto de microorganismos no mostraron inhibición. Para la segunda y tercera se usaron diluciones en agar tanto para bacterias como para dermatofitos encontrando nuevamente que *T. rubrum* fue inhibido en un 90% por 6 g de tintura/mL de agar (16).

En el 2008 Suárez, presentó la evaluación de la actividad contra *Fonsecaea pedrosoi* de 7 especies de leguminosas popularmente usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones mucocutáneas, en el cual recalca que los extractos etanólicos de las especies

leguminosas, *H. courbaril* (Guapinol, hoja), *P. lunatus* (Frijol cimarrón, semilla) y *S. occidentalis* (Frijolillo, hoja), poseen actividad contra *F. pedrosoi*. Dicha afirmación, valida el uso popular de las especies con actividad antifúngica, para demostrarlo se realizó un bioensayo de tamizaje utilizando la metodología descrita por Brancato y Golding modificada por McRae y colaboradores (17).

En el 2009 García, mostró los resultados del estudio, “Inhibición del hongo *Sporothrix schenckii* por especies de leguminosas popularmente usadas en Guatemala para el tratamiento de micosis”. Se expone que mediante bioensayos de los extractos etanólicos de las especies de leguminosas *D. robinoides* (Guachipilín) e *H. courbaril* (Guapinol) se determinó la actividad antifúngica, contra la fase miceliar de *S. schenckii*, siendo la concentración mínima inhibitoria 1 y 0.5 mg/dL ($p < 0.10$) respectivamente. Para la fase levaduriforme no se encontró la misma actividad (18).

A. Control de calidad de drogas vegetales

Se denomina control de calidad al conjunto de técnicas y procedimientos utilizados para satisfacer los requisitos de la calidad y sirve para orientar, supervisar y controlar todas las etapas del proceso hasta la obtención de un producto en la calidad deseada (19).

1. Calidad de los medicamentos

La calidad del proceso de producción de un medicamento está determinada por el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura, sin embargo la calidad debe conservarse a lo largo de la trayectoria que sigue el medicamento, hasta el momento en que el paciente lo consume. Se debe mantener durante el período de vida útil, que el fabricante ha establecido, período en el cual debe cumplir con los requisitos de calidad, seguridad y eficacia y así mismo con las características que el producto posee de identidad, pureza, potencia, uniformidad, seguridad, estabilidad y biodisponibilidad; si el medicamento posee estas características, será eficaz en el funcionamiento al que fue dirigido (20).

La calidad del producto se va construyendo durante todas las fases de fabricación del mismo, por lo que ésta es efectuada bajo un control continuo del proceso el cual se realiza desde la selección de la materia prima, hasta la fase del envasado, etiquetado y almacenamiento del producto final. Entre las características de calidad del producto terminado se mencionan:

a) Identidad: Confirmación de la presencia en un producto farmacéutico de los ingredientes de acuerdo con la etiqueta. Esta debe de establecer el principio activo y debe ser capaz de discriminar entre sustancias de estructuras moleculares parecidas (21, 22).

b) Potencia: Actividad farmacoterapéutica de los ingredientes activos, que deben encontrarse en cantidades suficientes para ejercer su acción y el contenido del producto se expresa en relación a la actividad de un patrón biológico de referencia (21, 22).

c) Calidad: Es la aptitud del medicamento para el uso al que se destina, la cual es determinada por su eficacia ponderada en relación a su seguridad, de acuerdo a la declaración rotulada o aquella promovida por el fabricante y su conformidad a las especificaciones de identidad, concentración, pureza y otras características. Se entiende que estos 2 grupos de factores son interdependientes, puesto que las especificaciones son establecidas para garantizar la eficacia y la seguridad (21, 22).

d) Pureza: Grado en el que una entidad química o biológica está presente en una sustancia. En el caso específico de productos medicamentosos, se refiere al grado en que están exentos de contaminantes potencialmente dañinos o no, incluyendo otros principios activos, productos de degradación, subproductos de síntesis, bacterias y otros microorganismos (21, 22).

e) Concentración: Constituye la cantidad porcentual del principio activo del medicamento, luego de determinarse por una valoración química y biológica (21, 22).

f) Uniformidad: Representa la propiedad que tiene cada unidad posológica de un mismo lote de suministrar la misma cantidad de principio activo (21, 22).

g) Biodisponibilidad: Característica en el cual un medicamento es absorbido y produce la acción terapéutica en el organismo (21, 22).

h) Estabilidad: Propiedad que tiene el producto de conservar las características durante su tiempo de utilización o vida útil (21, 22).

2. Control de calidad de plantas medicinales

Varios países han contribuido a la elaboración de normas de calidad, las cuales se encuentran recopiladas en Farmacopeas, así podemos citar a la British Herbal Pharmacopoea, American Herbal Pharmacopoea y la Farmacopea Europea.

3. Control de calidad de la materia prima

Para lograr una completa estandarización de los medicamentos herbarios, se debe de iniciar analizando la planta; controlando los pasos de producción antes de realizar el control final de los parámetros de seguridad de la línea de producción, debido a que el material vegetal es el que forma parte activa del medicamento y la que tiene las características de potencia, eficacia y calidad del producto terminado. Si se encontrase baja calidad del material vegetal o su inconsistencia, se hará imposible cualquier control de calidad significativo durante el proceso de elaboración de los productos fitoterapéuticos o será imposible asegurar la calidad del producto terminado (3, 21).

Para lograr la calidad de un producto, es necesario describir parámetros que sirvan para determinar la materia prima en su elaboración, es decir para describir la calidad de una droga vegetal; entre los que se pueden mencionar:

a) Autenticación: Definición clara y científica para la confirmación de la identidad del material vegetal; se realiza por medio de inspecciones visuales o microscópicas y realizando una comparación con estándares (23, 24).

b) Identidad: Permiten la identificación completa del material vegetal. Esta identificación se puede realizar a través de características macroscópicas, microscópicas y fitoquímicas de la planta. La fitoquímica se realiza a través de la utilización de reacciones histoquímicas entre las que se encuentran: La presencia de granos de almidón y de aleurona, la detección de paredes celulósicas, lignificadas, suberificada y cutículas, cristales de carbonato y oxalato de calcio, y metabolitos esenciales tales como: grasas, aceites volátiles, resinas, mucílagos, taninos, etc. (3, 21, 22, 25-27).

c) Características organolépticas: Es la evaluación del material vegetal a través de sus características siendo percibidos por los sentidos, evaluando color, olor, sonidos o chasquidos, frescura, consistencia, textura, entre otros (21).

d) Perfil cromatográfico: Es la clasificación de las plantas basada en sus constituyentes químicos activos, los constituyentes químicos más comúnmente encontrados son metabolitos primarios y secundarios; los cuales contribuyen a la identificación del material vegetal. Entre los constituyentes se encuentran: alcaloides, flavonoides, saponinas, arbutina, antracenos, aceites esenciales, glicósidos cardiotónicos, cumarinas y ácidos fenolcarboxílicos, entre otros. Estos constituyentes son conocidos por tener actividad farmacológica y además son la base de la quimiotaxonomía de la planta; éstos suelen ser específicos en ciertas clases botánicas, órdenes y familias e inclusive suelen ser exclusivos de especies por lo que pueden ser usados como compuestos marcadores que identifican apropiadamente el material vegetal (21, 23, 25-27).

e) Humedad: Permite determinar el agua libre que contiene el material vegetal, además conocer si el proceso de secado fue el correcto para conservar su calidad y así proveer un mejor almacenamiento y conservación evitando las reacciones de enmohecimiento y la contaminación bacteriana, el contenido de humedad ha de ser inferior al 10% (28). El porcentaje de humedad se expresa de la siguiente forma:

$$\text{Humedad (\%)} = [\text{peso perdido (g)}/\text{peso inicial (g)}] \cdot 100$$

f) Cenizas: Constituyen el residuo después de la incineración de la planta, lo cual se obtiene por calcinación en mufla a 400°C durante 24 hrs. Las cenizas representan las sales inorgánicas que normalmente contiene la droga y las adheridas, así mismo la materia inorgánica que posiblemente se le añadió para adulterarla o las trazas de fertilizantes presentes. Su determinación es de gran importancia para juzgar la identidad, adulteración y la pureza de la droga vegetal. De las cenizas obtenidas se puede evaluar el contenido de elementos minerales disolviéndolos en HCl (1:1) (28). Las cenizas se expresan de la siguiente forma:

$$\text{Cenizas (\%)} = [\text{peso cenizas (g)}/\text{peso seco (g)}] \cdot 100$$

g) Materia extraña: Consiste en la identificación al ojo y estereoscópicamente de las características de la muestra en análisis de cualquier material, contaminación animal, vegetal, mineral o parte de la planta diferente a la conocida. Esto se evalúa realizando comparaciones con estándares obtenidos de especificaciones de farmacopeas propias de cada país o las normas internacionales, para materia extraña se acepta un 2% (28).

h) Caracterización e identificación botánica: La caracterización botánica es uno de los elementos que permite verificar el control de calidad del material vegetal, esto se realiza ya que las drogas vegetales tienen una serie de elementos apreciables observados bajo lupa o microscopio óptico, los cuales le son propios y característicos que permiten su correcta identificación. Primordialmente para la verificación de las propiedades del material vegetal se necesita su identificación a través de la designación por su nombre científico. En la droga vegetal se debe de indicar la especie, subespecie, variedad e indicar la cantidad estipulada de principio activo que la droga debe contener (28).

La identificación botánica se realiza comparando la droga con una droga patrón, con farmacopeas o literaturas especializadas realizando comparaciones por medios indirectos o directos. Los directos se realizan a ojo o con lupa de poco aumento los cuales nos dan caracteres macroscópicos y con ayuda de los sentidos se determina el aspecto general, la superficie y el sabor. Mientras que los indirectos se encuadran en 3 categorías: procesos físicos (microscopía y cromatografía), procesos químicos (reacciones de caracterización e incineración) y los procesos biológicos (hemólisis y hemoaglutinación) (28).

B. Material vegetal en estudio

1. *Diphysa robinoides* Benth.

Pertenece a la familia *Fabaceae*, es una leguminosa originaria de América tropical, cuyo nombre común es Guachipilín (Guatemala), Canquixté, Much, Palo Amarillo, Susuc, Zuzoc; y sus características botánicas lo ha diferenciado de otros grupos de leguminosas (29, 30).

a) Sinonimia: *Diphysa americana* Mill.; *D. carthaginensis* Benth.; *D. humilis* Oerst (31).

b) Descripción botánica: La corteza del tronco es de color pardo o café claro, áspero con un grueso de 1-2 cm y con canales a lo largo del árbol. Las ramas primarias son de igual forma que el fuste y las secundarias son de color verde a gris con lenticelas. El tronco generalmente no es cilíndrico si no de forma irregular desde su base hasta que se ramifica. El diámetro varía entre 30-40 cm y una altura de 5-20 m en la edad madura, dependiendo de las condiciones climáticas, suelo, etc. La albura es blanca amarillenta y el duramen de color café rojizo. La madera es pesada (peso específico 0.965), la textura mediana y de veta irregular. Las hojas son alternas, imparipinadas y caducifoliadas que tiene un largo que varía entre 3-13 cm. Eje central ensanchado en la base, con 3-13 hojuelas (29, 30).

Esta especie es caducifolia durante la época seca y con flores durante los meses de octubre-enero con pecíolos de 1-2 mm de largo. Ápice agudo o redondeado, base aguda haz verde mate. El envés verde claro mate. Las flores, pequeñas, amariposadas, de 1.5 cm de largo por 1 cm de ancho, dispuestas en pequeños racimos axilares. Los frutos se presentan en vainas indehiscentes, oblongas, huecas e infladas de color café pálido de 4-6 cm de largo por 1-2 cm de grueso. La capa exterior es delgada y frágil. Interiormente posee un tabique central longitudinal, delgado, que contiene varias semillas oblongas. Las vainas contienen entre 5-9 semillas color blanco crema de una longitud de 3-5 mm y un grosor de 2 mm (29, 30).

c) Hábitat: Es nativo del sur de México y Centro América, en bosques secos o húmedos de 600-2500 msnm, introducido en la República Dominicana. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, Huehuetenango, Quetzaltenango, Quiché, Retalhuleu, Sacatepéquez, San Marcos y Suchitepéquez (30).

d) Usos medicinales: Se utiliza con fines medicinales, por su propiedad cicatrizante y sudorífica. La infusión de las hojas se usa para el tratamiento de afecciones gastrointestinales (diarrea, disentería) y respiratorias (amigdalitis, asma), así como, anemia, dolor de cabeza, cáncer, gonorrea, malaria, mordedura de animales ponzoñosos, problemas renales y aliviar el parto. La decocción de corteza y madera se usa para el dolor de cabeza y gastralgia. La infusión o decocción de hojas y corteza se usan tópicamente para el tratamiento de afecciones dermatomucosas (abscesos, conjuntivitis, heridas abiertas, leishmaniasis, llagas, tineas). A las hojas y corteza se les atribuye propiedad anticonvulsiva, antiséptica, cicatrizal, desinflamante, febrífuga y sudorífica (17).

e) Farmacología: Estudios de la actividad antibacteriana demuestran que la tintura de las hojas es activa contra *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *S. aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, pero inactiva contra *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*; la mejor actividad antibacteriana se encontró en los extractos etanólico y acetónico, la Concentración Mínima Inhibitoria –CIM- fue de 5 mg/mL para *S. typhi* y *S. flexneri*; 8 mg/mL para *S. aureus* y 10 mg/mL para *S. pneumoniae*. La tintura de las hojas de *D. robinoides* es activa contra *Neisseria gonorrhoeae* y tiene un espectro de la inhibición del 80% de cepas de proveniencia clínica recientemente aislada. La tintura de la corteza de *D. carthagenensis* inhibe el crecimiento de *S. typhi*, *S. dysenteriae* y *S. flexneri*, con una CIM de 1.4-1.8 mg/mL, mientras que la maceración de las hojas no mostró actividad antimicrobiana (32).

Estudios de la actividad antifúngica demuestran que la decocción de hojas de *D. carthagenensis* inhibe *E. floccosum*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*; la CIM fue de 100 mg/mL para *T. mentagrophytes* y 1000 mg/mL para los otros dermatofitos, presenta actividad fungicida. La decocción de *D. robinoides* es activa contra *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*; la CIM fue de 300 mg/mL para *T. mentagrophytes*, presenta actividad fungistática; la mayor actividad se encuentra en la corteza y raíz y los

mejores disolventes fueron etanol y acetato de etilo, con una CIM de 50 mg/mL. Por su actividad antibacteriana, antifúngica y cicatrizal, las hojas y corteza están indicadas para uso tópico en el tratamiento de llagas, úlceras e infecciones dermatomucosas, en forma de pomada, ungüento o tintura. Por su acción antifúngica y cicatrizal puede combinarse con Barbasco, Carao, Hierba del toro, Llantén, Nance, Quilete y Zarzaparrilla (30, 33-34). Los bioensayos de los extractos etanólicos de *D. robinoides* demostraron actividad antifúngica contra la fase miceliar de *S. schenckii*, siendo la CIM de 1 y 0.5 mg/dL, no encontrándose así actividad antifúngica para la fase levaduriforme (18).

f) Composición química: La madera y corteza contienen flavonoides y furanoides, terpenoides (β -sitosterol), benzopironas y flavonoides (difisolona, difisolidona y 4' metil éter, ferreirina, kievitona), isoflavanos, flavanos (5, 7, 4', 5'', 7'', 4''''-hexahidroxí-(3,3'')-biflavanona, stilbenos (trans-3,3',4', 5,5'-pentahidroxistilbene) y quinoides (lapachol)). Las hojas y corteza contienen taninos, alcaloides y triterpenos. La raíz contiene glicósidos saponínicos, taninos y triterpenos (30, 33).

2. *Hymenaea courbaril* Lasseigne.

Pertenece a la familia *Fabaceae*, es una leguminosa originaria de América tropical, de clima cálido y semicálido; cuyo nombre común Guapinol, Copinol, Palo colorado, Pac, Pacay (Petén), Pacoj (Alta Verapaz), Hoja de cuchillo (Jutiapa), Locust (Belice), Árbol de pinole, Algarrobo (Colombia); y sus características botánicas lo ha diferenciado de otros grupos de leguminosas. Es ampliamente conocido por una resina que exuda (35, 36).

a) Sinonimia: *Inga megacarpa* M.E. Jones; *Hymenaea animifera* Stokes; *H. candolleana* Kunth; *H. courbaril* var. *obtusifolia* Ducke; *H. courbaril* var. *stilbocarpa* Hayne A.T. Lee & Langenh.; *H. multiflora* Kleinhoonte; *H. resinifera* Salisb; *H. retusa* Wild. Ex Hayne; *H. stilbocarpa* Hayne (37, 38).

b) Descripción botánica: Árbol grande y robusto, subcaducifolio, de 10-40 m de altura, con un diámetro a la altura del pecho de 1.5-2 m. La copa redondeada muy densa, ampliamente extendida, con follaje denso verde claro y brillante. Las hojas alternas, asimétricas,

compuestas por un par de folíolos opuestos, de 5-10 cm de largo incluyendo el pecíolo, con algunos puntos aceitosos, translúcidos y una venación poco prominente. El tronco derecho, a veces cubierto en la base por una excreción gomosa amarillina; algunas veces desarrolla contrafuertes y ramas gruesas ascendentes. La corteza *Externa* ligeramente escamosa a lisa, pardo grisácea o pardo rojiza con manchas blancuzcas horizontales amorfas y la *Interna* rosada cambiando a ligeramente parda, fibrosa, de sabor astringente, con un grosor total de 10-20 mm y se ramifica a partir de la mitad del fuste y tiene ramas muy retorcidas. Las flores grandes blanco verdosas, extendidas, perfumadas, de 3.5 cm de diámetro. Se presentan en cimas densas terminales pubescentes de 10-15 cm de largo; cáliz verde crema, tubular carnosos en forma de campana y 5 pétalos blancos con puntos morenos, erguidos y extendidos, que apenas sobresalen del cáliz. Las flores se observan entre marzo- mayo y los frutos a partir de julio-marzo. Los frutos son vainas indehiscentes, ligeramente aplanadas, de 10-17.5 cm de largo por 4-6.5 cm de ancho, sumamente leñosas, verdosas a moreno oscuro, con pulpas harinosas, dulces y comestibles. Cuando se secan exudan una resina pegajosa y fragante. El fruto contiene 3-4 semillas y permanece largo tiempo en el árbol (7-10 meses). Los frutos son tipo legumbre con una cáscara leñosa muy dura, pero entre la cáscara y las semillas tiene un polvo blanco que los indígenas lo usaron como ingrediente de la mazamorra, se les puede ver maduros colgando en el árbol por un período prolongado, sus frutos son principalmente apetecidos por animales como la *Dasyprocta punctata* (guatusa o cherenga) (35, 36).

c) Hábitat: Próspera en terrenos degradados y malos aunque prefiere tierras húmedas y fértiles. Crece cerca de ríos o corrientes de agua, sobre lomeríos y pendientes. Su mejor crecimiento ocurre donde hay una precipitación de 1,900-2,150 mm/año, pudiendo crecer en áreas con sólo 1,200 mm/año. Crece en temperatura media anual de 20-30°C. Se desarrolla en suelos de origen volcánico y aluvial, con pH de 4.8-6.8, preferentemente en regiones bajas y cálidas; y suelos arenoso, poroso, amarillo y rojizo-arcilloso. Crece desde el nivel del mar hasta cerca de unos 900 m (32, 35, 36, 39).

d) Distribución: Se encuentra distribuida desde el Sureste de México, América Central hasta el norte de Brasil, Bolivia y Perú. En el país se encuentra principalmente en las laderas o planicies secas, en Alta Verapaz, Baja Verapaz, El Progreso, Escuintla,

Guatemala, Huehuetenango, Izabal, Jutiapa, Petén, Quetzaltenango, Retalhuleu, San Marcos y Santa Rosa (32, 35, 36, 39).

e) Usos medicinales: La resina se utiliza como barniz y pegamento, también en el tratamiento de la bronquitis, asma y resfriados. Con la corteza se prepara un remedio para combatir enfermedades renales y las inflamaciones de la vejiga y la próstata. La pulpa harinosa y de olor nauseabundo que rodea las semillas es comestible y muy nutritiva. Las resinas son muy utilizadas en la medicina popular contra afecciones de la vía respiratoria, también como antiséptica, antidiarreica, sedante nerviosa, vermífuga y contra la diabetes (32, 35, 36, 39).

f) Farmacología: Se ha demostrado que las hojas presentan una actividad antitumoral probada en ratones con carcinoma de pulmón de Lewis, la decocción de tallo presentó actividad diurética al evaluarse en ratas por vía nasogástrica. En su composición contienen como principio activo taninos que se han descrito como los responsables de la actividad antitumoral de esta planta; así mismo, se ha utilizado la resina producida por esta planta para tratar enfermedades de los órganos respiratorios, úlceras, lesiones venéreas y heridas. La cáscara del fruto sirve para la fatiga, la pulpa seca de las semillas y la corteza actúan como antihelmíntico, además la corteza es un sedante arterial y astringente, la decocción de la cáscara del fruto se utiliza para tratar el asma. El cocimiento de la corteza se usa por vía oral para tratar afecciones gastrointestinales diarrea, parásitos intestinales y úlcera gástrica; exantemas, fiebre, gripe, hematuria, tos, enfermedades renales y purificar la sangre (27, 32, 35, 36).

Actualmente se ha demostrado que las hojas presentan actividad contra *F. pedrosoi* a través de los extractos etanólicos, para el tratamiento de infecciones mucocutáneas; también presentan actividad antifúngica para *S. schenckii* contra la fase miceliar siendo la CIM de 1 y 0.5 mg/dL y para la fase levaduriforme no se encontró la misma actividad (18, 19).

g) Composición química: Las hojas y corteza del tronco contienen una resina y taninos. Las principales resinas que posee son oleorresinas, gomorresinas y glicorresinas. El compuesto principal de la resina del tronco es el diterpeno ácido labd-13-en-8-ol. Los principales

componentes de la resina de las hojas son los diterpenos cariofileno y alfa y beta-selineno. De las hojas y el tallo se han aislado los flavonoides astilbin y beta-sitosterol. En los aceites esenciales de la hoja y el tallo, se han detectado sesquiterpenos beta-bourbono, cariofileno, ciclossativeno, humuleno, alfa-mururoleno y monoterpeneo delta-cadineno. También en las hojas se ha indicado la presencia de un monoterpeneo el delta cadineno, además de los sesquiterpenos gamma-cadineno, cariofileno, alfa y beta-copaeno, alfa y beta- humuleno, alfa y beta-selineno. Se han demostrado también nuevos constituyentes como 3-O-rhamnosidos-5-7-3-4-tetrahidroxiflavonol 1 (32, 35, 36, 39).

3. *Phaseolus lunatus* Linn.

Pertenece a la familia *Fabaceae*, es una leguminosa originaria de América Central y Suramérica, cuyo nombre común Frijol Cimarrón, Chilipuca, Chilipuco, Frijol reina, Frijol mantequilla, Queen bean, Frijol lima, Judía Limeña, Frijol viterra y sus características botánicas, lo ha diferenciado de otros grupos de leguminosas (39).

a) Sinonimia: *Phaseolus bipunctatus* Jacq; *P. limensis* Macfad; *P. viridis* Piper.; *P. inamoenus* Blanco, *P. ilocanus* Blanco, *P. tunkinensis* Lour., *P. vexillatus* Blanco, *P. vulgaris* Blanco (40).

b) Descripción botánica: Raíces fibrosas y tuberosas, muy penetrantes pueden engrosarse mucho; los tallos glabros de 0.5-4 m de largo, según el hábito de la planta; las hojas trifoliadas, folíolos ovados a deltoides, a veces romboide-ovados, ápice deltoide, base redondeada, 6-8 x 4-6 cm, glabros o esparcidamente pubescentes. Los pecíolos más largos que el folíolo central, estípulas pequeñas pero evidentes, 0.5-1 mm de largo, persistentes; inflorescencia axilar o lateral, en pseudoracimos cortos o alargados, hasta 25 cm de largo. Las flores con estandarte verde por contener clorofila, alas y quillas blancas, lilas o púrpuras, de 1.5 cm de largo, cáliz campanulado, 2-3 mm de largo, estandarte ancho y plano, 1 cm de largo, puberulento por fuera, quilla espiralada; fruto plano, falcado-oblongo, ligeramente túrgido alrededor de las semillas, 3-8 x 1-2 cm, glabro. Contiene de 2-4 semillas, reniformes, comprimidas y de color negro, gris café o moteado (41).

c) Hábitat: Es originario de Centro y Suramérica. La domesticación de cultivares salvajes de este frijol tuvo lugar 2 veces y en lugares distintos; una en el noroeste de Suramérica alrededor del año 6,500 AC, donde se dio lugar a una variedad de semillas grandes (peso de 100 semillas: 54-280 g); y otra en Centroamérica, probablemente en Guatemala cerca del año 800 DC, donde se originó una variedad de semillas pequeñas (peso de 100 semillas: 24-70 g). En 1,300 DC se extendió a Norte América y fue hasta el siglo XVI que la especie llegó y comenzó a cultivarse en Europa y Asia (41).

d) Distribución: La forma silvestre de la semilla pequeña tipo Sieva se encuentra distribuida desde México hasta Argentina, generalmente por debajo de los 1,600 msnm, mientras que la forma silvestre de mayor tamaño tipo Lima se distribuye en Ecuador y en el norte del Perú entre los 320-2,030 msnm (39, 41).

e) Usos medicinales: El principal uso es como grano para alimento humano. El potencial como planta forrajera es de alto a moderado. Produce grandes cantidades de forraje de calidad moderada, que tiene una aceptación regular por el ganado bovino. El valor forrajero de las plantas verdes es limitado por su contenido del glucósido linamarina, el cual desprende ácido cianhídrico y se desarrolla en las últimas etapas de maduración estando muy concentrado, sobre todo, en las ramas más jóvenes y en las semillas, especialmente en las moteadas. Las semillas oscuras contienen menos toxinas que las moteadas, pero son de sabor amargo, mientras que las semillas claras se encuentran libres de linamarina (39, 41).

f) Farmacología: Se han realizado bioensayos de tamizaje sobre la actividad antifúngica para *F. pedrosoi*, en los que se ha demostrado que los extractos etanólicos de la semilla de *P. lunatus* posee actividad contra este, por lo cual es utilizado para el tratamiento de infecciones mucocutáneas (17).

4. *Senna occidentalis* Britt. & Rose.

Pertenece a la familia *Fabaceae*, es una leguminosa perteneciente de América tropical, de clima cálido y semicálido; cuyo nombre común Frijolillo (Guatemala), Café de Bonpland, Café cimarrón, Taperibá (Paraguay), Brusca (República Dominicana), Frijolillo, Comida de

murciélagos, Bricho (Honduras, Nicaragua, Panamá y Guatemala), Café moucha (Isla de Dominica), Aiterioba, Café ferruso (Colombia), Bricho y Hediondilla (México), Hierba hedionda (Cuba), Brusca hedionda (Venezuela) y sus características botánicas, lo ha diferenciado de otros grupos de leguminosas (42).

a) Sinonimia: *Cassia occidentalis* L.; *Ditremexa occidentalis* (L.) Britt. & Rose (43).

b) Descripción botánica: Se trata de una hierba robusta anual o perenne, perteneciente a la familia de las Caesalpináceas *Fabáceas*, caracterizada por presentar una altura de 1 m o más de alto, los pecíolos con glándulas en la base. Los folíolos de 4-6 pares ovalado-lanceolados, agudo o acuminados, 3-7 cm; las hojas de 10-30 cm de largo; racimos axilares, sépalos de 6-9 mm. Las flores con pétalos de 2 cm, amarillos. El fruto en vaina café oscuro, linear, plano, 6-12 cm largo, 6-9 mm de ancho. Las semillas ovales, café-olivo de 3-4 mm de largo (32).

c) Hábitat: Esta planta crece en bosques secos, semisecos y húmedos. Es común en lugares abandonados de las regiones tropicales y subtropicales de América, Asia y África (35, 36).

d) Distribución: Nativa de Centro y Suramérica, pero se presenta desde el sudeste de los Estados Unidos, Antillas, México, Centroamérica, parte tropical de América del Sur y trópico del viejo mundo. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Guatemala, Izabal, Jutiapa, Petén, Retalhuleu y Zacapa (32).

e) Usos medicinales: La decocción o infusión de las hojas y la raíz se utilizan oralmente para el tratamiento de afecciones gastrointestinales diarrea, dolor de estómago y estreñimiento; así mismo, para tratar enfermedades respiratorias catarro, cefalea, fiebre, gripe, resfrío y tos; fiebre amarilla, gonorrea, ictericia, problemas renales, reumatismo, inflamaciones de la matriz, reumatismo, menstruaciones dolorosas, complicaciones del hígado y desórdenes etnopsiquiátricos; además se les atribuye propiedad colagoga, depurativa, espasmolítica, laxante, purgante y vermífuga; a la raíz se le atribuye propiedad sedante (32). La decocción de las hojas se usa tópicamente en lavados y emplastos para el tratamiento de diversas afecciones de la piel como úlceras, heridas, eccemas, empeines,

erupciones, inflamaciones, salpullido, tiña, varicela y tumores inflamados (36). La decocción de las semillas se usa para el tratamiento de afecciones del riñón y vejiga, nervios, calmante cardiaco, palpitaciones, hipertensión, gastralgia y afecciones hepáticas; tópicamente se aplican en úlceras, tiña y se les atribuye propiedad antiinflamatoria, diurética, estomáquica, febrífuga, purgante, tónica y vulneraria (32). Las flores y raíces se usan para tratar afecciones digestivas y respiratorias (36).

Las hojas tienen derivados antracénicos que son responsables de la acción laxante y flavonoides que son diuréticos; lo que explica la acción depurativa, colagoga y laxante atribuida; los heterósidos antracénicos tienen efecto oxiótico que podría explicar el efecto de la contracción del músculo del útero en las pacientes parturientas. Las semillas contienen un polvo amarillento constituido por crisarobina, el cual es un producto de la reducción de ácido crisofánico, que es microcristalino, café a amarillo-naranja, inodoro, sin sabor, punto de fusión 203-204°C, ligeramente soluble en agua, etanol y éter, soluble en compuestos alcalinos y ácidos; que ha sido usado tópicamente para el tratamiento de psoriasis y otras enfermedades crónicas de la piel (32, 36).

f) Farmacología: Se ha demostrado la actividad antimicrobiana mediante la realización de estudios *in vitro* sobre actividad antiparasitaria, antimicótica y antibacteriana a partir de extractos de Frijolillo. En 1991, Cáceres A. y otros colaboradores demostraron que la decocción de la hoja tiene actividad inhibitoria *in vitro* sobre los dermatofitos *E. floccosum*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* (15) mientras que en 1992, Del Águila demostró que el extracto alcohólico de la hoja y raíz era activo para los mismos dermatofitos salvo *T. rubrum*, con una CIM de 50 µg. Así mismo, refirió que la actividad antifúngica de las hojas se atribuye a la antrona del ácido crisofánico y la actividad antibacteriana de las semillas al aceite esencial. La eficacia antibacteriana de las vainas sería atributo de los flavonoides. El extracto hidroetanólico al 50% demostró la mayor potencia extractiva para aislar los principios activos antimicrobianos, con una CIM de 100 µg/L (44).

Los extractos etanólicos de la hoja presentan actividad contra *F. pedrosoi*, por lo cual es utilizada para el tratamiento de infecciones mucocutáneas (17). El extracto acuoso con

concentración de 10 g de hoja/100 mL, resultó activo frente a *Bacillus subtilis* en forma similar al cloranfenicol y estreptomina. Así mismo, el extracto etanólico al 95% de las hojas en igual demostró ser activo contra *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* y varios dermatofitos. También el extracto hexánico ha resultado efectivo *in vitro* únicamente frente a *S. aureus* y *Pseudallescheria boydii* (32, 39).

La decocción de la hoja ha demostrado actividad antiinflamatoria a dosis de 1 g/k en el modelo de edema plantar en ratas inducido por carragenina y en el modelo de granuloma de algodón (42). Estudios farmacológicos demuestran que el extracto etanólico de las hojas protege significativamente contra el daño hepático experimental producido por tetracloruro de carbono y thioacetamida (32). La actividad laxante está determinada por la presencia de antraquinonas en los diferentes componentes de la planta y en la actividad dermatológica las semillas contienen un polvo amarillento constituido por crisarobina, el cual es muy empleado en psoriasis y otras enfermedades crónicas de la piel (42).

g) Composición química: Las hojas contienen antraquinonas crisofanol, emodina, funiculosina, fisción y derivados; alcanos y flavonoides derivados de la apigenina y vitexina, matencinol-7-ramnósido y jaceidina-7-ramnósido. El fisción es el 3-metil-éter de emodina, con propiedades similares a la aloe-emodina y el crisofanol. Las flores contienen antraquinonas fisción y emodina y β -sitosterol. La raíz antraquinonas casiolina, fisción y derivados, además de emodina, crisofanol y otros derivados, islandicina, helmintosporina, xantonina, pincelina, xantorina, ergocromo, esterigmatosistina, reína y casi-xantona. Flavonoides apigenina, vitexina, quercetol y kaempferol; aceite esencial y fitoesteroles. Las semillas contiene fitoesteroles, antraquinonas 0.85-1.25% destacando emodina, derivados del fisción-antrona y del fisción-diantrona; aceite esencial; crisarobina; N-metil-morfolina y N-metil-morfonalina (39, 42, 45).

IV. JUSTIFICACIÓN

La materia prima empleada para la elaboración de los productos medicinales de origen natural constituye la droga vegetal, ya que en ésta se encuentran todas las propiedades medicinales de las plantas que pueden ser empleadas como producto fitoterapéutico.

El creciente uso de productos de origen natural como coadyuvantes en el tratamiento de afecciones comunes, hace necesario emplear una droga vegetal de calidad que cumpla con las especificaciones del control de calidad.

Guatemala es un país que utiliza ampliamente plantas medicinales como una alternativa terapéutica para solucionar sus problemas de enfermedad. Las 4 leguminosas en estudio, *D. robinoides*, *H. courbaril*, *P. lunatus* y *S. occidentalis*; tienen actividad antifúngica y son empleadas como terapéuticas para infecciones dermatomucosas causadas principalmente por dermatofitos y *C. albicans* lo que hace importante establecer criterios para un buen control de calidad de la droga vegetal y así poder detectar las adulteraciones que puedan afectar su actividad terapéutica.

Ya que existe poco control en la calidad de la droga vegetal que se emplea para la elaboración de fitofármacos y a que la población guatemalteca le tiene una amplia confianza al uso de plantas medicinales para aliviar sus padecimientos, se hace necesario velar por que la droga vegetal cumpla con todas las especificaciones de calidad.

Debido a que las plantas en estudio son del tipo nativas, no se han descrito parámetros de identidad y pureza por lo que este estudio permitirá establecer normas de calidad farmacobotánica de las 4 especies de leguminosas; las cuáles indicarán si la droga vegetal distribuida es apropiada para su uso terapéutico y así mismo servirán para estandarizar parámetros los cuales contribuirán a elaborar monografías de control de calidad para garantizar que las drogas vegetales de estas especies de leguminosas sean un material que pueda ser utilizado como materia prima para fitofármacos.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Elaborar propuestas de normas de calidad farmacobotánica de cuatro especies de leguminosas con actividad antifúngica comprobada.

B. Objetivos específicos

1. Elaborar una descripción diagnóstica de las características macroscópicas de las cuatro leguminosas en estudio para su correcta determinación botánica.
2. Establecer parámetros de identidad microscópica característicos de las cuatro drogas vegetales, que permitan su correcta identificación.
3. Identificar algunos de los metabolitos secundarios, mediante métodos histoquímicos, fitoquímicos y por cromatografía en capa fina; que puedan ser utilizados como parámetros de identidad y pureza de las plantas en estudio.
4. Establecer el porcentaje de cenizas del material vegetal de las cuatro especies de leguminosas en estudio.
5. Elaborar muestrarios de droga seca y ejemplares de herbario de las cuatro especies de leguminosas en estudio, para ser utilizados en futuras investigaciones.
6. Elaborar cartillas micrográficas con los parámetros diagnósticos de la droga seca de las cuatro especies en estudio.

VI. HIPÓTESIS

El estudio se considera de tipo descriptivo por lo que no se requiere del planteamiento de la hipótesis.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Recursos

1. Humanos

- a) Estudiantes: Br. Carmen Sofía Rojas Sazo; Br. Andrea Roxana Román Escobar, Br. Nelly Carmina Cruz Palencia.
- b) Asesora: Licda. María Eugenia Paredes.
- c) Revisor: Lic. Armando Cáceres.

2. Lugares de realización de la investigación

- a) Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, edificio T-11 de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- b) Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), edificio T-10 de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- c) Laboratorio de Anatomía Vegetal, Facultad de Agronomía.

B. Universo de trabajo

Leguminosas medicinales utilizadas popularmente para tratar enfermedades causadas por hongos.

1. Muestra

4 especies de leguminosas con actividad antifúngica comprobada.

2. Obtención del material vegetal

El material vegetal de las 4 especies en estudio fue recolectado de la siguiente manera: *S. occidentalis* y *D. robinoides*, fueron recolectadas en la Ecoparcela El Kakawatal ubicada

en el cantón Chiguaxté, Municipio de Samayac, Departamento de Suchitepéquez (Altitud: 539 msnm, 14°33'56.66" N; 91°27'53.19" O). *H. courbaril*, fue recolectada de la Finca Las Delicias ubicada en aldea Colmenas, Municipio de Villa Canales, Departamento de Guatemala (Altitud: 1365 msnm, 14°29'15.09" N; 90°31'24.22" O). *P. lunatus* fue recolectado de la Plantación Andrés, ubicada en Centro Uno La Máquina, Tulate, en el Municipio de Cuyotenango, Departamento de Suchitepéquez (Altitud: 345 msnm, 14°32'32.79" N; 90°34'20.89" O).

Se cortaron ejemplares de cada una de las especies de leguminosas, tratando de cortar todas las partes respectivas; ramas, hojas, flores y frutos (si tuviese), luego se colocaron en hojas de papel periódico de manera que al secarse conservaran la forma original de la planta.

C. Listado de Materiales

1. Plantas medicinales (material vegetal fresco y seco)

- *D. robinoides*
- *H. courbaril*
- *P. lunatus*
- *S. occidentalis*

2. Instrumentos

- Lupa
- Microscopio estereoscópico
- Microscopio con cámara incorporada
- Baño María
- Microscopio de luz
- Balanza de humedad marca Santorius
- Balanza semianalítica
- Horno
- Mufla

- Aguja de disección e histológica
- Centrífuga (2500-5000 rpm 45°C)
- Desecador

3. Material

- Cartones con prensa de madera
- Papel manila
- Papel periódico
- Hojas de afeitar marca Gillette
- Láminas de duroport
- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos
- Virutas de magnesio
- Filtro Whatman 1

4. Cristalería

- Frascos de vidrio estériles
- Vasos de precipitar
- Caja de petrí
- Cápsula
- Vidrios de reloj
- Tubos de ensayo
- Crisoles de porcelana

5. Reactivos de pruebas de identificación

- Agua destilada
- Parafina
- Alcohol etílico al 96%
- Alcohol etílico al 70%

- Alcohol etílico al 80%
- Alcohol etílico al 100%
- Alcohol iodado
- KOH al 5%
- Gelatina-glicerina
- Hidróxido de sodio al 5%
- Hipoclorito de sodio al 50%
- Cloruro de sodio al 10%
- Hidrato de cloral (5:2)
- Safranina al 1%
- Fast green
- Reactivo de Drangendorff
- Naranja G
- Sudan IV
- Floroglucina
- Ácido clorhídrico al 25%
- Ácido clorhídrico 2N
- Azul de cresilo al 1%
- Cloruro férrico o sulfato férrico al 10%
- Ácido sulfúrico concentrado
- Hidróxido de amonio al 10%
- Ácido bórico
- Anhídrido acético
- Tolueno
- Solución Test de amonio
- Metanol
- Reactivo de Mayer's
- Reactivo de Wagner

6. Reactivos de cromatografía

a) Soluciones absorbentes y estándares

- Silica gel 60F₂₅₄
- Estándar de antraquinona y antrona
- Estándar de saponinas
- Estándar diosgenina, β -sitosterol y estigmaesterol
- Solución de atropina y papaverina
- Estándar de 1,8-cineol, cariofileno, eugenol, mirceno y nerol

b) Disolventes cromatográficos

Fase móvil

- Acetato de etilo-metanol-agua (33.33/5.66/4.33)
- Cloroformo-metanol-agua (64/50/10)
- Acetato de etilo-metanol-agua (100-13.5-10)
- Tolueno-acetato de etilo (93:7)

Detección (soluciones reveladoras)

- Solución etanólica de hidróxido de potasio 5 ó 10%
- Anisaldehído-ácido sulfúrico
- Reactivo de Dragendorff

D. Metodología

1. Pruebas de identificación

a) Herborización de ejemplares frescos: El material vegetal de cada una de las 4 plantas leguminosas, se recolectó y así mismo se prepararon ejemplares de herbario de la siguiente manera: Se cortaron ejemplares de la leguminosa respectiva, tratando de cortar todas las partes respectivas; ramas, hojas, flores y frutos (si tuviese), se colocaron en hojas de papel periódico, colocando de manera que al secarse conserve la forma de la planta. Las muestras se colocaron en cartones dentro de una prensa de madera y se secaron en los separadores

del Herbario de la Escuela de Biología (BIGU). Se procedió a la identificación correcta del ejemplar vegetal (3).

b) Preparación de muestrario patrón de droga seca: Las partes a secar se colocaron en capas finas, es decir en doble hoja entrecruzadas de papel manila, estas del tamaño de una hoja de papel periódico, seguidamente se formó una torre de plancha de estas colocándolas de la siguiente manera: una plancha de cartón, del tamaño de la hoja de papel periódico, una plancha de papel manila, con la parte de la planta a secar, y encima otra plancha de cartón, y así sucesivamente. Después se compresionaron las torres de planchas mediante prensas de madera, se aseguraron mediante lazo y luego se colocaron en rejillas que por debajo tienen focos de luz amarilla. Se dejaron secar y se evaluaron periódicamente hasta observar que estuvieran todas las hojas completamente secas (21). Las muestras de la droga vegetal de cada una de las 4 especies de estudio, previamente identificadas correctamente, una porción de éstas se colocaron, en frascos de vidrio adecuados y se realizó una etiqueta respectiva para su identificación (3).

2. Descripción botánica

Se realizó una descripción diagnóstica de cada una de las especies, describiendo las características de cada una de las partes de la planta y se realizaron comparaciones con la Flora de Guatemala para llegar a la correcta identificación.

a) Observación macroscópica: Se observó la morfología macroscópica de cada una de las 4 especies de leguminosas en estudio, realizado a simple vista y con microscopio estereoscópico. Se determinaron las características como morfología, color, presencia de material extraño; esto se realizó del material vegetal fresco (3, 21, 24).

3. Preparación de láminas de referencia

a) Preparación de cortes a mano alzada de planta fresca: Se colocó un pedazo del material fresco de cada una de las especies en estudio, entre 2 láminas de duroport; se deslizó entre ambas láminas una hoja de afeitar, para la obtención del corte. Se colocaron los cortes en

vidrios de reloj con agua, posteriormente se seleccionaron los cortes más delgados y de forma pareja, para esto se utilizó como herramienta una lupa, seguidamente se observaron al microscopio con aumentos de 100X y 400X (3, 21).

b) Preparación de láminas de planta fresca: Para la elaboración de láminas de referencia se utilizó la técnica de cortes a mano alzada y diafanizado (3, 21, 24).

i) Técnicas de diafanizado (decoloración): Se colocó el material vegetal en vaso de precipitación con alcohol etílico al 96%, se llevó a ebullición en baño de María durante 10 min (cambiar el alcohol cuando ya está muy verde). Se agregaron partes iguales de alcohol al 96% e hidróxido de sodio al 5%, se llevó a ebullición en baño de María durante 5-10 min, se lavó con agua destilada varias veces, hasta eliminar restos de alcohol-hidróxido y se completó con lavados de agua destilada. Se decantó el sobrenadante y se aplicó hipoclorito de sodio al 50% hasta obtener el material transparente, seguidamente se lavó con agua destilada para eliminar el remanente de hipoclorito de sodio. Se colocó hidrato de cloral (5:2) durante 5-10 min como mínimo. Se realizó la coloración con safranina al 1% en agua y se montó a lámina con gelatina-glicerina (21).

ii) Técnicas de coloración

- Coloración con Safranina: Los cortes delgados se clarificaron con hipoclorito de sodio al 50%. Se realizaron 5-6 lavados de 3 min cada uno con agua destilada. Se tiñeron con solución safranina al 1% en agua durante 2-5 min. Se lavó con agua destilada y se colocó el corte en portaobjeto y se agregó 1 gota de gelatina-glicerina calentada y se cubrió con cubreobjetos. Resultado: Las paredes lignificadas y la cutícula se tiñeron de color rojo intenso y las paredes celulósicas de color rosado (21).

- Coloración con Safranina-Fast green: Se clarificaron cortes delgados con hipoclorito de sodio al 50%, se realizaron 5-6 lavados de 3 min con agua destilada y se pasaron por alcohol de 70%. Se tiñeron con solución de safranina a saturación en alcohol de 80% durante 10 min, se pasó por alcohol de 96%, y se coloreó con fast green a saturación de alcohol de 100% mediante pasaje rápido. Se pasó 2 veces por alcohol de 100%. Se montó

con gelatina-glicerina. Resultado: Los tejidos de las paredes lignificadas se tiñeron de color rojo intenso y los de paredes celulósicas de color celeste verdoso (21).

iii) Método de disociado débil: Se utilizaron para folíolo, peciólulo, pecíolo y semillas. Se colocó el material cortado finamente en un recipiente de cristalización con solución de hidróxido de sodio al 5%, se hirvió por 5 min. Se lavó con agua destilada hasta que el líquido quedará limpio, se colocó en tubo y se centrifugó de 3-5 min a 2500 rpm a 45⁰C se realizó 3 veces y se decantó el sobrenadante; se tiñó con safranina-fast green. Se colocó una porción del material en portaobjetos y se disgregó con ayuda de una aguja de disección, se cubrió con cubreobjetos y observó al microscopio, para conservarlo por más tiempo se montó con gelatina-glicerina (21).

iv) Determinación del índice de estomas: Es una constante dentro de ciertos límites que permite la caracterización de hojas por comparación con testigos o con valores tabulados. Para ello se necesitó diafanizar o semidiafanizar un trozo de hoja de alrededor de 5x5 mm, se transfirió a un portaobjetos y se montó con 1 gota de gelatina-glicerina. Seguidamente se observó en el microscopio utilizando el objetivo de 40X y ocular de 4X. Se dibujó en el papel el área observada de 2 mm de lado utilizando el micrómetro objetivo y dentro de esa área una cruz por cada célula epidérmica y un círculo por cada estoma; se realizaron 10 determinaciones y se calculó la media aritmética:

I es el índice de estomas, S el número de estomas en una superficie determinada de las hojas, E el número total de células epidérmicas en la misma área (21).

v) Determinación de índice de empalizada: Método exclusivo para el control de calidad de las hojas. Se procedió a diafanizar o semidiafanizar un trozo de hoja de alrededor de 5x5 mm. Se transfirió a un portaobjeto y decoloró con hidrato de cloral y se montó con gelatina glicerina. Se observó con el microscopio en objetivo de 40X y ocular de 6X. Se dibujaron las células epidérmicas adyacentes, se enfocaron las células del clorénquima en empalizada

debajo de las 4 células epidérmicas. Las células del clorénquima en empalizada se observaron en la sección transversal como pequeños círculos. Se contaron y se calculó el valor promedio de células del clorénquima en empalizada por debajo de cada célula epidérmica dividiendo el número total obtenido por 4. Se realizaron 10 determinaciones y se obtuvo la media aritmética (21).

c) Pruebas histoquímicas: Permitieron determinar la presencia de compuestos químicos y metabolitos secundarios que poseían las plantas, los cuales son específicos en cada especie vegetal. Se realizaron sobre el corte a mano alzada de planta fresca; procediendo de la siguiente forma: del material fresco, se colocó la muestra en un portaobjeto y se agregó sobre ella 1 gota de reactivo, se dejó actuar y por último se colocó el cubreobjetos presionando suavemente sobre el mismo con aguja histológica, se quitó el exceso de reactivo del borde con papel filtro. Se determinaron los compuestos químicos que poseían las plantas de estudio de la siguiente manera:

i) Alcaloides: Se agregó 1 gota de reactivo de Drangendorff durante unos minutos, la presencia de alcaloides se distinguió por precipitado color rojo ladrillo (21).

- Determinación cualitativa en tubo de ensayo: En cápsula se pesaron 5 g de material fresco, triturando el material, se colocó en un vaso de precipitar con 5 mL de agua destilada, se llevó a ebullición. Se filtró la solución obtenida recolectándola en un tubo de ensayo, se dejó enfriar y se agregó 1 gota de reactivo de Drangendorff; se dejó reposar durante 10, 20 y 30 min observándose la formación de precipitado rojo (21).

ii) Aleuronas: Se añadió 1 gota de naranja G, los cristaloides de aleurona se tiñeron de color rojo-anaranjado mientras el globoide va desapareciendo poco a poco. Se agregó 1 gota de alcohol iodado; los granos de aleuronas se tiñeron de amarillo marrón a marrón (21).

iii) Grasas y aceites: Se adicionaron de 1-2 gotas de Sudan IV, se dejó actuar durante 10 min y se calentó suavemente flameando el portaobjetos. Las grasas se tiñeron de rojo-

anaranjado o rojo. Se agregó 1 gota de alcohol al 70% y se calentó ligeramente, las grasas y aceites permanecieron intactas (21).

iv) Lignina: Se agregó 1 gota de floroglucina y se flameó suavemente, se retiró de la llama y se colocó por el borde del cubreobjetos 1 gota de HCl al 25%. Las paredes lignificadas se tiñeron de rojo (21).

v) Mucílagos: Se añadió 1 gota de azul de cresilo al 1%. Los mucílagos tomaron una coloración azul Francia (21).

vi) Saponinas: Se adicionó 1 gota de H_2SO_4 concentrado; las saponinas aparecieron de color amarillo, a los 30 min roja y finalmente se observa azul-verdoso (21).

- Determinación cualitativa en tubo de ensayo-Test de espuma:- En cápsula se pesaron 5 g de material fresco, se trituró el material y se colocó en un vaso de precipitar con 5 mL de agua destilada y se llevó a ebullición. Se filtró la solución obtenida recolectándola en un tubo de ensayo, se dejó enfriar y se agregó 1 gota de H_2SO_4 concentrado, se observó una coloración azul verdosa, se agitó fuertemente durante 10 min para favorecer la formación de espumas, se observó a los 10, 20 y 30 min siguientes, si la espuma desaparecía durante este período la reacción es negativa y si se mantiene es positiva (21).

vii) Taninos: Se agregó 1 gota de solución de sulfato férrico, se dejó actuar de 2-3 min, se lavó con agua destilada. Los taninos dieron una coloración negro-azulado o negro-verdoso (21).

- Determinación cualitativa en tubo de ensayo: En cápsula se pesaron 5 g de material fresco, triturando el material, se colocó en un vaso de precipitar con 5 mL de agua destilada, se llevó a ebullición. Se filtró la solución obtenida recolectándola en un tubo de ensayo, se dejó enfriar y se agregó 1 gota de reactivo de sulfato férrico; se dejó reposar durante 10, 20 y 30 min observándose la formación de precipitado azul verdoso (21).

viii) Flavonoides

- Ensayo de cianidina: Al tubo se añadió 0.5 mL de HCl concentrado y 3-4 virutas de magnesio, se observó la formación de color de verde a rojo al cabo de 10 min. Si existía cambio de color con respecto al control se enfrió y se diluyó en volúmenes iguales de agua y se añadió 1 mL de alcohol etílico, se agitó y se esperó a que se separaran las fases. El desarrollo de tonalidades rojas en la capa del octanol es indicativo de flavonoides (21).

- Ensayo de leucoantocianina: Al tubo se añadió 0.5 mL de HCl concentrado y se calentó en baño de María por 5 min. El desarrollo de color rojo violeta fue indicativo de presencia de leucoantocianinas. En caso de no aparecer inmediatamente el color se deja reposar a temperatura ambiente durante 1 hr antes de reportar (21).

d) Pruebas de pureza

i) Humedad: Constituye al agua o componentes volátiles que contiene el material vegetal, se determina por la eliminación mediante calentamiento, lo que conlleva a la pérdida de peso del material vegetal. Se determinó por el método de termogravimetría, de la siguiente manera: se seleccionó una parte representativa de la muestra, se homogenizó y mezcló, se encendió la balanza de humedad marca Santorius y se seleccionó 15 min a 105⁰C. Se abrió la cámara, se colocó el platillo, se taró y se agregó la muestra. Se colocó en el platillo una capa fina y homogénea, se cerró el aparato y se determinó el peso inicial. Se inició el programa de secado y se procedió aproximadamente 4 veces para cada especie de estudio (3, 21, 24).

ii) Cenizas totales: Se realiza por el método de incineración, siendo la ceniza el residuo inorgánico, ya que permite conocer el contenido de minerales en la muestra. Se realizó de la siguiente manera: se pesó 1 g de material vegetal pulverizado de cada una de las 4 especies en estudio y se colocaron en crisoles de porcelana, previamente tarados. Se introdujo el crisol con la muestra en el interior de una mufla a 600⁰C hasta la obtención de cenizas. Se enfriaron los crisoles en desecador y se pesaron (3, 21, 24).

e) Ensayos en tubo macro y semimicro

i) Taninos: Se pulverizaron 10 g del material vegetal y se añadieron 30 mL de etanol al 80%. Se filtró y evaporó hasta sequedad. Se añadieron 25 mL de agua caliente al residuo y se agitó con varilla hasta enfriar. Se agregó 1 mL de solución de cloruro de sodio al 10% y se filtró. Se adicionaron 3 mL del filtrado a 4 tubos de ensayo rotulándolos del número 1 al 4 y se procedió a lo siguiente: el tubo 1 fue el testigo. Al tubo 2 se agregaron 5 gotas de solución de gelatina al 1% p/v (0.5 g gel en 50 mL). Al tubo 3 se añadieron 4 gotas de gel-sal (1% de gelatina y cloruro de sodio al 10%). Al tubo 4 se adicionaron 4 gotas de solución de FeCl_3 al 10% p/v. Se observó la formación de precipitado y el cambio de coloración con FeCl_3 : grisáceo-negro, catecol; negro-azulado, pirogalol (46-49).

ii) Flavonoides: Se utilizaron tubos y se numeraron del 1 al 7. Se prosiguió de la siguiente manera: al tubo 1 se agregaron 0.5 mL de H_2SO_4 concentrado. Al tubo 2 se añadieron de 3-5 gotas de FeCl_3 10% p/v. Al tubo 3 se adicionaron 0.5 mL de HCl concentrado, en baño María 60°C por 5 min (prueba de leucoantocianinas). Al tubo 4 se agregó magnesio metálico y 0.5 mL de HCl concentrado. Al tubo 5 se añadió álcali a un extracto acuoso. Al tubo 6 se adicionó solución de ácido bórico en anhídrido acético y el tubo 7 fue el testigo. Se evaluaron cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el tubo testigo. El desarrollo inmediato de color amarillo a rojo indica la presencia de flavonas y flavonoides; rojo a magenta flavonoles; rojo, magenta, violeta, azul flavanonas; amarillo isoflavonas; sin coloración chalconas y auronas (46-49).

iii) Antraquinonas

- Prueba de Bornträger: Se pulverizaron 3 g de material vegetal con 10 mL de etanol al 80%, se filtró y se concentró en baño María a 60°C . Se disolvió el residuo con 30 mL de agua destilada, se filtró y se extrajo con 2 mL de tolueno. A la fase de tolueno se añadió 1 mL de solución de test de amonio y se agitó. Se observaron cambios de color en la fase alcalina: si el color es rojo- rosado el resultado es positivo (46-49).

iv) Alcaloides: Se pesó 1g de material vegetal seco y molido, se agregó 1 mL de hidróxido de amonio al 10% (p/v), luego se añadieron 25 mL de metanol a 60°C, se filtró con papel filtro Whatman 1 y se acidificó el filtrado con HCl 2N. La solución restante se dividió en 4 tubos y se evaluó de la siguiente manera: en el tubo 1 se agregaron 5 gotas de reactivo de Mayer's (color blanco a crema). Al tubo 2 se añadieron 5 gotas del Reactivo de Dragendorff (color rojo a naranja). Al tubo 3 se adicionaron 5 gotas del reactivo de Wagner (color marrón) y el tubo 4 fue el testigo. Se empleó como estándar solución de atropina y papaverina. Se observó durante 2 hrs la existencia de precipitados o turbidez en los tubos (46-49).

f) Extracción continua por percolación: Los extractos de *H. courbaril*, *S. occidentalis*, *P. lunatus*, fueron proporcionados por el departamento de Citohistología y se encontraban almacenados en frascos color ámbar y en refrigeración. El extracto de *D. robinoides*, se obtuvo por la metodología de extracción continua por percolación.

- Procedimiento: En un percolador previamente limpio y seco, se colocó algodón en el interior y papel filtro cortado según el diámetro; se pesó el material vegetal y se agregó al percolador, seguidamente se humedeció el material vegetal hasta cubrirlo con el disolvente etanol utilizando para ello un vaso de precipitar. Se dejó reposar durante 18-24 hrs, se abrió la llave en la parte inferior y se dejó gotear el líquido a una velocidad adecuada. Se recogió el líquido en erlenmeyer y se agregó más disolvente hasta que este dejara de tener coloración verde. El material sólido que quedaba se presionó fuertemente, la solución obtenida se utilizó para producir extractos (46-49).

g) Perfil cromatográfico: Este procedimiento fue realizado por la técnica de cromatografía en capa fina, la cual se basa en la preparación de una capa uniforme de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte; está constituida por una fase móvil líquida y la fase estacionaria sólida. Por esta metodología se determinaron los metabolitos secundarios de los extractos de plantas siendo éstos alcaloides, saponinas, flavonoides, aceites y antraquinonas.

i) Cromatografía en capa fina para antraquinonas: En un tubo de ensayo se pesaron 0.1 g de extracto vegetal y se añadieron 5 mL de etanol. Se filtró y aplicaron 10 μ L en la cromatoplaque de sílica gel 60F₂₅₄. Estándar: antraquinona y antrona (10 μ L). Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (33.33/5.66/4.33). Detección: sin tratamiento químico; UV 254 nm fluorescencia, UV 365 nm fluorescencia amarilla o rojo-café. Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 ó 10%. Antraquinonas: zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV 365 nm. Antronas y antrolonas: zonas amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV 365 nm (46-49).

ii) Cromatografía en capa fina para saponinas: En un tubo de ensayo se pesaron 0.1 g de extracto vegetal y se añadieron 5 mL de etanol. Se procedió a filtrar y a aplicar 25-40 μ L en una cromatoplaque de sílica gel 60F₂₅₄. Se empleó un estándar de saponinas, diosgenina, β -sitosterol y estigmaesterol (10 μ L). Fase móvil: cloroformo-metanol-agua (64/50/10). Detección: reactivo de anisaldehído-ácido sulfúrico: zonas azules, violetas, amarillentas (46-49).

iii) Cromatografía en capa fina para alcaloides: En un tubo de ensayo se pesaron 0.1 g de extracto vegetal y se añadieron 5 mL de metanol. Se procedió a filtrar y se aplicaron 10 μ L en una placa de sílica gel 60F₂₅₄, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina (10 μ L). Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100/13.5/10). Detección: sin tratamiento químico UV 254 nm fluorescencia, UV 365 nm algunos fluorescen azul o amarillo. Reactivo de Dragendorff: zonas cafés o naranjas en visible, los colores no son estables (46-49).

iv) Cromatografía en capa fina para aceites volátiles: En un tubo de ensayo se pesaron 0.1 g de extracto vegetal y se añadieron 5 mL de etanol. Se procedió a filtrar y se aplicaron 20-50 μ L en cromatoplaque de sílica gel 60F₂₅₄. Estándar: cariofileno, 1,8-cineol, eugenol, mirceno, nerol (10 μ L). Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7). Detección: anisaldehído-ácido sulfúrico. Se observaron zonas azules verdes, rojas y cafés en visible (46-49).

v) Cromatografía en capa fina para flavonoides: En un tubo de ensayo se pesaron 0.1 g de extracto vegetal y se añadieron 5 mL de metanol. Se procedió a filtrar y se aplicaron 10 μ L en una placa de sílica gel 60F₂₅₄, utilizando como estándar apigenina, rutina, ácido clorogénico e hiperosido (10 μ L). Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100/11/11/27). Detección: sin tratamiento químico UV 254 nm fluorescencia, zonas azules o amarillas, UV 365 nm dependiendo de la estructura fluorescen amarillo, azul o verde (46-49).

h) Elaboración de cartillas micrográficas: Se elaboraron esquemas a mano alzada de cada una de las especies estudiadas, estableciendo características micrográficas de referencia para el control de calidad microscópica del material vegetal.

i) Análisis de resultados: Para los objetivos específicos 1, 2 y 3 se hizo estadística descriptiva de los hallazgos encontrados para cada planta. Respecto al índice de estomas, de empalizada y rango de cenizas, objetivos 2 y 4 respectivamente, debido a que el resultado es cuantitativo (%) se reportó el rango (valor mínimo y máximo); de 10 y 4 repeticiones, respectivamente, por planta.

VIII. RESULTADOS

A continuación se describen los principales hallazgos encontrados en la droga vegetal para cada una de las especies en estudio; por motivos de investigación se analizaron por separado el folíolo, peciólulo, pecíolo y únicamente la semilla para *P. lunatus*.

A. *D. robinoides*

1. Caracteres macroscópicos de identificación botánica: Árbol de 5-9 m de altura, las hojas son alternas con forma oblonga, imparipinadas y caducifoliadas, ápice agudo o redondeado, base aguda, haz verde mate, en la nervadura central la venación es de tipo reticulada, la base foliar y la unión de la hoja son de tipo peciolada. El envés verde claro mate. Las flores, pequeñas, amariposadas, de 1.5 cm de largo por 1 cm de ancho, dispuestas en pequeños racimos axilares. Los frutos se presentan en vainas indehiscentes, oblongas, huecas e infladas de color café pálido de 4-6 cm de largo por 1-2 cm de grueso. Las vainas contienen entre 5-9 semillas color blanco crema (Figura 1). Se preparó e identificó el ejemplar de herbario, y se ingresó en el Herbario Biología de Guatemala (BIGU), Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC; con el número 52931 (Anexo 1, 2).



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 1. Ejemplar de herbario de *D. robinoides*

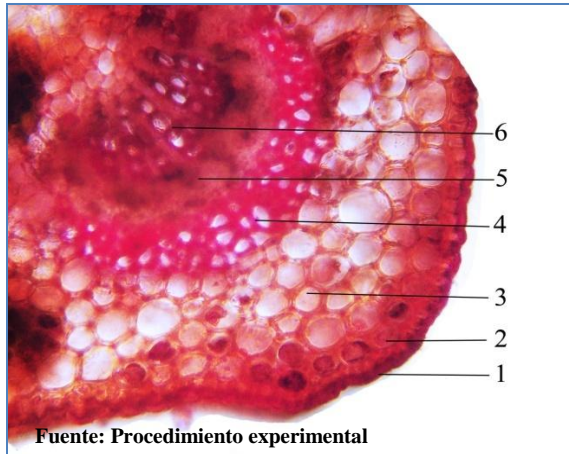
2. Caracteres micromorfológicos e histológicos para identificación

a) Caracteres micromorfológicos: En el folíolo bifacial, peciólulo y pecíolo se observaron los tejidos vasculares y los fundamentales de sostén. El tejido vascular de estos se encuentran en posición central (Figura 2, 3). El haz vascular, conformado por el xilema y floema, presentó forma colateral cerrada para las 3 partes en estudio; ya que el floema se localiza externamente al xilema y este se encuentra de forma lineal e interna. Por su localización el xilema es de tipo endarco. En el folíolo se denota solo un haz vascular, en el peciólulo se observaron de 5-6 haces vasculares a diferencia del pecíolo en el cual se evidenciaron de 4-7; ambos alrededor del parénquima medular. Los haces vasculares del pecíolo forman un anillo continuo semejante a una estela del tipo sifonostela-eustela. (Figura 4, 5).

En el tejido fundamental se observaron tejidos de parénquima, colénquima anular, esclerénquima con paredes lignificadas y parénquima medular, este último solo en el peciólulo y pecíolo (Figura 6, 7). El parénquima medular presenta células de diversos tamaños pero de similar morfología y en el esclerénquima del pecíolo se pudieron visualizar algunos cristales solitarios rectangulares de oxalato de calcio (Figura 8, 9). En el peciólulo y pecíolo se observó la presencia de canales secretores encontrándose en los tejidos del parénquima medular (Figura 10). Se lograron diferenciar por medio de un corte transversal del folíolo los tejidos fundamentales de la lámina foliar, se identificó parénquima en empalizada y esponjoso, el último se encuentra hacia la epidermis abaxial con una distribución y aspecto irregular redondeado integrado por 8-10 capas acompañadas por espacios intercelulares más grandes que el parénquima en empalizada por su diferenciación; el parénquima en empalizada se presenta como células alargadas de contornos lisos con pequeños espacios intercelulares formando 3 capas distribuidas a lo largo de la lámina foliar hacia la epidermis adaxial (Figura 11). Se observó clorénquima lagunar en la epidermis adaxial (Figura 12). Se observan haces vasculares transcurrentes en forma cilíndrica rodeados de esclerénquima (Figura 11).

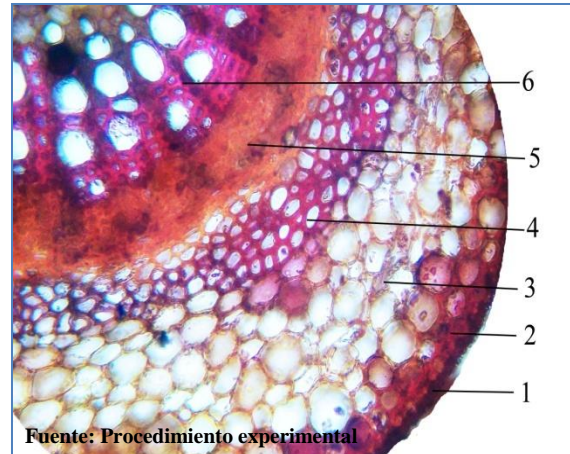
En el tejido epidérmico, la epidermis adaxial se observó más gruesa con cutícula evidente, mientras que la abaxial es irregular y cutícula no evidente; ambas son monoestratificadas

(Figura 12). Respecto a los tricomas, en el folíolo los hay pluricelulares monoliformes y en el pecíolo pluricelulares de aspecto glanduloso incrustados sobre la epidermis (Figura 13, 14, 15). Tricomas unicelulares lineales ubicados sobre la epidermis del pecíolo y el peciólulo (Figura 16, 17).



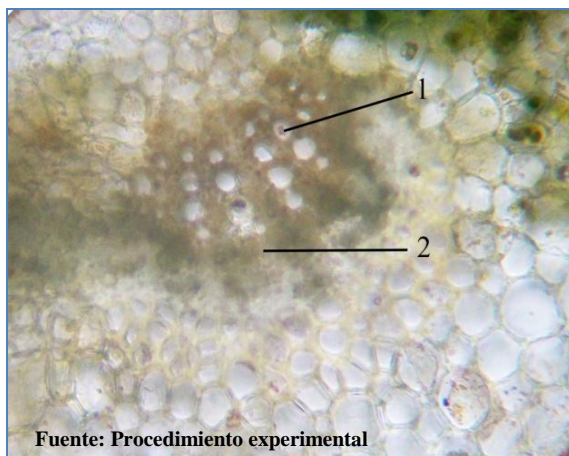
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 2. Folículo, tejidos vasculares y fundamentales de sostén. Epidermis (1), Colénquima (2), Parénquima (3), Esclerenquima (4), Floema (5), Xilema (6). (Aumento 400x). Tinción: Safranina fast-green.



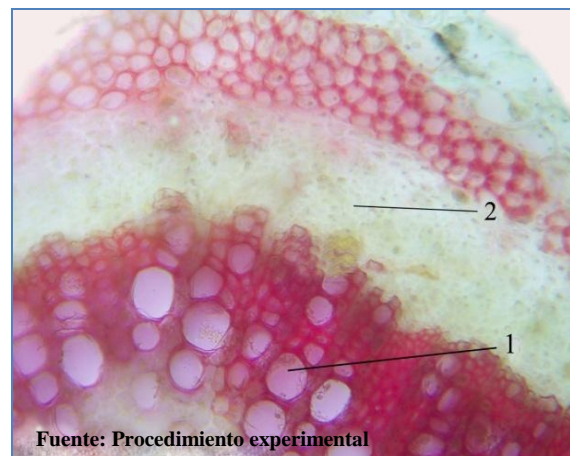
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 3. Pecíolo, tejidos vasculares y fundamentales de sostén. Epidermis (1), Colénquima (2), Parénquima (3), Esclerenquima (4), Floema (5), Xilema (6). (Aumento 400x). Tinción: Safranina fast-green.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 4. Folículo, tejidos vasculares de la nervadura central. Xilema (1), Floema (2). (Aumento 400x). Tinción: Sudan IV.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 5. Pecíolo, tejidos vasculares. Xilema (1), Floema (2). (Aumento 400x). Tinción: Floroglucina.

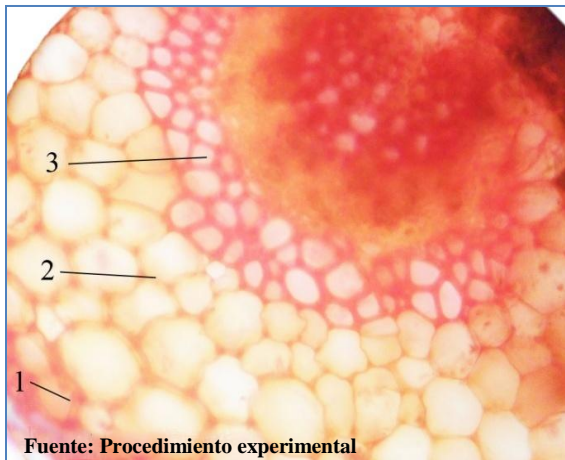


Figura 6. Foliolo, tejidos fundamentales. Colénquima, (1), Parénquima (2), Esclerénquima (3). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

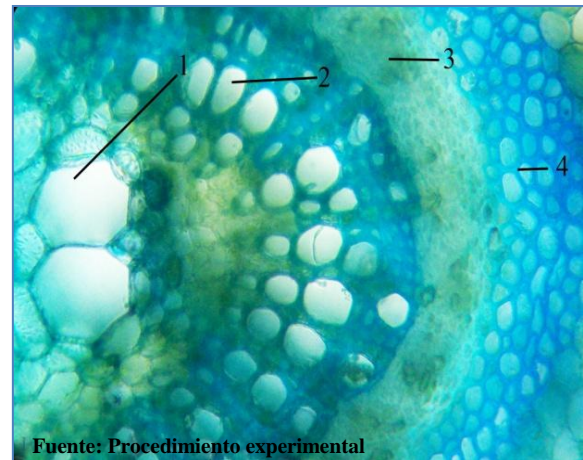


Figura 7. Pecíolo, tejidos fundamentales. Parénquima medular (1), Xilema (2), Floema (3), Esclerénquima (4). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.

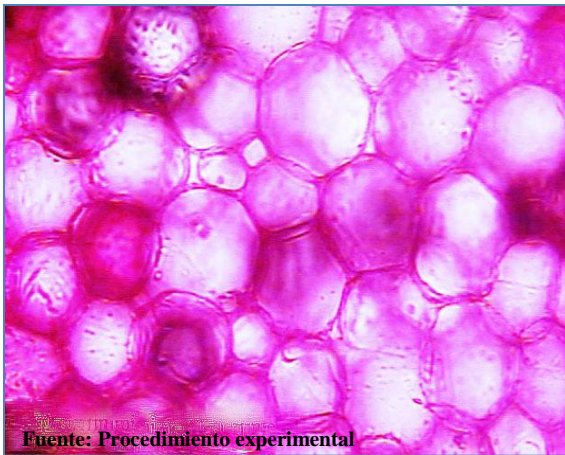


Figura 8. Pecíolo, corte transversal del parénquima medular. (Aumento 1000x). Tinción: Safranina 1%.

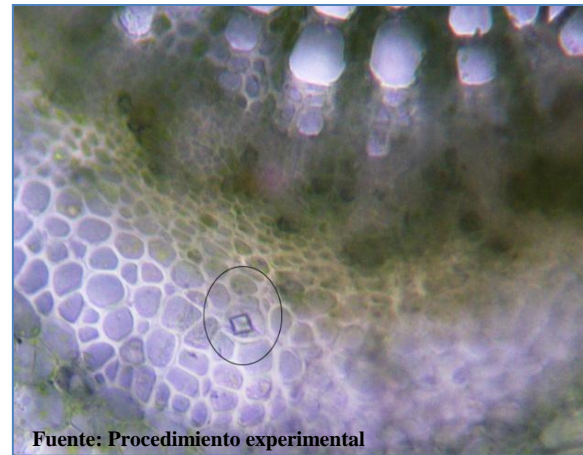


Figura 9. Pecíolo, cristales solitarios de oxalato de calcio en esclerénquima. (Aumento 400x). Tinción: Sudan IV.

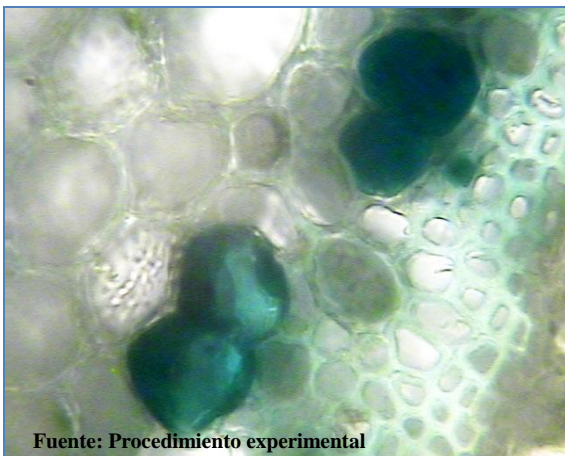


Figura 10. Pecíolo, canales secretores. (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.

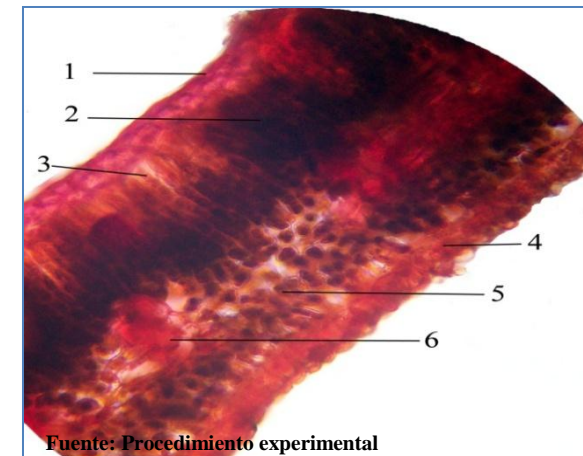


Figura 11. Foliolo, tejidos fundamentales de la lámina foliar. Epidermis abaxial (1), Parénquima en empalizada (2), Clorénquima lagunar (3), Epidermis adaxial (4), Parénquima esponjoso (5), Haz vasculares transcurrente (6). (Aumento 400x). Tinción: Safranina fast-green.

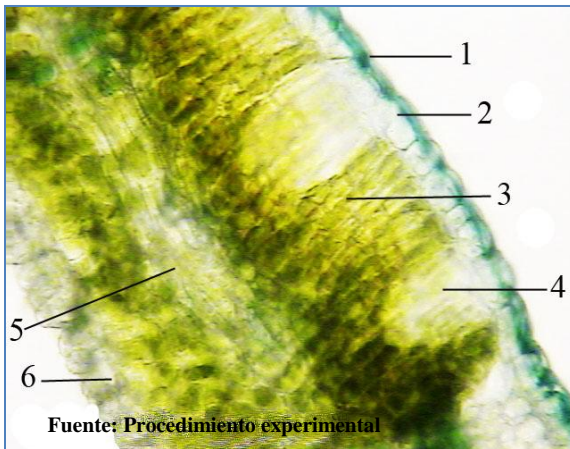


Figura 12. Folíolo, tejidos fundamentales. Cutícula (1), Epidermis adaxial (2), Parénquima en empalizada (3), Clorénquima lagunar (4), Parénquima esponjoso (5), Epidermis abaxial (6). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.

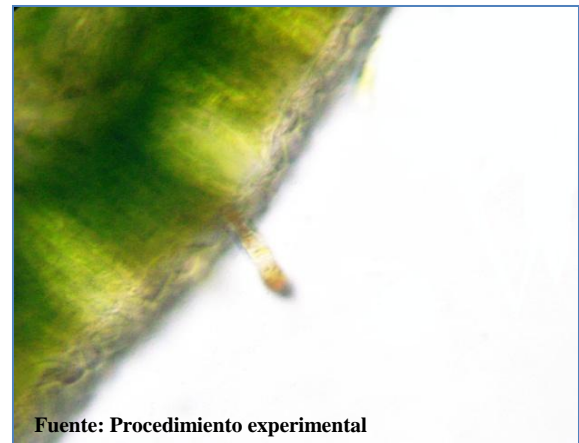


Figura 13. Folíolo, tricoma pluricelular monoliforme sobre epidermis. (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.

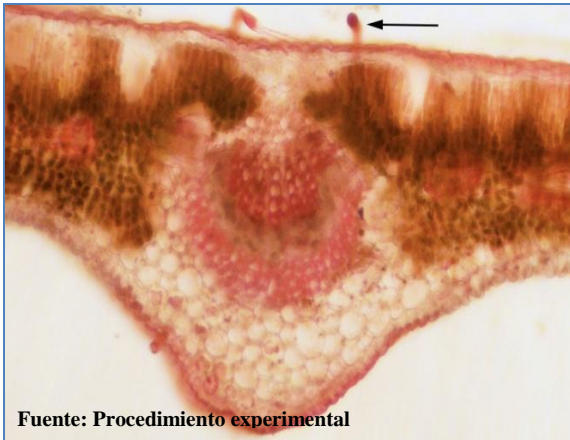


Figura 14. Folíolo, tricomas pluricelulares monoliformes en la epidermis. (Aumento 100x). Tinción: Safranina al 1%.



Figura 15. Peciolo, tricoma pluricelular de aspecto glanduloso en epidermis. (Aumento 400x). Tinción: Floroglucina.



Figura 16. Peciolo, tricoma unicelular lineal en epidermis. (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



Figura 17. Peciólulo, tricoma unicelular lineal en epidermis. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

b) Diafanizado del folíolo: El folíolo presenta bases de tricomas de 6-8 células en disposición radial, ubicadas en la epidermis adaxial (Figura 18). Tricomas pluricelulares monoliformes formados por 2-4 células (Figura 19) y tricelulares formados por 3 filas verticales de células sobrepuestas (Figura 20). Se visualizaron abundantes cristales solitarios rectangulares y estiloides alargados de oxalato de calcio en las células epidérmicas (Figura 21, 22, 23). Se evidenciaron traqueidas con engrosamientos en sus paredes laterales del tipo helicada por su forma en hélice o espiral (Figura 24). La nervación del folíolo es abierta y reticulada (Figura 22, 25), el término de venación es de tipo anastomosada; presenta margen entero (Figura 26). Se observó la vascularización foliar (Figura 26). Así mismo, se visualizó la venación en la nervadura central (Figura 27). En la epidermis abaxial se evidenciaron células de bordes irregulares y aparatos estomáticos conformados por estomas anomocíticos y anisocíticos, con presencia de cloroplastos en sus células oclusivas y con 2-5 células subsidiarias; arreglados en línea paralela, horizontal y diagonal al eje transversal del folíolo (Figura 28, 29). Se observaron estomas anomocíticos hundidos en la epidermis abaxial (Figura 30).



Figura 18. Folíolo, bases de tricoma de 6-8 células en epidermis adaxial. (Aumento 400x).
Tinción: Safranina 1%.

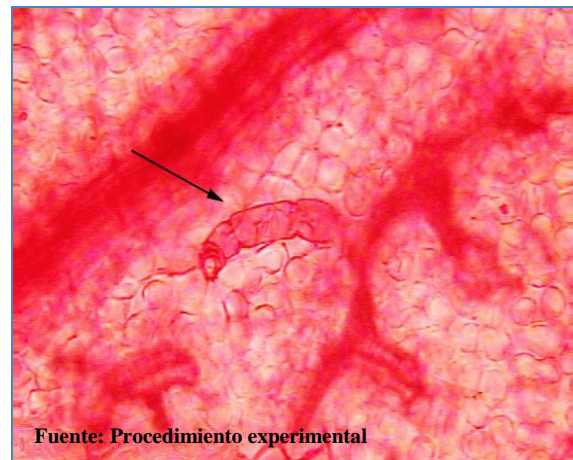
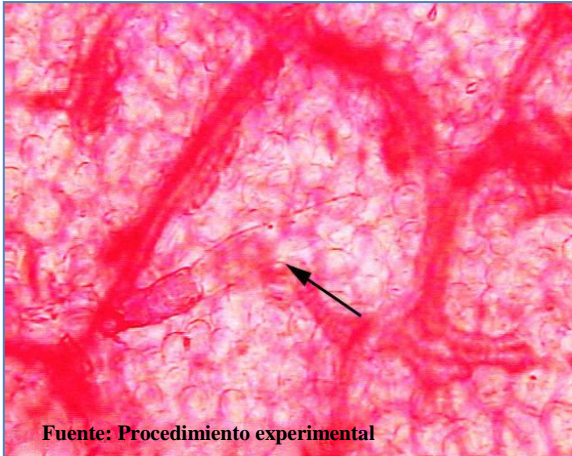
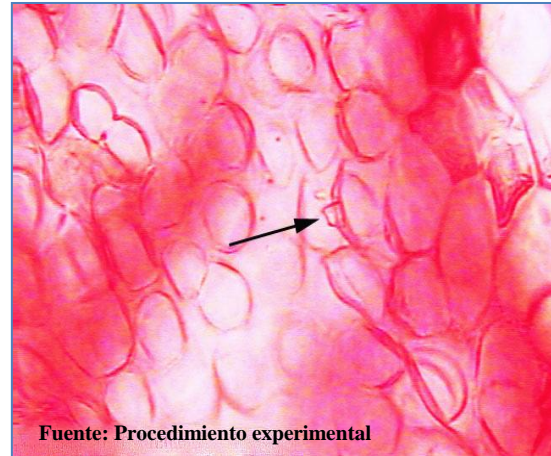


Figura 19. Folíolo, tricoma pluricelular moniliforme. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 20. Folíolo, tricoma tricelular. (Aumento 1000x). Tinción: Safranina 1%.



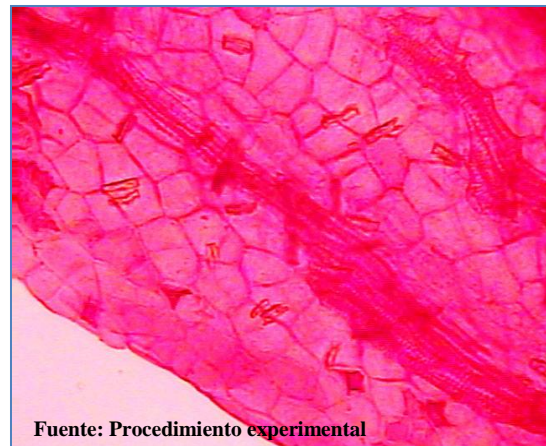
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 21. Folíolo, cristales solitarios de oxalato de calcio en las células epidérmicas. (Aumento 1000x). Tinción: Safranina 1%.



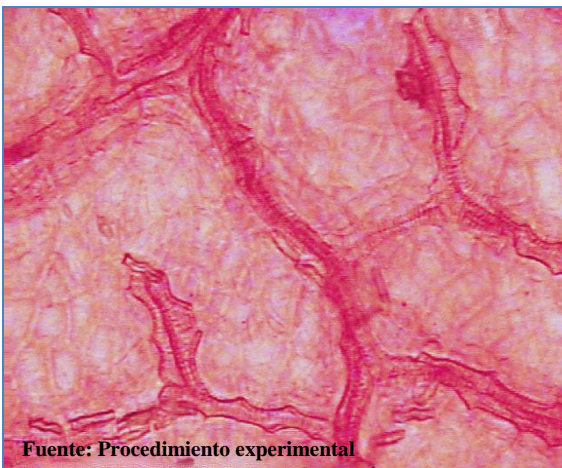
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 22. Folíolo, nervación abierta y reticulada en epidermis abaxial con presencia de abundantes cristales estiloides de oxalato de calcio. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



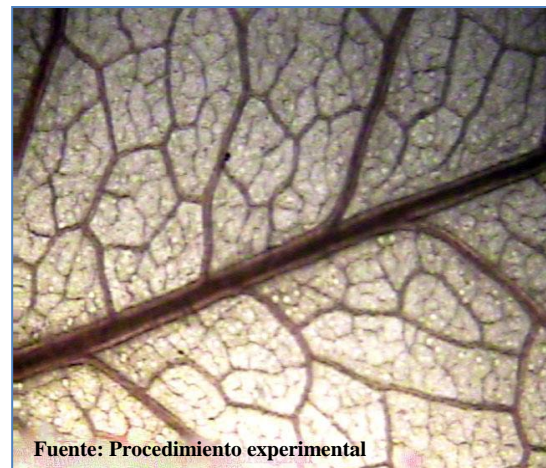
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 23. Folíolo, vascularización foliar en epidermis adaxial; con presencia de abundantes cristales estiloides de oxalato de calcio. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



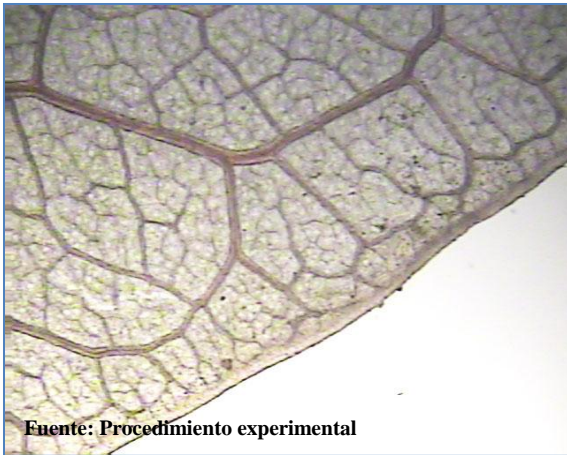
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 24. Folíolo, traqueidas con engrosamientos helicados. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



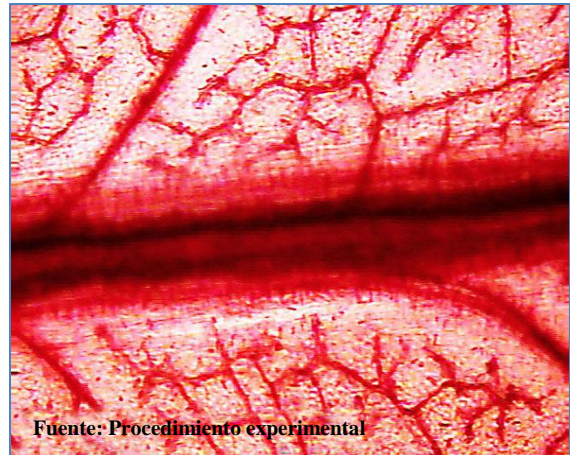
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 25. Folíolo, nervación abierta y reticulada en epidermis abaxial. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



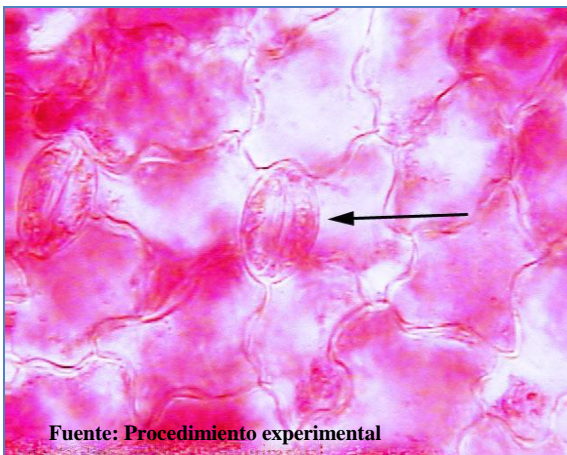
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 26. Folíolo, término de venación tipo anastomosada; margen entero; vascularización foliar. (400x). Tinción: Safranina 1%.



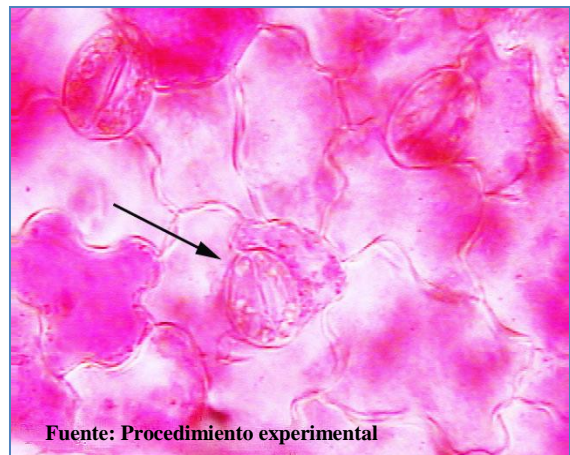
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 27. Folíolo, venación de la nervadura central. (400x). Tinción: Safranina 1%.



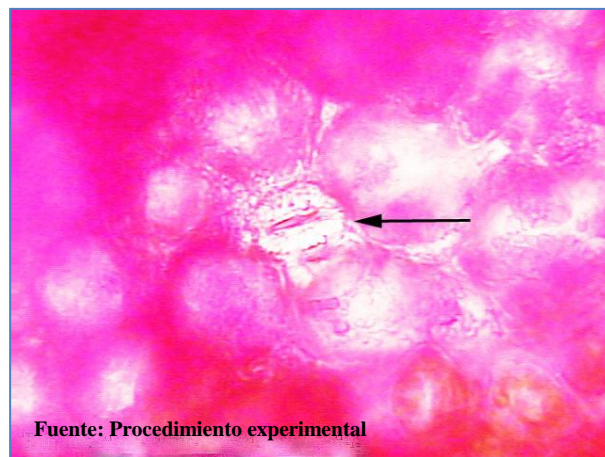
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 28. Folíolo, epidermis abaxial con estomas anomocíticos y células oclusivas con cloroplastos. (Aumento 1000x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 29. Folíolo, epidermis abaxial con estomas anisocíticos y células oclusivas con cloroplastos. (Aumento 1000x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 30. Folíolo, estoma anomocítico hundido en la epidermis abaxial. (Aumento 1000x). Tinción: Safranina 1%.

c) Disociado del folíolo, peciólulo y pecíolo: En el folíolo se observaron grupos de células de la epidermis de forma poligonal y rectangular conteniendo bases de tricomas de 6-8 células, encontrándose en disposición radial respecto a la base (Figura 31). Las células de la epidermis se visualizaron en formas poligonales, fuerte y perfectamente unidas entre sí; formando una capa de células en el mismo sentido de la lámina foliar (Figura 32). La epidermis del pecíolo se observó con células de formas variadas, no homogéneas, pero muy unidas entre sí; así mismo, se logró evidenciar en la epidermis estomas anomocíticos y diacíticos (Figura 33). Mientras que en el peciólulo se presentaron células de la epidermis, rectangulares con bordes irregulares y se evidenciaron gránulos de reserva (Figura 34).

Además se observaron grandes cantidades de células esclerenquimáticas, presentando paredes muy engrosadas con formas variadas; en el folíolo, peciólulo y pecíolo se encontraron braquiesclereidas mostrándose como células cortas en forma isodiamétrica (Figura 35, 36, 37, 38); macroesclereidas en el folíolo y pecíolo como células alargadas de forma más o menos prismática y en el pecíolo suelen observarse agrupadas (Figura 36, 39) y las macroesclereidas del peciólulo son alargadas en forma de bastón (Figura 40). Para el folíolo, peciólulo y pecíolo se observaron fibras del esclerénquima en forma isodiamétrica alargadas y generalmente puntiagudas (Figura 41, 42, 43).

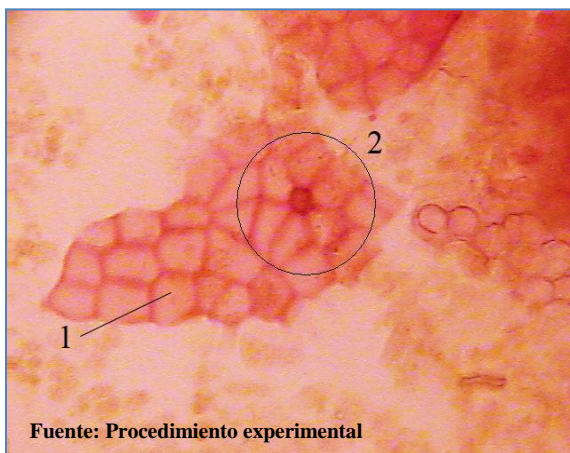
Se visualizaron otros tipos de fibras, septadas para el pecíolo y folíolo, esta última contiene cristales estiloides de oxalato de calcio alargados rectangulares posicionados en forma lineal (Figura 44, 45, 46); fibras xílicas en el folíolo las cuales presentan varios septos transversales que emergen de la pared (Figura 47). Así mismo, se visualizaron fibrotraqueidas con incrustaciones de cristales solitarios de oxalato de calcio, rectangulares con bordes irregulares en el pecíolo (Figura 48). El folíolo posee elementos vasculares denominados traqueidas con paredes laterales que forman engrosamientos del tipo helicado (Figura 49).

Se lograron visualizar, tanto para el folíolo como para el pecíolo, células del parénquima con paredes delgadas (Figura 50, 51). En el pecíolo se observaron células del parénquima medular (Figura 52). Se encontraron elementos del xilema del tipo helicoidal laxa en el folíolo, pecíolo y peciólulo; en forma de tráquea por ser estructuras alargadas con

engrosamientos laterales (Figura 53, 54, 55). Además el folíolo y pecíolo poseen cristales de oxalato de calcio del tipo estiloide, prismáticos rematados en sus extremos por una cara plana; ubicados en forma lineal (Figura 53, 56).

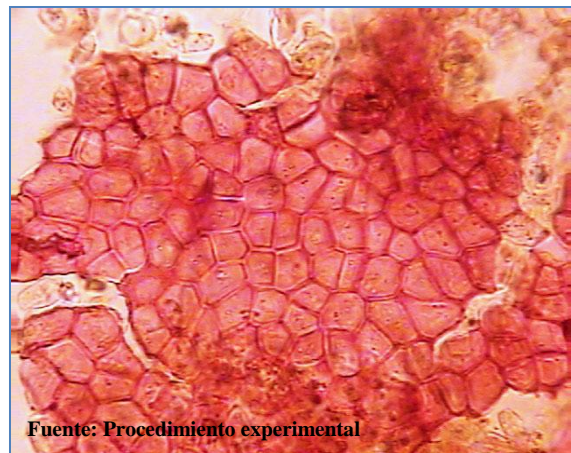
En el folíolo, peciólulo y pecíolo se encontraron varios tipos de tricomas, en su mayoría alargados multicelulares, compuestos de 2 o más células, con cabeza redondeada (Figura 38, 45, 57, 58, 59) y en menor cantidad se observaron en el folíolo tricomas tectores simples unicelulares (Figura 60).

En el pecíolo se evidenciaron células conductoras del floema, los tubos cribosos, los cuales se observaron como células alargadas con paredes perforadas encontrándose unidas por medio de sus bases formando series de células en forma vertical (Figura 61, 62). En el haz vascular se observaron cristales solitarios de oxalato de calcio en forma rectangular (Figura 62). Se presentaron series de vasos perforados unidos por los extremos (Figura 63). Se hallaron gránulos de almidón en el folíolo (Figura 64).



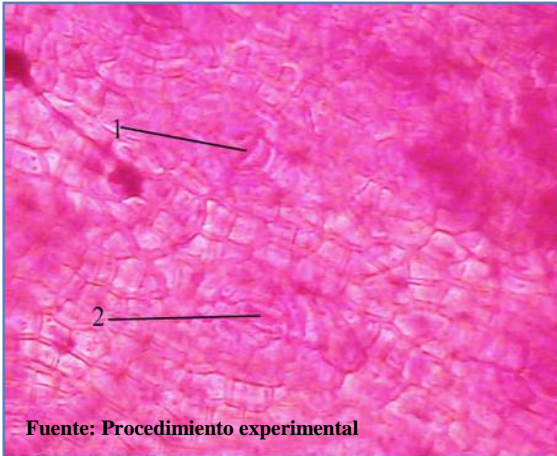
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 31. Folíolo. Células epidérmicas (1), Base de tricoma de 6-8 células (2). (Aumento 1000x).
Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 32. Folíolo, células de epidermis. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



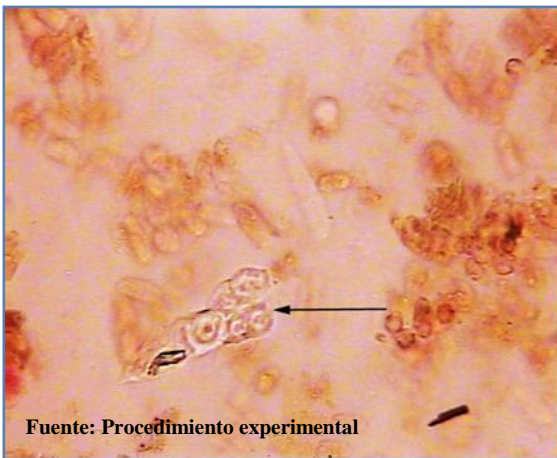
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 33. Pecíolo, células epidérmicas con estomas. Anomocíticos (1), Diacíticos (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



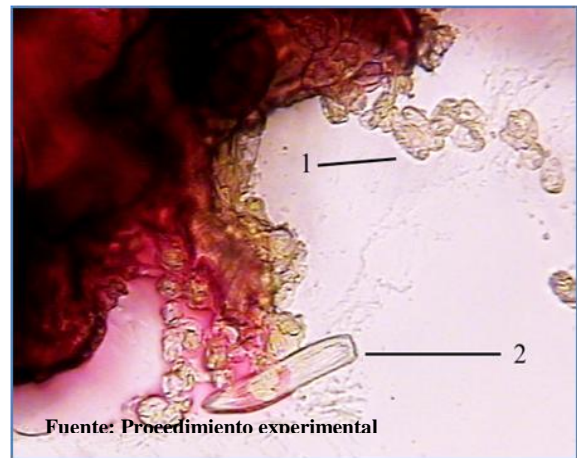
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 34. Pecíólulo. Células de la epidermis (1), Gránulos de reserva (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



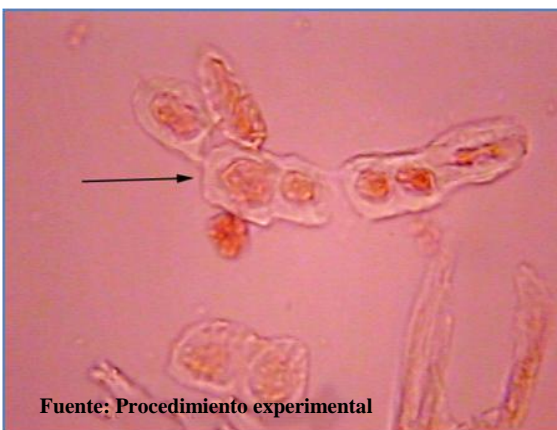
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 35. Folíolo, braquiesclereidas. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 36. Folíolo, células esclerenquimáticas. Braquiesclereidas (1), Macrosclereidas (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 37. Pecíólulo, braquiesclereidas. (Aumento 100x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 38. Pecíólulo. Braquiesclereidas (1), Fibroesclereidas (2), Tricoma glandular bicelular (3). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 39. Pecíolo. Grupo de esclereidas (1), Macroesclereidas (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 40. Pecíolo, macroesclereida en forma de bastón. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 41. Folíolo, fibra de esclerenquima. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



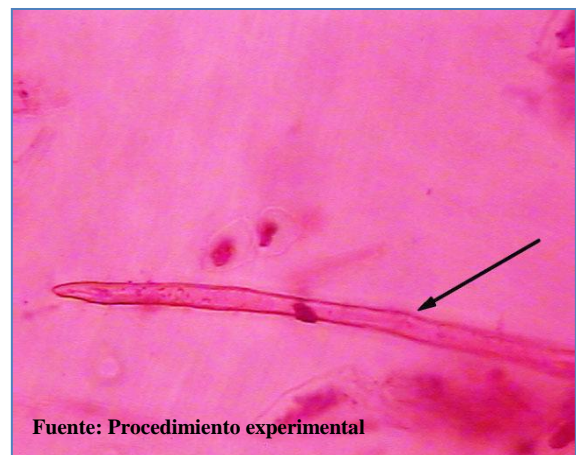
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 42. Pecíolo, fibra de esclerenquima. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 43. Pecíolo, fibra de esclerenquima. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



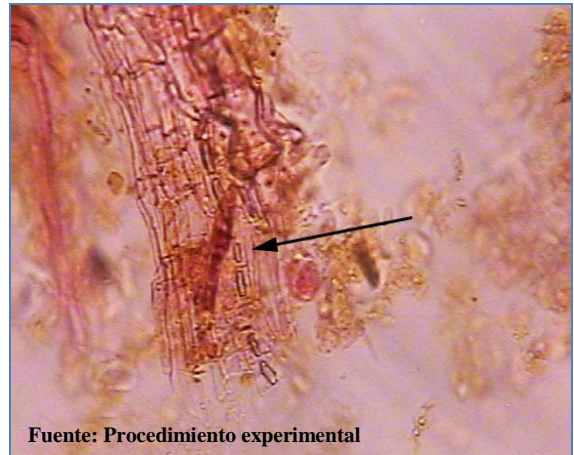
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 44. Pecíolo, fibra septada. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 45. Pecíolo, fibra septada y tricoma bicelular. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 46. Folíolo, fibras septadas conteniendo cristales estiloides de oxalato de calcio. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 47. Folíolo, fibra sílica septada. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 48. Pecíolo, fibrotracheida con cristales solitarios incrustados de oxalato de calcio. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 49. Folíolo, traqueidas con engrosamiento helicado. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



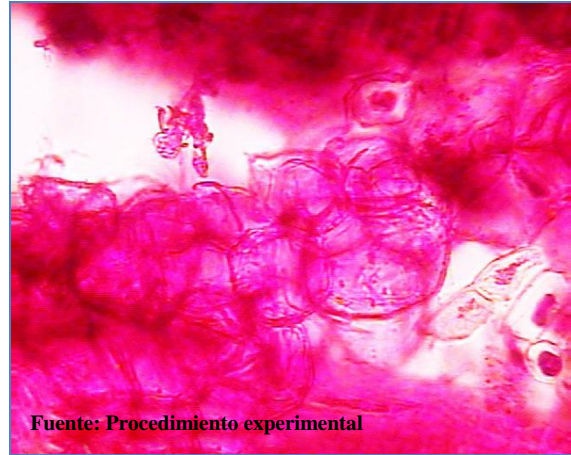
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 50. Folíolo, células parenquimáticas. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



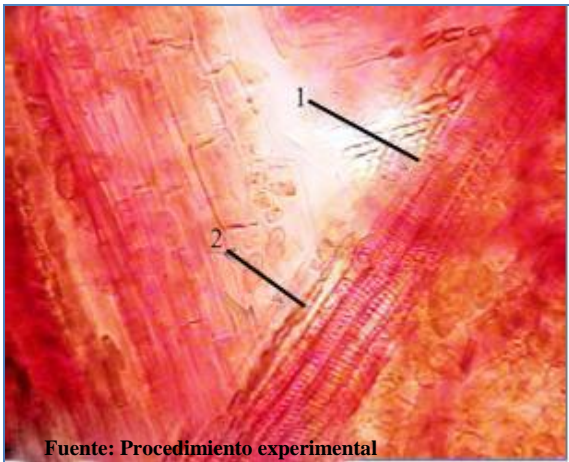
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 51. Pecíolo, células parenquimáticas. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



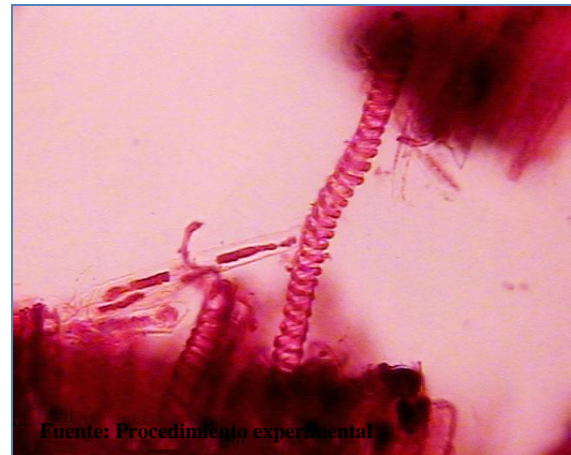
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 52. Pecíolo, células del parénquima medular. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 53. Folíolo. Xilema helicoidal laxa (1), Cristales estiloides de oxalato de calcio (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



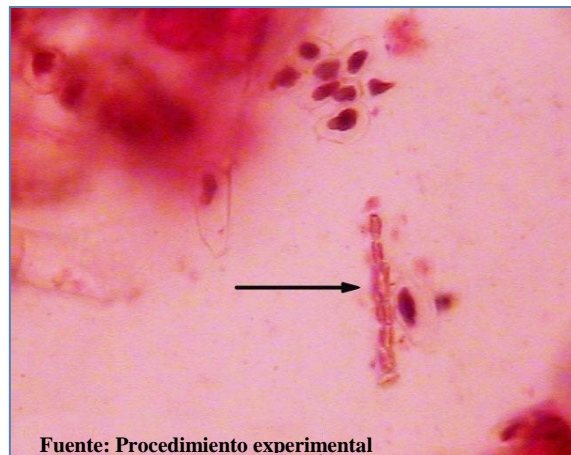
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 54. Pecíolo, xilema helicoidal laxa. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



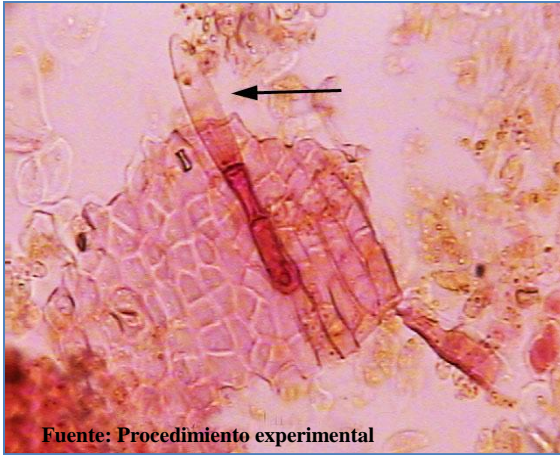
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 55. Pecíolo, xilema helicoidal laxa. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



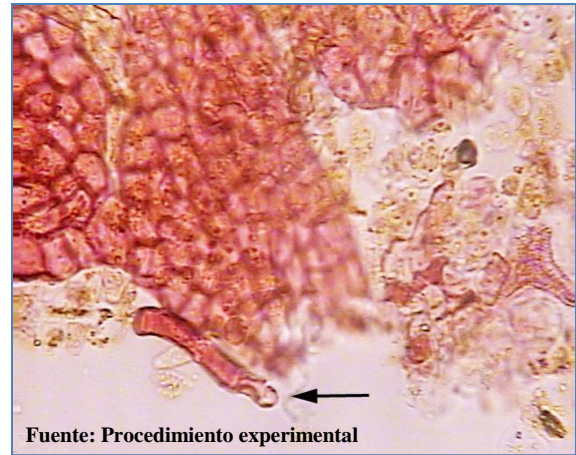
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 56. Pecíolo, cristales estiloides de oxalato de calcio. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 57. Foliolo, tricoma tritelular. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



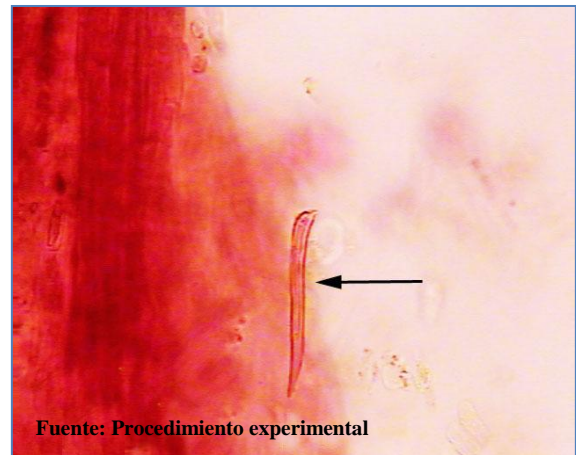
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 58. Foliolo, tricoma pluricelular monoliforme. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



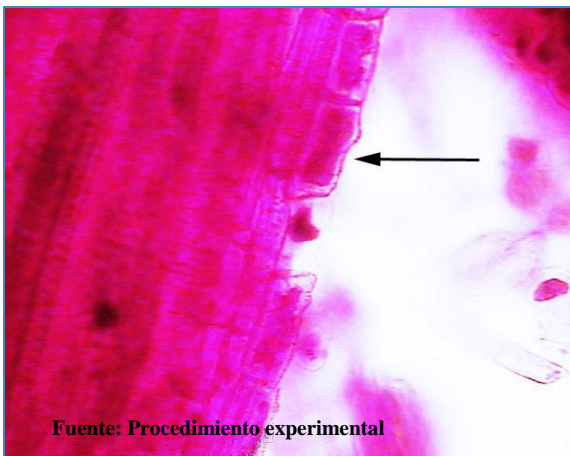
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 59. Pecíolo, tricoma bicelular. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



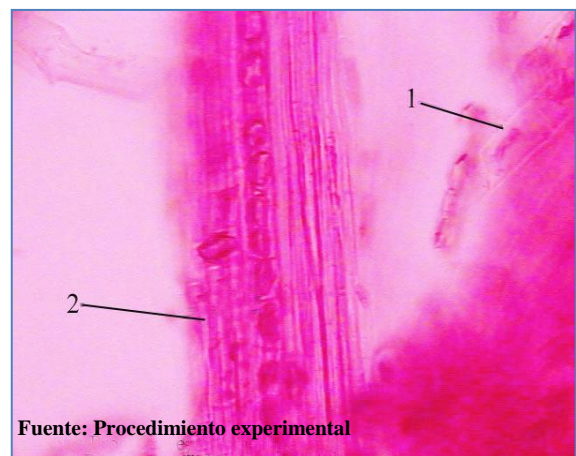
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 60. Foliolo, tricoma tector simple unicelular. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



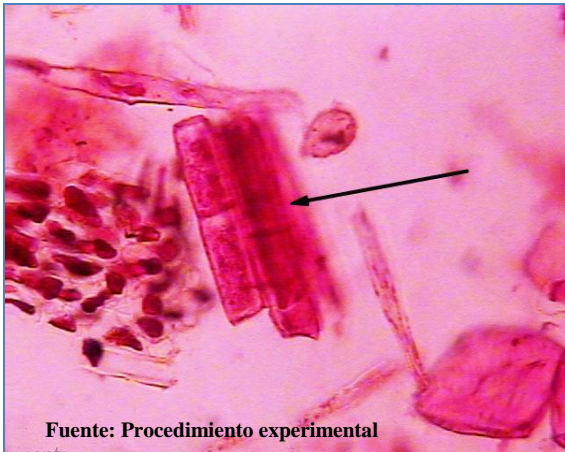
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 61. Pecíolo, tubos cribosos. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 62. Pecíolo. Tubos cribosos (1), Cristales solitarios de oxalato de calcio sobre el haz vascular (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 63. Pecíolo, vasos perforados. (Aumento 400x).
Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 64. Folíolo, gránulos de almidón. (Aumento 400x).
Tinción: Safranina 1%.

3. Tamizaje histoquímico del folíolo, peciólulo y pecíolo

a) Alcaloides: Se encontraron positivos, para el folíolo en la epidermis adaxial, células del parénquima en empalizada y esponjoso (Figura 65), en células del floema y xilema de la nervadura central (Figura 66); el peciólulo presentó reacción positiva en el floema (Figura 67, 68); mientras que el pecíolo se mostró positiva en el xilema evidenciado por un precipitado rojo ladrillo (Figura 69).

b) Mucílagos: Se presentó la coloración azul Francia característico de estos, en el folíolo se evidenció en la epidermis adaxial (Figura 70), en la epidermis de la nervadura central, células del floema, xilema y en los tricomas de esta (Figura 71); en el peciólulo y pecíolo se encontró reacción positiva en la epidermis, colénquima, células esclerenquimáticas, xilema y parénquima medular (Figura 72, 73, 74, 75).

c) Grasas y aceites: Se evidenciaron levemente positivos en la epidermis adaxial y abaxial de la lámina foliar (Figura 76) y en la epidermis de la nervadura central (Figura 77); en el peciólulo se visualizó presencia en la epidermis y el floema (Figura 78, 79); y en el pecíolo la reacción fue levemente positiva en la epidermis y las células del parénquima (Figura 80).

d) Taninos: Para el folíolo la prueba resultó ser positiva en el parénquima en empalizada y levemente positiva en el xilema (Figura 81); para el peciólulo resultó ser positiva para la

epidermis y el xilema (Figura 82); y en el pecíolo se mostró levemente positiva en la epidermis, en el xilema y parénquima medular (Figura 83, 84).

e) Saponinas: La prueba resultó positiva para las 3 partes de la planta en estudio, pero no se logró evidenciar la morfología específica por medio de una figura debido a que se destruyó el material vegetal al reaccionar con el ácido sulfúrico concentrado (Figura 85, 86).

f) Lignina: El peciólulo y pecíolo por ser partes que le brindan sostén al folíolo, poseen mayor cantidad de tejido con celulosa por lo que se les realizó dicha reacción; resultando para ambas partes positiva en el xilema, los haces del xilema y el parénquima medular (Figura 87, 88, 89, 90); además en el peciólulo resultó ser levemente positiva para las células del esclerénquima (Figura 91) mientras que en el pecíolo está se observó positiva (Figura 89, 90).

En el inciso E se muestra la comparación de las pruebas histoquímicas y las determinaciones cualitativas en tubo de ensayo - pruebas presuntivas / Ensayos de cianidina y leucoantocianina- que apoyan la confirmación de la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios y algunos constituyentes inertes.

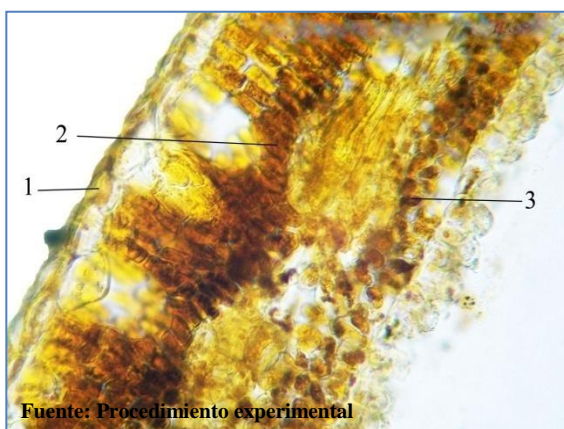


Figura 65. Folíolo, alcaloides positivo en: Epidermis adaxial (1), Parénquima en empalizada (2), Parénquima esponjoso (3). (Aumento 400x). Tinción: Dragendorff.

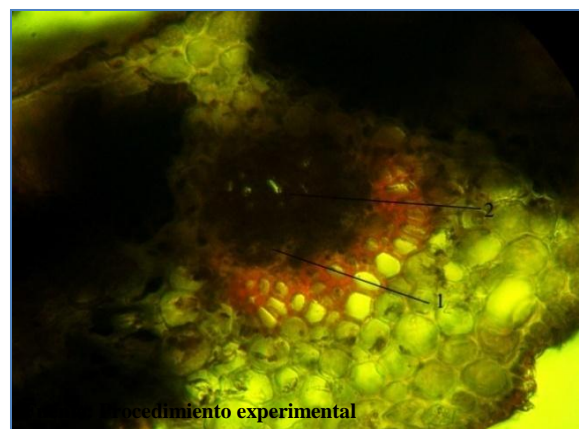
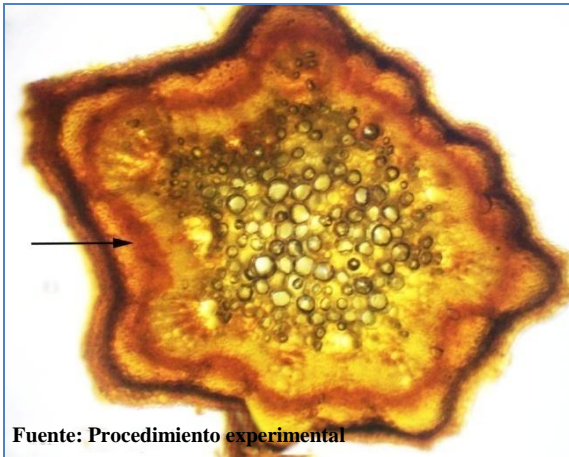
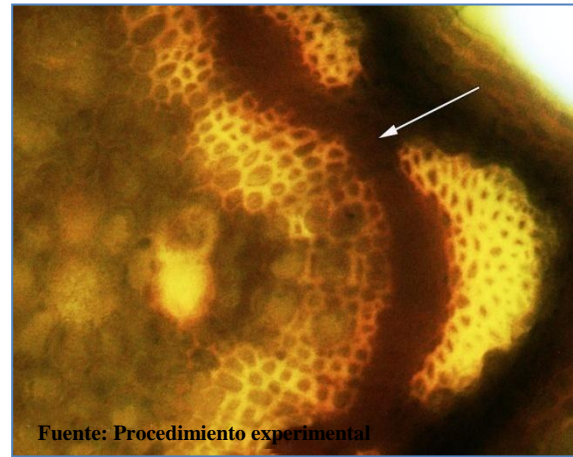


Figura 66. Folíolo, alcaloides positivos en: Células del floema (1), Xilema (2) de la nervadura central. (Aumento 400x). Tinción: Dragendorff.



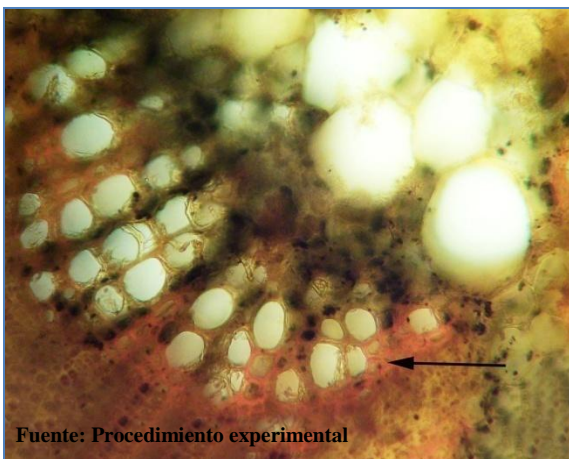
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 67. Pecíolulo, alcaloides positivos en floema. (Aumento 100x). Tinción: Dragendorff.



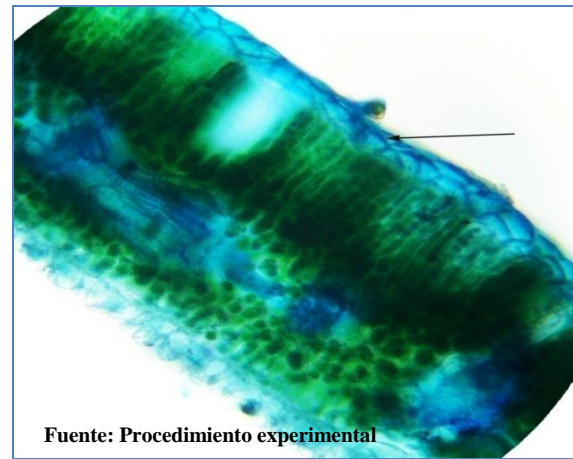
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 68. Pecíolulo, alcaloides positivos en floema. (Aumento 400x). Tinción: Dragendorff.



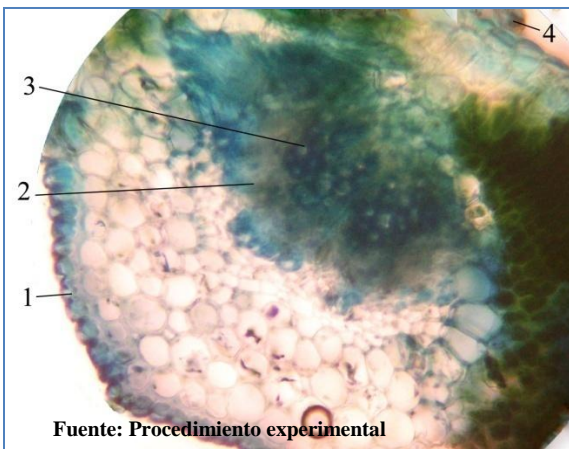
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 69. Pecíolo, alcaloides positivos en xilema. (Aumento 400x). Tinción: Dragendorff.



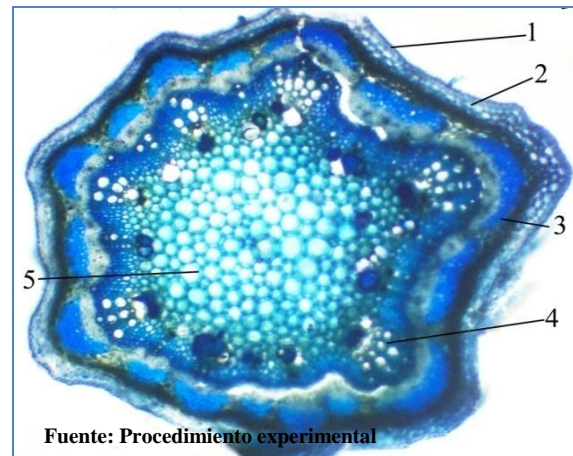
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 70. Folíolo, mucílagos positivos en epidermis adaxial. (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



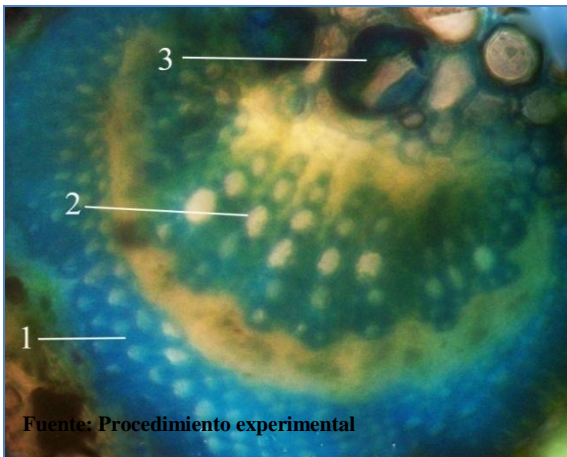
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 71. Folíolo, mucílagos positivos en: Epidermis (1), Floema (2), Xilema (3), Tricoma de la nervadura central (4). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



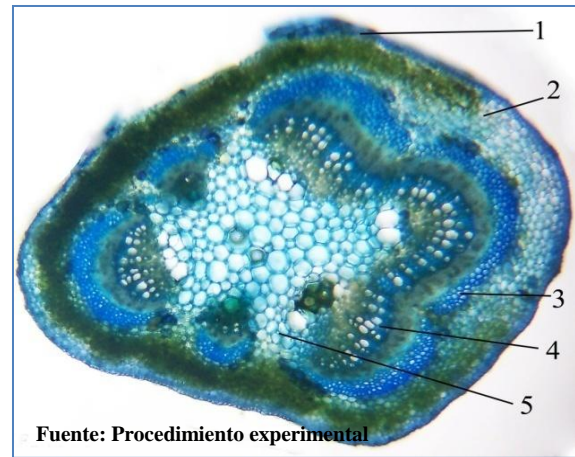
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 72. Pecíolulo, mucílagos positivo en: Epidermis (1), Colénquima (2), Células esclerenquimáticas (3), Xilema (4), Parénquima medular (5). (Aumento 100x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



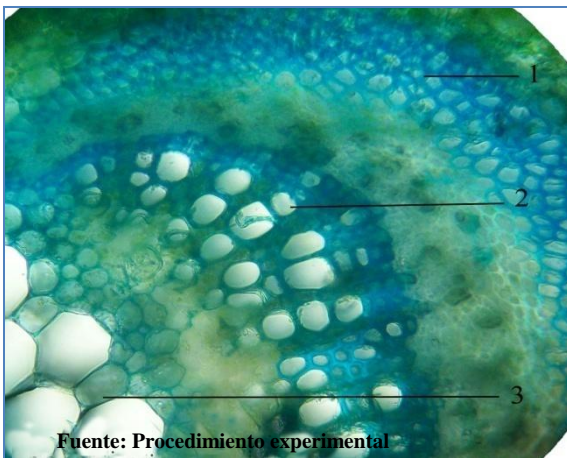
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 73. Pecíolo, mucílagos positivos en: Células esclerenquimáticas (1), Xilema (2), Parénquima medular (3). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



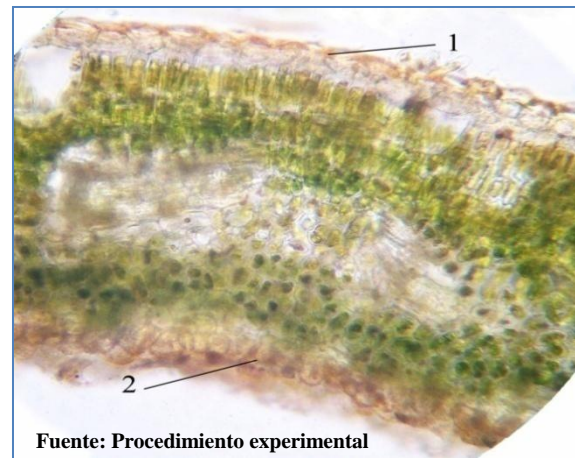
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 74. Pecíolo, mucílagos positivo en: Epidermis (1), Colénquima (2), Células esclerenquimáticas (3), Xilema (4), Parénquima medular (5). (Aumento 100x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



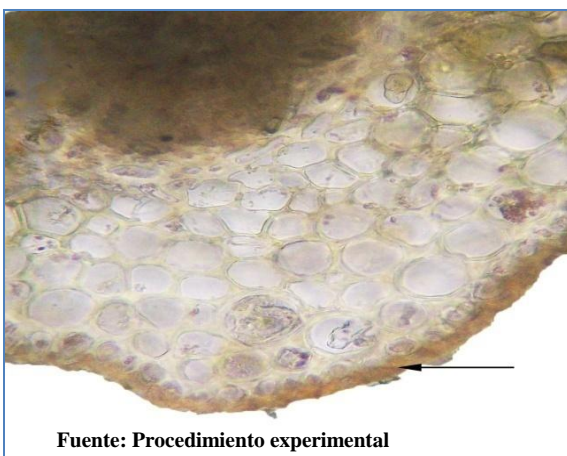
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 75. Pecíolo, mucílagos positivos en: Células del esclerénquima (1), Xilema (2), Parénquima medular (3). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



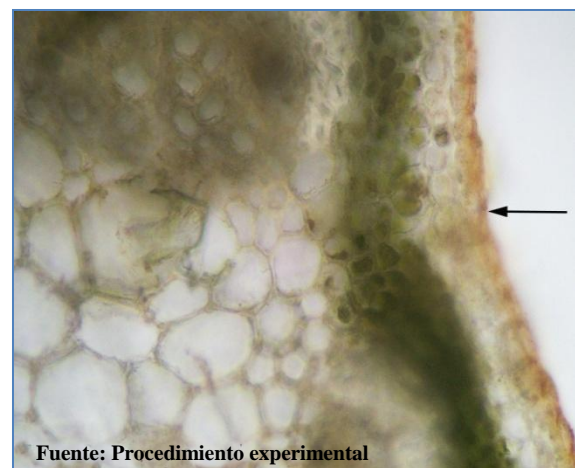
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 76. Foliolo, grasas y aceites positivo en: Epidermis adaxial (1), Epidermis abaxial (2). (Aumento 400x). Tinción: Sudán IV.



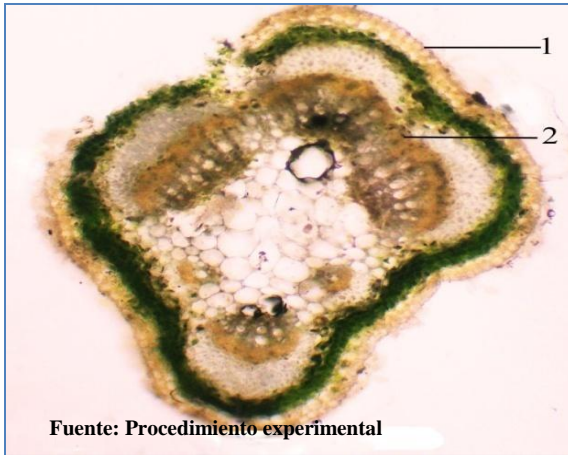
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 77. Foliolo, grasas y aceites positivos en epidermis de nervadura central. (Aumento 400x). Tinción: Sudán IV.



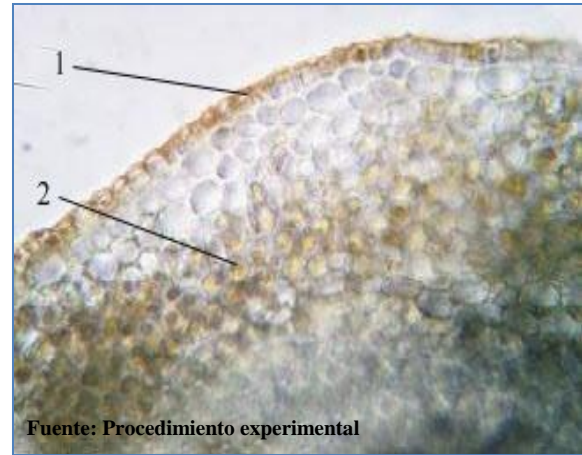
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 78. Pecíolo, grasas y aceites positivos en epidermis. Tinción: Sudán IV.



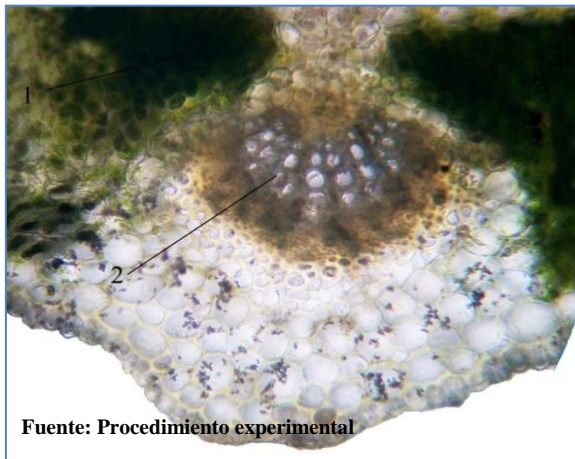
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 79. Pecíolo, grasas y aceites levemente positivos en: Epidermis (1), Floema (2). (Aumento 100x). Tinción: Sudán IV.



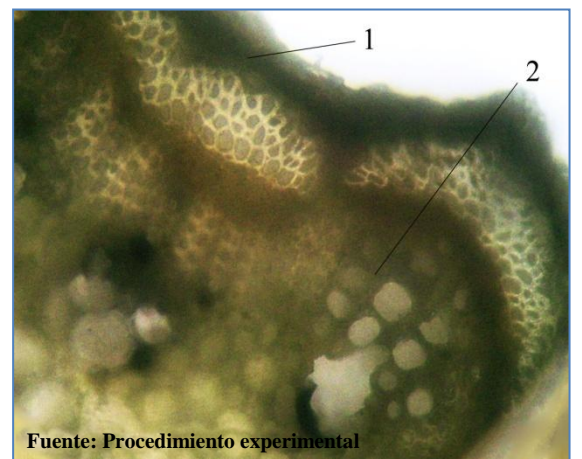
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 80. Pecíolo, grasas y aceites positivo levemente en: Epidermis (1), Células de parénquima (2). (Aumento 400x). Tinción: Sudán IV.



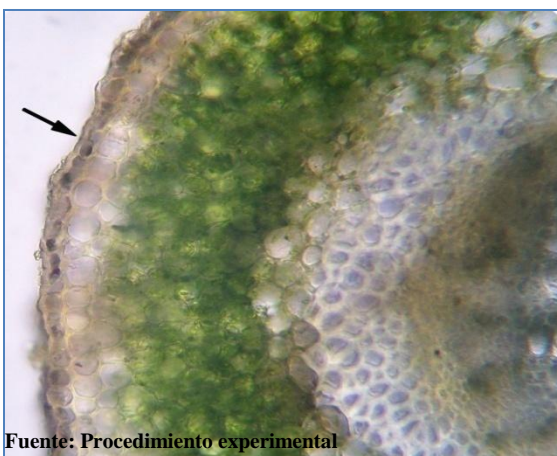
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 81. Folíolo, taninos positivos en: Parénquima en empalizada (1), Levemente positiva en xilema (2). (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



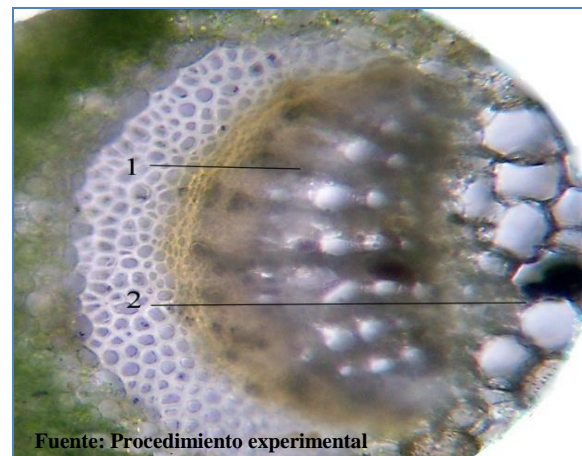
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 82. Pecíolo, taninos positivos en: Epidermis (1), Xilema (2). (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



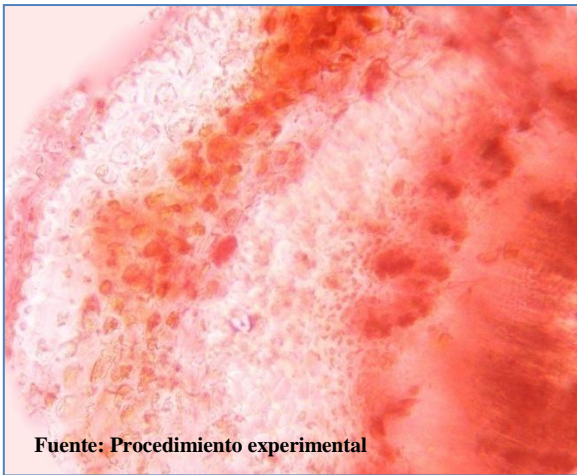
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 83. Pecíolo, taninos levemente positivos en epidermis. (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



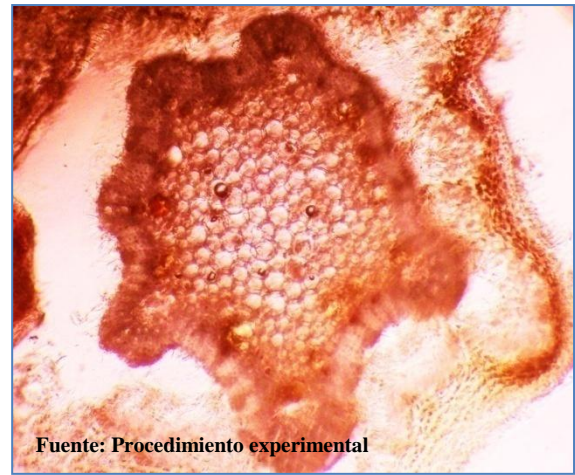
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 84. Pecíolo, taninos levemente positivos en: Xilema (1), Parénquima medular (2). (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



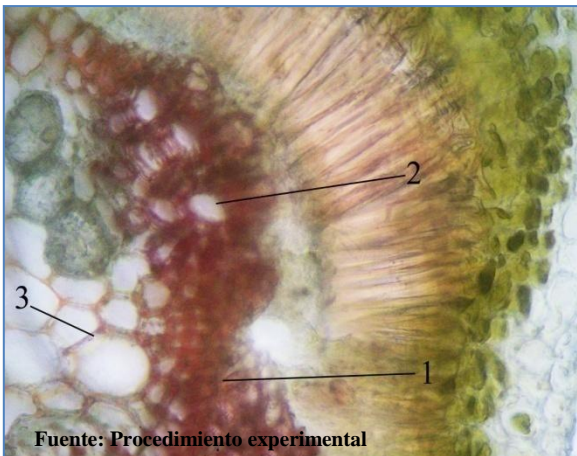
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 85. Foliolo, saponina positiva. (Aumento 400x).
Tinción: H₂SO₄ concentrado.



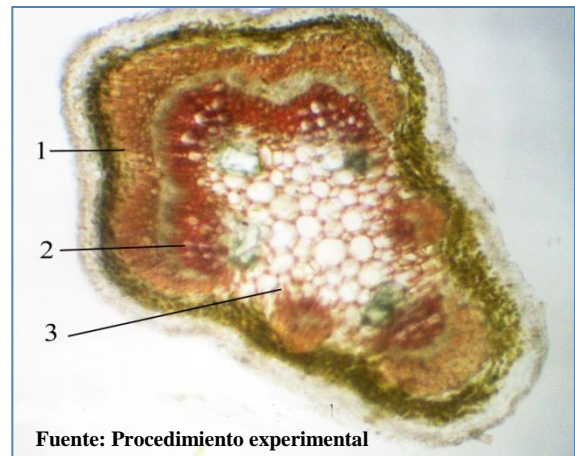
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 86. Peciólulo, saponina positiva. (Aumento 100x). Tinción: H₂SO₄ concentrado.



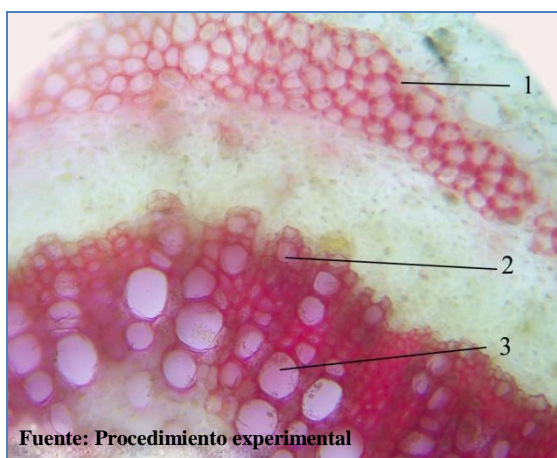
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 87. Peciólulo, lignina positivo en: Xilema (1),
Haces del xilema (2). Parénquima medular (3). (Aumento 400x). Tinción: Floroglucina.



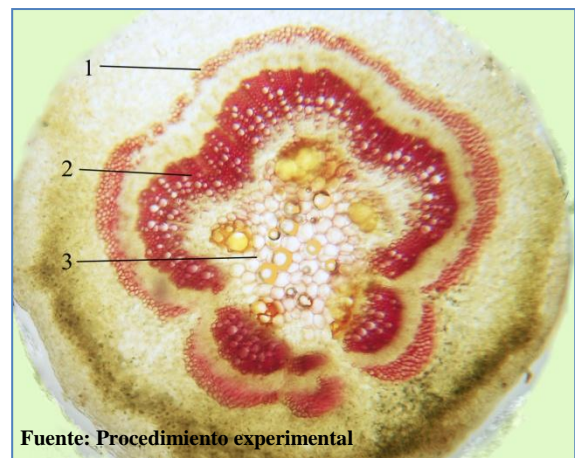
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 88. Peciólulo, lignina levemente positivo en:
Células esclerenquimáticas (1). Positiva en: Xilema
(2), Parénquima medular (3). (Aumento 100x).



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 89. Peciolo, lignina positiva en: Células
esclerenquimáticas (1), Xilema (2), Haces de xilema (3).
(Aumento 400x). Tinción: Floroglucina.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 90. Peciolo, lignina positiva en: Células de
esclerénquima (1), Xilema (2), Parénquima medular (3).
(Aumento 100x). Tinción: Floroglucina.



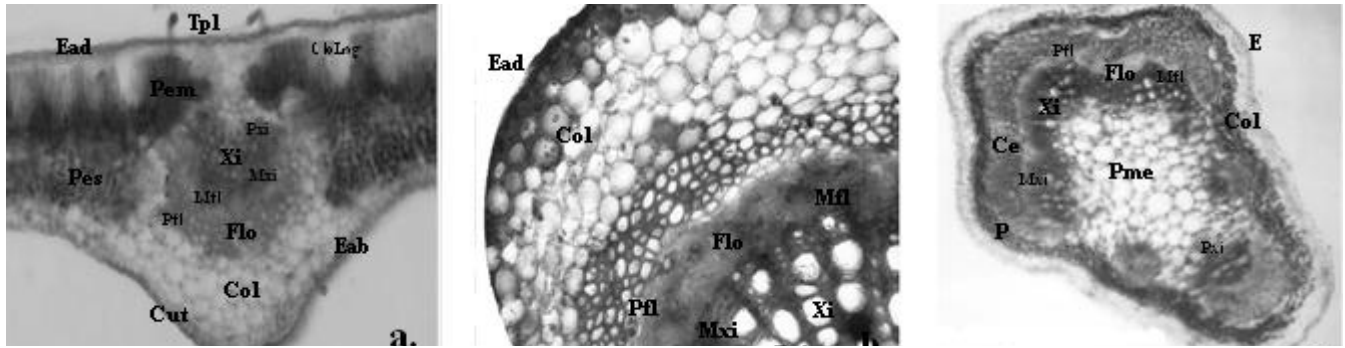
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 91. Pecíolulo, lignina levemente positiva en células esclerenquimáticas. (Aumento 400x).
Tinción: Floroglucina.

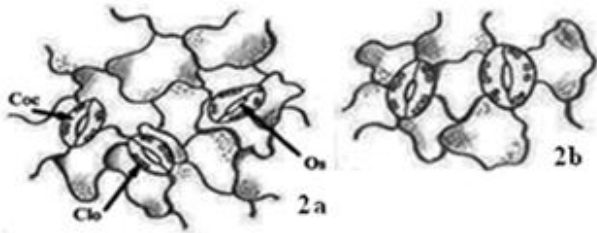
4. Cartilla micrográfica

A continuación se presentan las figuras de los elementos característicos de la droga vegetal de *D. robinoides*.

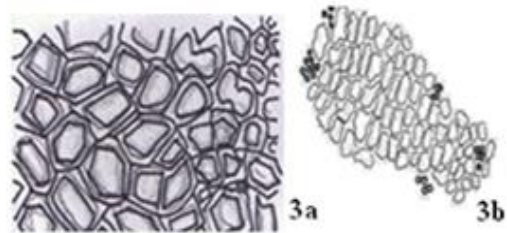
1. Cortes transversales



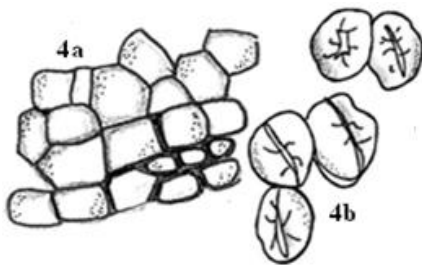
2. Epidermis con estomas



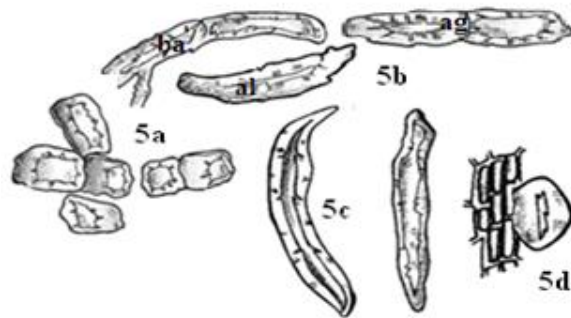
3. Epidermis



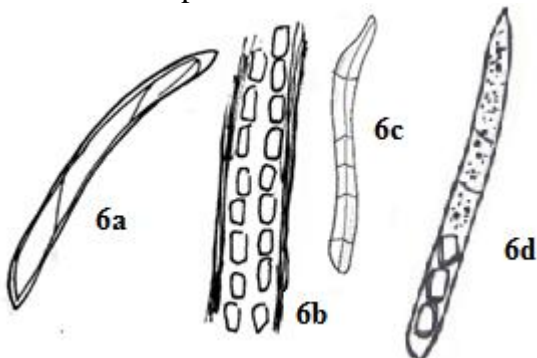
4. Células parenquimáticas



5. Células esclerenquimáticas



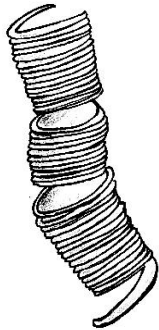
6. Fibras septadas



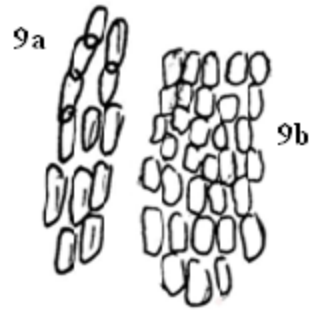
7. Traqueidas



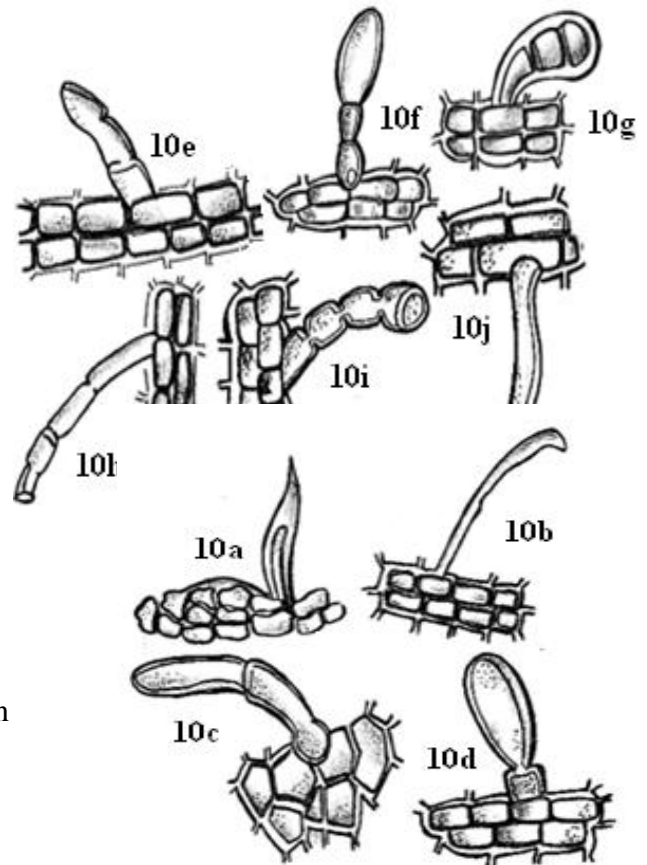
8. Xilema



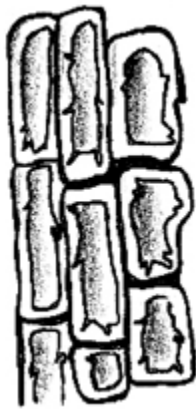
9. Cristales de oxalato de calcio



10. Tricomas



11. Tubos cribosos



12. Vasos punteados



13. Gránulos de almidón



1. Cortes transversales de: 1a. Folíolo, 1b. Peciólulo, 1c. Pecíolo. Se observan los tejidos fundamentales y vasculares que lo conforman: Epidermis adaxial (Ead), epidermis abaxial (Eba), epidermis (E), cutícula (Cut), colénquima (Col), parénquima (P), parénquima en empalizada (Pem), parénquima esponjoso (Pes), clorénquima lagunar (CloLag), células esclerenquimáticas (Ce), floema (Flo), protofloema (Pfl), metafloema (Mfl), xilema (Xi), metaxilema (Mxi), proxilema (Pxi).
2. Epidermis con estomas. 2a, hoja con estomas anisocíticos, nótese los abundantes cloroplastos en las células oclusivas. 2b, hoja con estomas anomocíticos. 2c, corte transversal de peciólulo con estomas anomocíticos y diacíticos.
3. Epidermis. 3a, adaxial del folíolo. 3b, epidermis y gránulos de almidón en el peciólulo.
4. Células parenquimáticas. 4a, del folíolo. 4b, del pecíolo.
5. Células del esclerenquima. 5a, braquiesclereidas del folíolo, peciólulo y pecíolo. 5b, macrosclereidas del folíolo y pecíolo; estas se encuentran de forma alargada (al), en agrupaciones (ag) para el pecíolo y en forma de bastón (ba) para el peciólulo. 5c, fibroesclereidas para el folíolo, peciólulo y pecíolo. 5d, esclereidas en el pecíolo y células de la epidermis.
6. Otros tipos de fibras. 6a, septadas en el pecíolo. 6b, septadas en el folíolo con cristales estiloides de oxalato de calcio. 6c, xílicas septadas en el folíolo. 6d, fibrotraqueida con incrustaciones de cristales solitarios de oxalato de calcio en el pecíolo.
7. Traqueidas en el folíolo.
8. Xilema helicoidal laxa en folíolo, peciólulo y pecíolo.
9. Cristales de oxalato de calcio. 9a, estiloides en el folíolo y pecíolo. 9b, solitarios en el pecíolo.
10. Tricomas. 10a, unicelular en peciólulo. 10b, unicelular simple en pecíolo. 10c, bicelular en el peciólulo. 10d, bicelular en el folíolo. 10e, glandular tricelular del peciólulo. 10f, glandular tricelular de folíolo. 10g, pluricelular glandular de folíolo. 10h, pluricelular de pecíolo. 10i, monoliforme de folíolo. 10j, tector simple unicelular del folíolo.
11. Tubos cribosos del pecíolo. 12. Vasos perforados en el pecíolo. 13. Gránulos de almidón en el folíolo.

B. *H. courbaril*

1. Caracteres macroscópicos de identificación botánica: Árbol de aproximadamente 10-30 m de altura. Las hojas son de tipo alternas asimétricas compuestas por un par de folíolos inequiláteros de 5-10 cm de largo incluyendo el pecíolo, una venación poco prominente; las flores grandes blanco verdosas de 3.5 cm de diámetro. Los frutos son vainas de 10 cm de largo por 4 cm de ancho y contienen de 3-4 semillas. Los frutos son de tipo legumbre con una cáscara leñosa muy dura, pero entre la cáscara y las semillas tienen un polvo blanco (Figura 92). Se preparó e identificó el ejemplar de herbario y se ingresó en el Herbario Biología de Guatemala (BIGU), Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC; con el número 52932 (Anexo 1, 2).



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 92. Ejemplar de herbario de *H. courbaril*.

2. Caracteres micromorfológicos e histológicos para identificación

a) Caracteres micromorfológicos: En el folíolo bifacial, peciólulo y pecíolo se observaron los tejidos vasculares y los fundamentales de sostén. El tejido vascular de estos se encuentra dispuesto en posición central (Figura 93, 94, 95). El haz vascular, conformado por el xilema y floema, del folíolo es de forma bicolateral; debido a que el xilema se encuentra empareado entre 2 casquetes de floema, el del peciólulo es de forma perifloemática ya que el floema se encuentra tanto del lado interior como exterior del xilema, mientras que el del pecíolo es de forma colateral abierta ya que el xilema se encuentra en forma lineal e interna y el floema se localiza externamente separado del xilema por un procámbium; para las 3 partes en estudio por su localización el xilema es endarco (Figura 96, 97, 98, 99). En el folíolo se denota solo un haz vascular, en el peciólulo se observaron 4 haces vasculares ocupando una posición central en forma de cilindro sin presentarse parénquima medular; a diferencia del pecíolo en el cual se evidenciaron 6 alrededor del parénquima medular (Figura 93, 94, 95). Los haces vasculares del pecíolo forman un anillo continuo semejante a una estela del tipo sifonostela-euestela (Figura 95).

En el tejido fundamental se observaron tejidos de colénquima lagunar, parénquima, esclerénquima con paredes lignificadas y parénquima medular, este último únicamente en el pecíolo (Figura 94, 95, 96). El parénquima medular presenta células de diversos tamaños pero de similar morfología (Figura 95). En el peciólulo y pecíolo se visualizó una capa extensa de tejido de colénquima con canales resiníferos (Figura 94, 95, 100, 101). Por medio de un corte transversal del folíolo se diferenciaron los tejidos fundamentales de la lámina foliar, se identificó parénquima en empalizada y esponjoso; el último se encuentra hacia la epidermis abaxial con una distribución y aspecto irregular redondeado integrado por 8-9 capas. El parénquima en empalizada se encuentra conformado por 2-3 capas de células de contornos lisos con distribución a lo largo del folíolo dirigidas hacia la epidermis adaxial. Se observaron haces vasculares transcurrentes dispuestos en forma vertical rodeados de parénquima. La epidermis adaxial se observó más gruesa, mientras que la abaxial se evidenció de grosor intermedio; ambas son monoestratificadas y con cutículas evidentes (Figura 102).

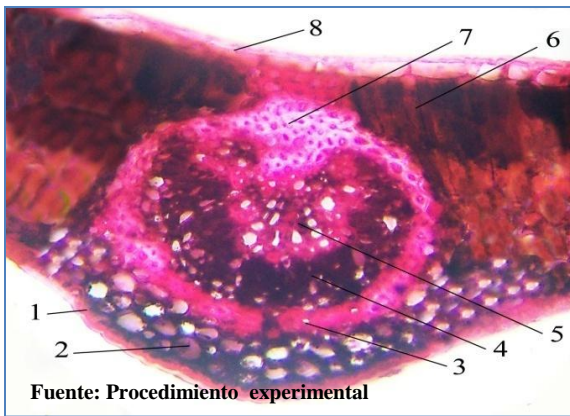


Figura 93. Folículo, tejidos fundamentales y de sostén. Epidermis (1), Colénquima (2), Esclerenquima (3), Floema (4), Xilema (5), Parénquima en empalizada (6) Células esclerenquimáticas (7), Epidermis (8). (Aumento 400x). Tinción: Safranina fast-green.

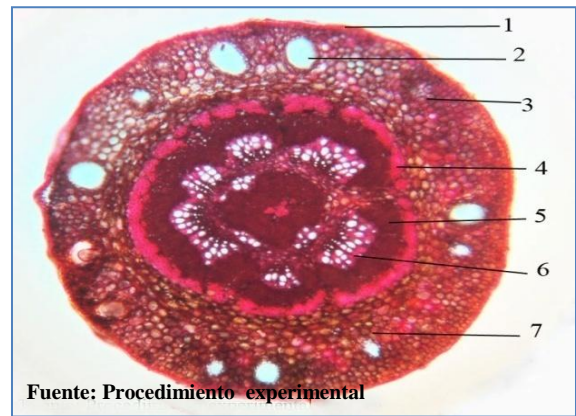


Figura 94. Pecíolo, tejidos fundamentales y de sostén. Epidermis (1), Canales resiníferos (2), Colénquima (3), Esclerenquima (4), Floema (5), Xilema (6), Parénquima (7). (Aumento 400x). Tinción: Safranina fast-green.



Figura 95. Pecíolo, tejidos vasculares y fundamentales de sostén. Epidermis (1), Canales resiníferos (2), Colénquima (3), Parénquima (4), Células esclerenquimáticas (5), Floema (6), Xilema (7), Parénquima medular (8). (Aumento 400x). Tinción: Safranina fast-green.

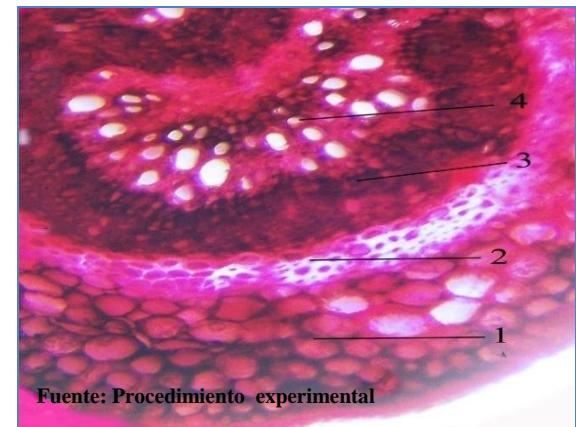


Figura 96. Folículo, tejidos fundamentales y vasculares. Colénquima (1), Células esclerenquimáticas (2), Floema (3), Xilema (4). (Aumento 400x). Tinción: Safranina fast-green.

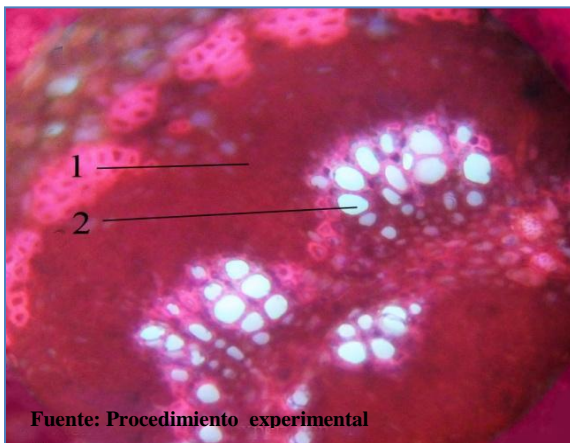


Figura 97. Pecíolo, tejidos vasculares. Floema (1), Xilema (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina fast-green.

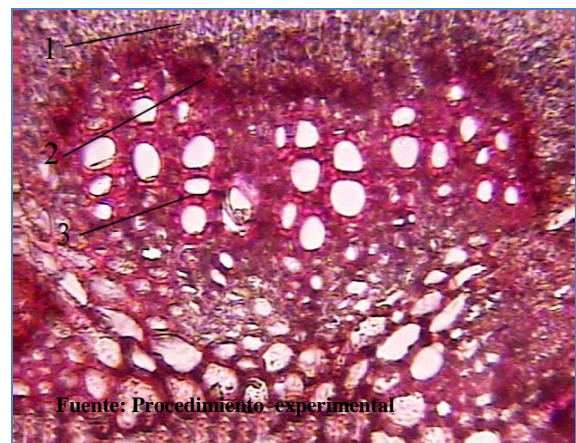
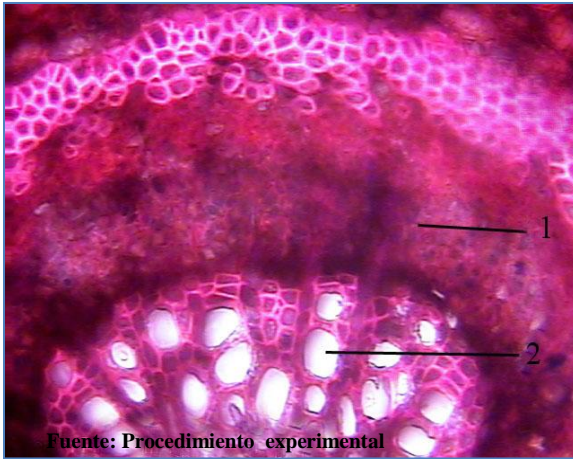
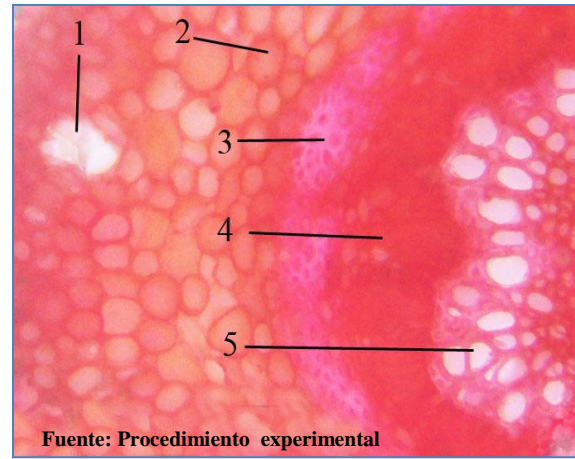


Figura 98. Pecíolo, haz vascular. Floema (1), Procámbium (2), Xilema (3). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



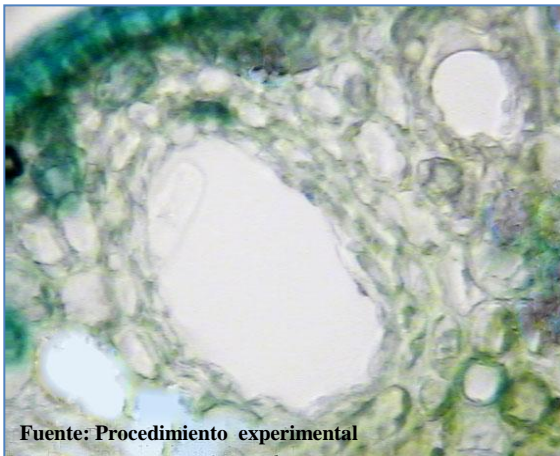
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 99. Pecíolo, tejidos vasculares. Floema (1), Xilema (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina fast-green.



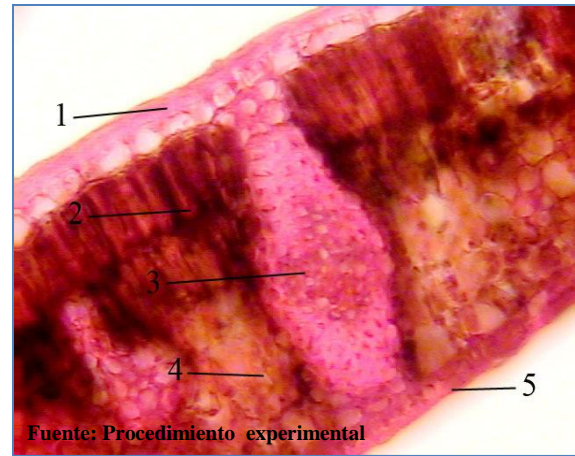
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 100. Pecíolo, tejidos fundamentales. Canales resiníferos (1), Colénquima (2), Esclerenquima (3), Floema (4), Xilema (5). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 101. Pecíolo, canales resiníferos. (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 102. Folíolo, tejidos fundamentales de la lámina foliar. Cutícula de epidermis adaxial (1), Parénquima en empalizada (2), Haz vascular transcurrente (3), Parénquima esponjoso (4), Cutícula de epidermis abaxial (5). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

b) Diafanizado del folíolo: Presenta un ápice cordado (Figura 103). Se visualizaron traqueidas de bordes irregulares y con engrosamientos en sus paredes laterales con disposición helicoidal (Figura 104). La nervación es abierta y reticulada, el término de la venación es de tipo anastomosada; presenta margen entero (Figura 105, 106). Se observó la vascularización foliar (Figura 107). Así mismo, se observó la venación en la nervadura central (Figura 108). En la epidermis abaxial se evidenciaron células de bordes irregulares y aparatos estomáticos conformados por estomas diacíticos, sin presencia de cloroplastos en

sus células oclusivas y con 2 células subsidiarias; arreglados en línea paralela, horizontal y diagonal al eje transversal del folíolo (Figura 109, 110). Por debajo de la epidermis adaxial se visualizó el tejido parenquimático denominado clorénquima conformado por células de forma redonda separadas por pequeños espacios intercelulares (Figura 111).



Figura 103. Folíolo, ápice cordado. (Aumento 400x).
Tinción: Safranina 1%.

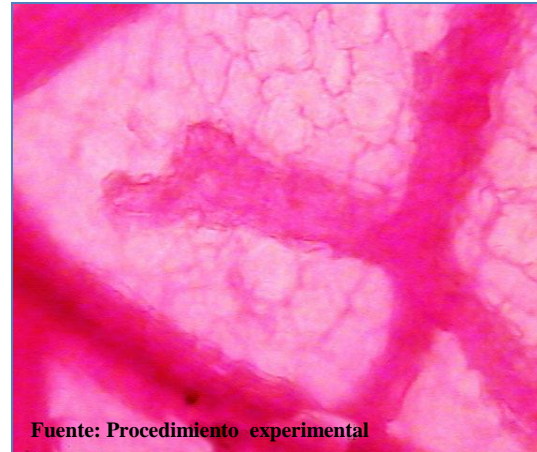


Figura 104. Folíolo, traqueidas con disposición helicoidal. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Figura 105. Folíolo, nervación abierta y reticulada. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

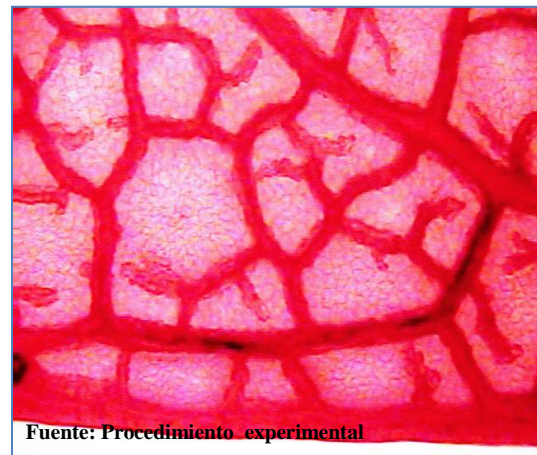


Figura 106. Folíolo, término de venación tipo anastomosada, margen entero. (Aumento 400x).
Tinción: Safranina 1%.

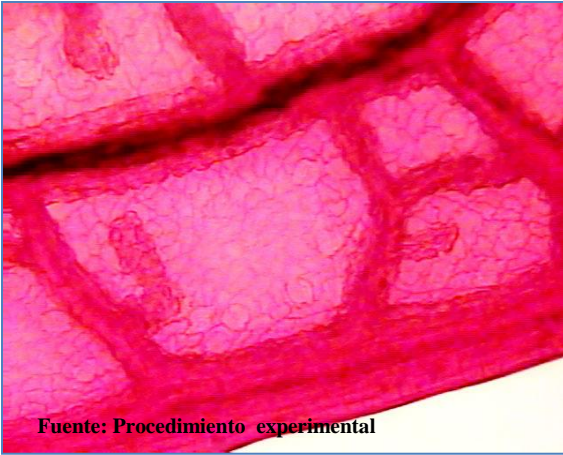


Figura 107. Folíolo, vascularización foliar. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

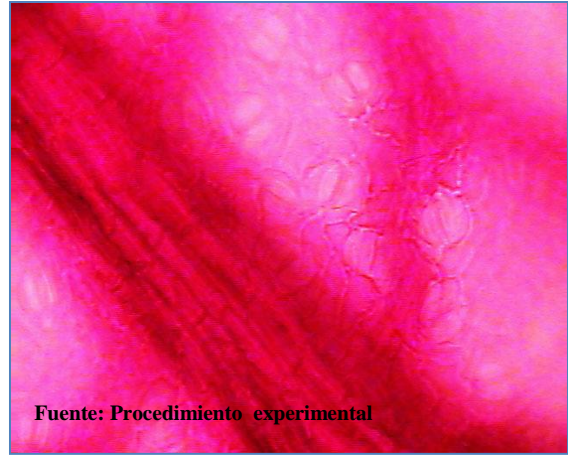


Figura 108. Folíolo, venación de la nervadura central. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

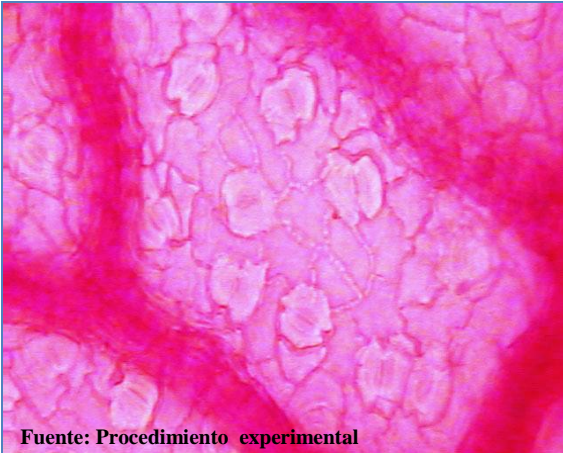


Figura 109. Folíolo, epidermis abaxial conformada por estomas diaclíticos. (Aumento 1000x). Tinción: Safranina 1%.

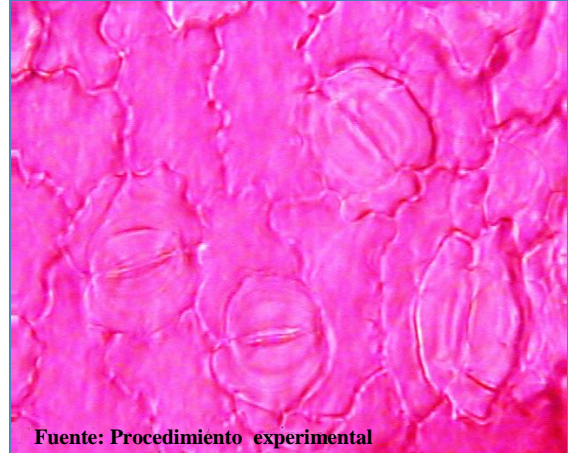


Figura 110. Folíolo, epidermis abaxial con estomas diaclíticos. (Aumento 1000x). Tinción: Safranina 1%.

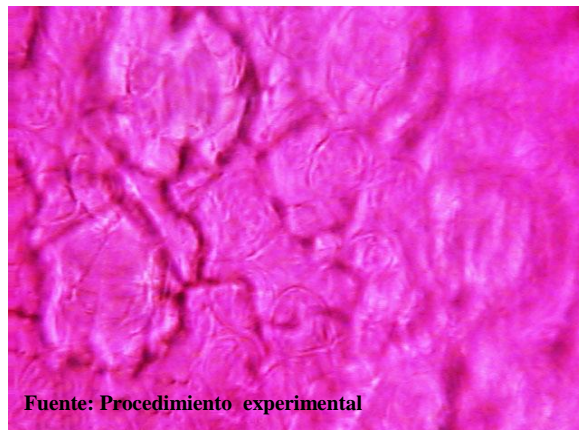


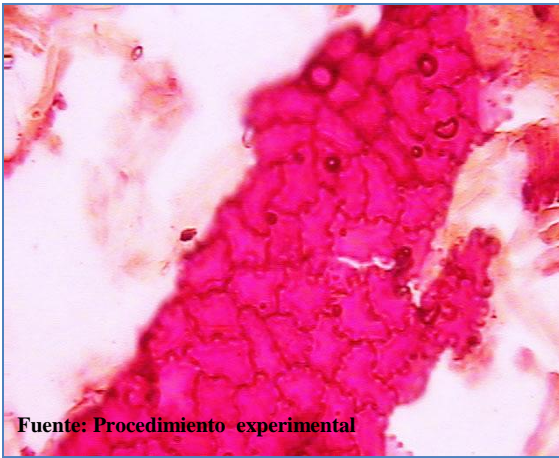
Figura 111. Folíolo, epidermis adaxial obsérvese el tejido del clorénquima. (Aumento 1000x). Tinción: Safranina 1%.

c) Disociado del folíolo, peciólulo y pecíolo: Las estructuras encontradas en el disociado del peciólulo y pecíolo fueron las mismas por lo tanto se muestra una figura para ambos. En el folíolo, peciólulo y pecíolo se observaron células irregulares y poligonales de la epidermis superior muy unidas entre sí (Figura 112, 113). En el folíolo se observaron estomas diacíticos sobre la epidermis (Figura 114). En el peciólulo y pecíolo se visualizaron células de la hipodermis o de corcho (Figura 115).

Así mismo, se observaron células esclerenquimáticas con paredes engrosadas de formas variadas; en el folíolo, peciólulo y pecíolo se presentaron macroesclereidas como células alargadas de forma prismática (Figura 116, 117, 118); en el peciólulo y pecíolo se encontraron células cortas de forma isodiamétrica conocidas como braquiesclereidas (Figura 119). Para el folíolo se evidenciaron fibras del esclerénquima con forma isodiamétrica alargadas y puntiagudas (Figura 120).

Se visualizaron en el folíolo otros tipos de fibras con incrustaciones de cristales solitarios rectangulares con bordes redondeados e irregulares de oxalato de calcio (Figura 121). Tanto para el peciólulo y pecíolo se observaron células del parénquima con paredes delgadas y de forma irregular (Figura 118, 122). Se encontraron elementos de xilema del tipo helicoidal, para el folíolo, peciólulo y pecíolo doble helicada; y además para los 2 últimos helicoidal laxa (Figura 123, 124, 125); y se observaron en el folíolo porciones de los tubos xilemáticos: las placas perforadas simples (Figura 126).

Se observaron abundantes cristales rectangulares con bordes irregulares de oxalato de calcio del tipo arena (Figura 125, 127); además en la nervadura central del folíolo se observaron del tipo solitario (Figura 128). El folíolo posee tricomas tectores simples (Figura 129) y glandulares bicelulares (Figura 130).



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 112. Folíolo, células de la epidermis superior.
(Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 113. Pecíolo, células de la epidermis superior.
(Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



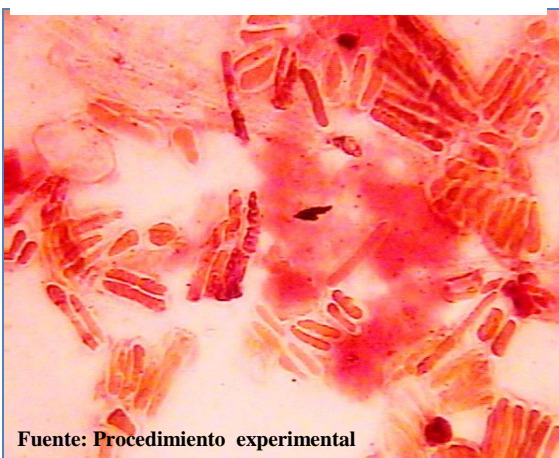
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 114. Folíolo, epidermis con estomas diacíticos,
(Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



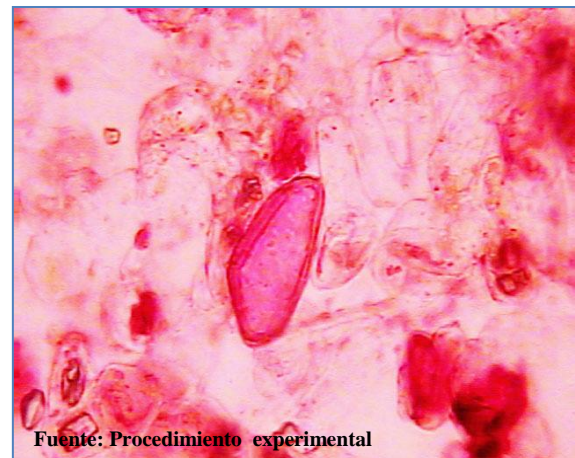
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 115. Pecíolo, hipodermis o células de corcho.
(Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 116. Folíolo, macroesclereidas. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 117. Pecíolo, macroesclereida. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

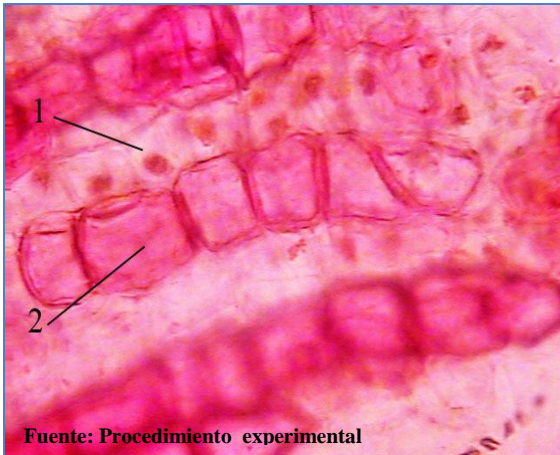


Figura 118. Pecíolo. Macroesclereidas (1), Células parenquimáticas (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

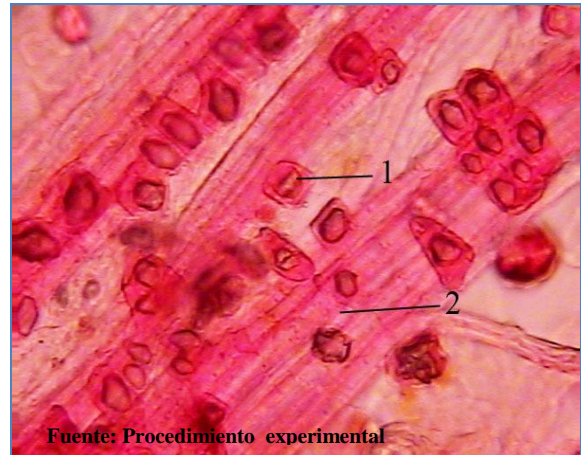


Figura 119. Pecíolo. Braquiesclereidas (1), Células del esclerenquima (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Figura 120. Folíolo, fibras del esclerenquima. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Figura 121. Folíolo, fibra con incrustaciones de cristales solitarios de oxalato de calcio. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

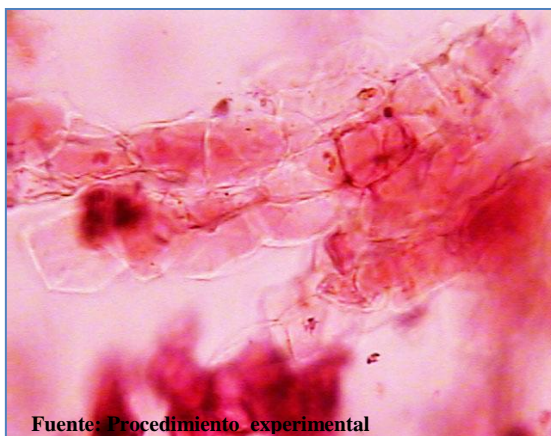


Figura 122. Pecíolo, células del parénquima. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

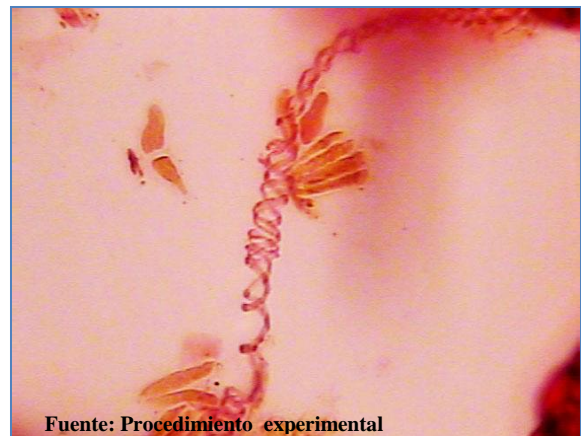
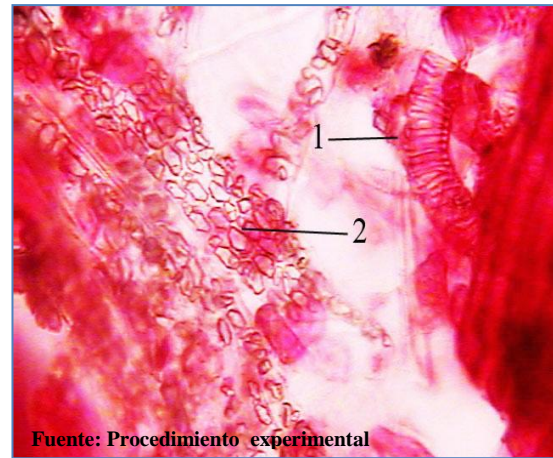


Figura 123. Folíolo, xilema doble helicado. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 124. Pecíolo, Xilema doble helicado (1), Xilema helicoidal laxo (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



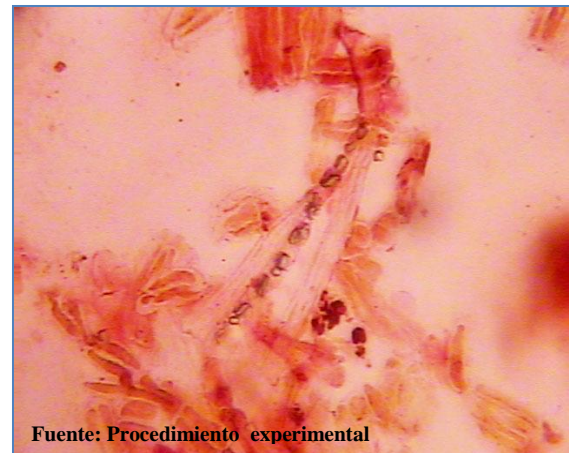
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 125. Pecíolo, Xilema helicoidal laxo (1), Cristales arenosos de oxalato de calcio (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



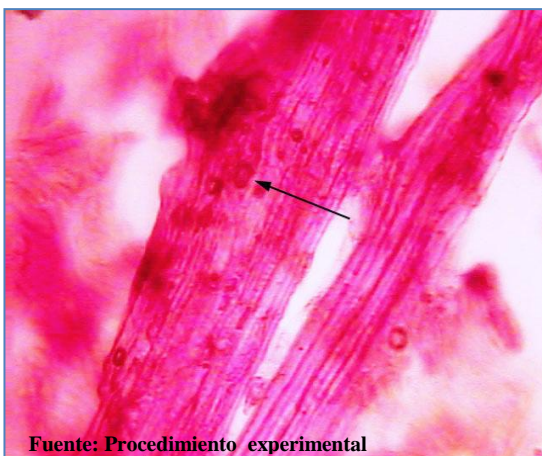
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 126. Folículo, placa perforada simple. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



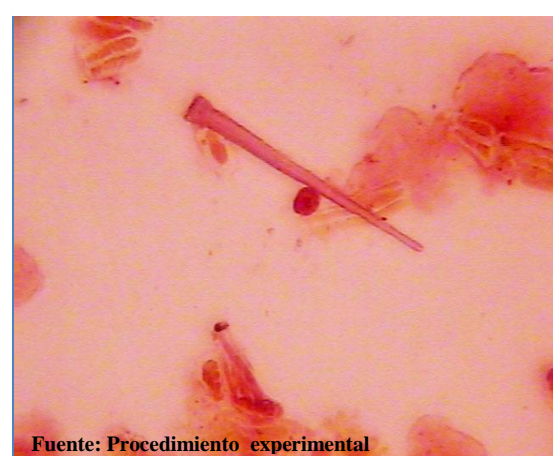
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 127. Folículo, cristales arenosos de oxalato de calcio. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 128. Folículo, cristales solitarios de oxalato de calcio sobre la nervadura. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 129. Folículo, tricoma tector simple. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Figura 130. Folíolo, tricoma glandular bicelular.
(Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

3. Tamizaje histoquímico del folíolo, peciólulo y pecíolo

a) Alcaloides: En el folíolo se evidenció una reacción negativa (Figura 131, 132). En el peciólulo resultó positiva para el xilema a diferencia del pecíolo la cual fue levemente positiva en el esclerénquima y el xilema (Figura 133, 134).

b) Mucílagos: Se observó reacción positiva en la epidermis de la nervadura central del folíolo y en la epidermis del peciólulo; además para ambas partes en estudio en el colénquima, esclerénquima, floema y xilema. Así mismo, en el folíolo se observó en la epidermis adaxial, abaxial, parénquima y en los haces vasculares transcurrentes (Figura 135, 136, 137, 138, 139). En el pecíolo se evidenció reacción positiva en la epidermis, colénquima y xilema; levemente positiva en el esclerénquima (Figura 140, 141).

c) Grasas y aceites: En el folíolo la reacción fue positiva en la epidermis de la nervadura central (Figura 142), en el corte transversal del mismo se observa positiva para la epidermis adaxial, parénquima empalizada y esponjoso (Figura 143). En el peciólulo y pecíolo se evidenció reacción positiva únicamente en la epidermis (Figura 144, 145, 146).

d) Taninos: Se encontraron positivos en el folíolo para el colénquima, parénquima, floema, parénquima esponjoso y en empalizada (Figura 147, 148). Para el peciólulo levemente

positiva en el floema (Figura 149), mientras que el colénquima y floema del pecíolo resultaron positivos (Figura 150).

e) Saponinas: Para el folíolo, peciólulo y pecíolo la reacción fue positiva en el floema (Figura 151, 152, 153); en el folíolo levemente positivo en el parénquima en empalizada (Figura 154).

f) Lignina: En el pecíolo se evidenció la presencia de lignina en los haces del xilema (Figura 155, 156).

En el inciso E se muestra la comparación de las pruebas histoquímicas y las determinaciones cualitativas en tubo de ensayo - pruebas presuntivas / Ensayos de cianidina y leucoantocianina- que apoyan la confirmación de la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios y algunos constituyentes inertes.

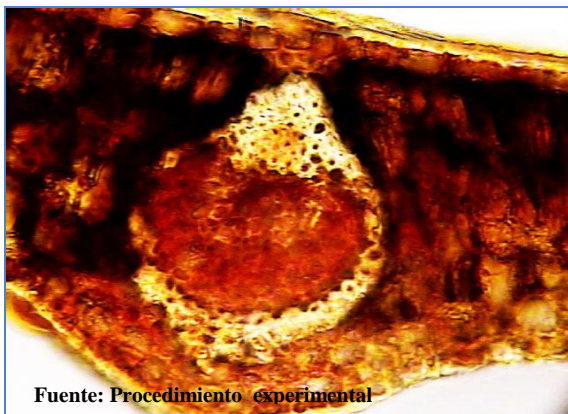


Figura 131. Folíolo, alcaloides negativos en nervadura central. (Aumento 400x). Tinción: Drangendorff.

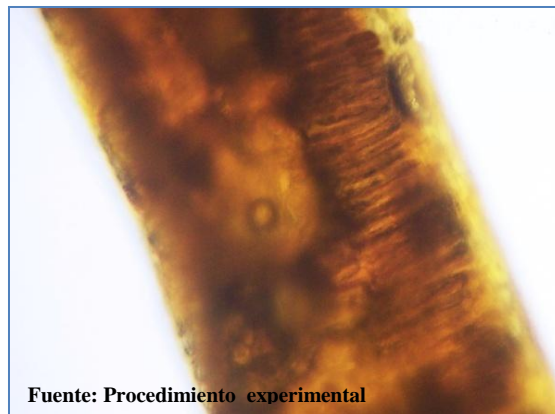
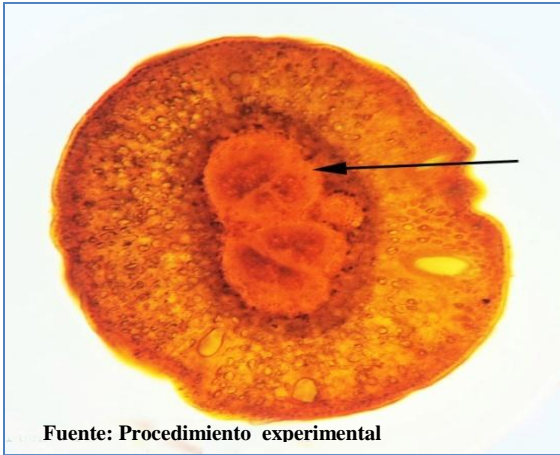
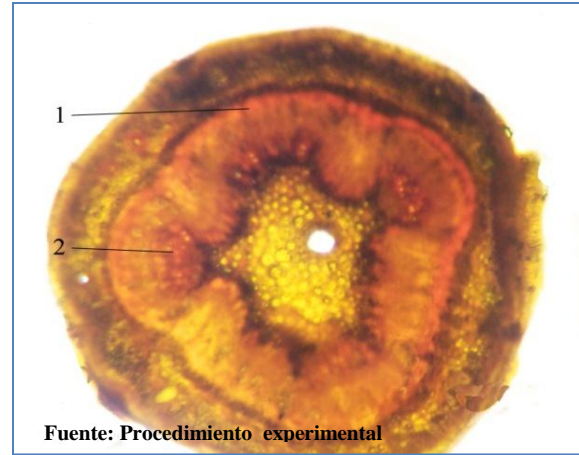


Figura 132. Folíolo, alcaloides negativos en la lámina foliar. (Aumento 400x). Tinción: Drangendorff.



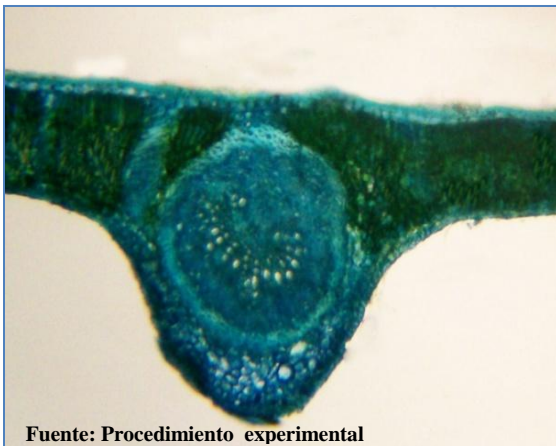
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 133. Pecíolo, alcaloides positivos en xilema. (Aumento 100x). Tinción: Drangendorff.



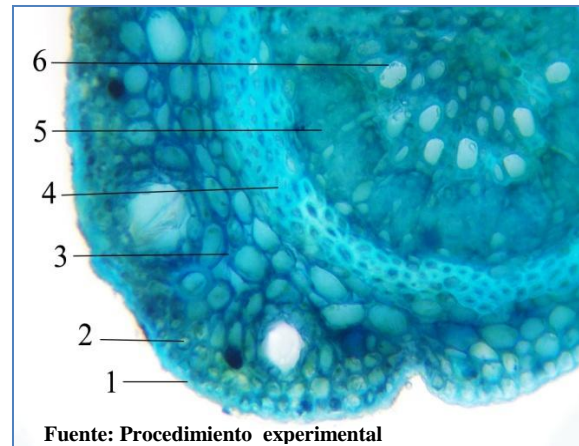
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 134. Pecíolo, alcaloides positivos en: Células esclerenquimáticas (1), Xilema (2). (Aumento 100x). Tinción: Drangendorff.



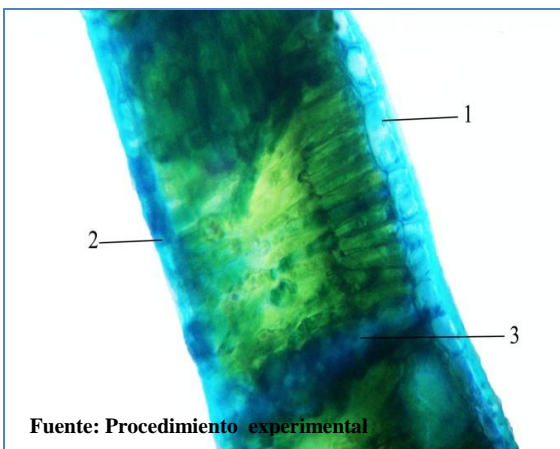
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 135. Folíolo, mucílagos positivos en la nervadura central. (Aumento 100x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



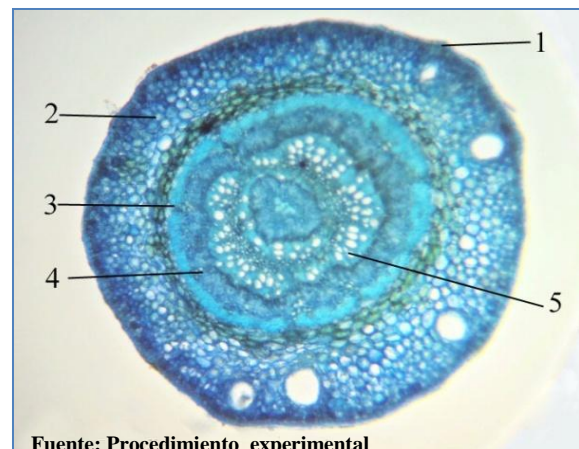
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 136. Folíolo, mucílagos positivos en: Epidermis (1), Colénquima (2), Parénquima (3), Esclerénquima (4), Floema (5), Xilema (6). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 137. Folíolo, mucílagos positivos en: Epidermis adaxial (1), Epidermis abaxial (2), Haces vasculares transcurrentes (3). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 138. Pecíolo, mucílagos positivos en: Epidermis (1), Colénquima (2), Esclerénquima (3), Floema (4), Xilema (5). (Aumento 100x). Tinción: Azul de cresilo 1%.

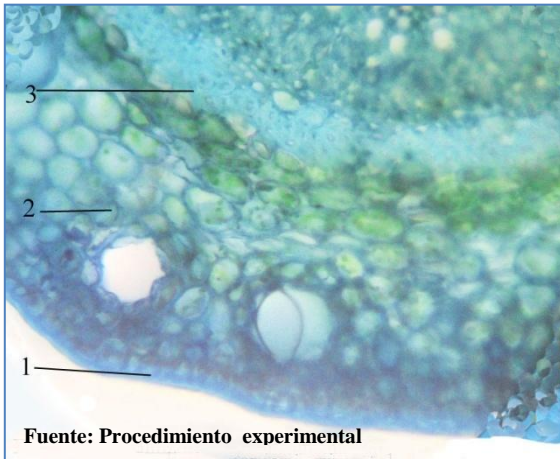


Figura 139. Peciólulo, mucílagos positivos en: Epidermis (1), Colénquima (2), Esclerénquima (3). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



Figura 140. Pecíolo, mucílagos positivos en: Epidermis (1), Colénquima (2), Xilema (3). (Aumento 100x). Tinción: Azul de cresilo 1%.

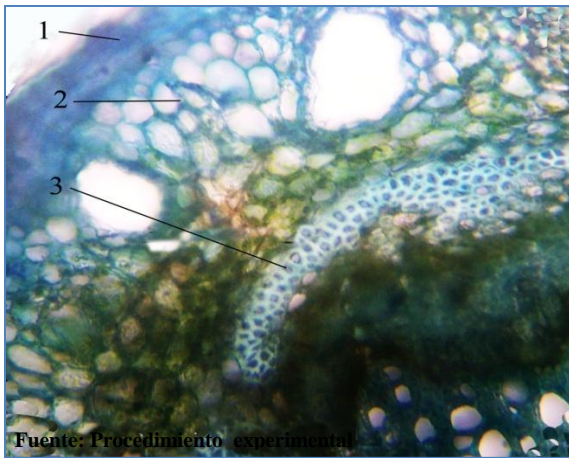


Figura 141. Pecíolo, mucílagos positivos en: Epidermis (1), Colénquima (2). Levemente positivos en esclerénquima (3). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.

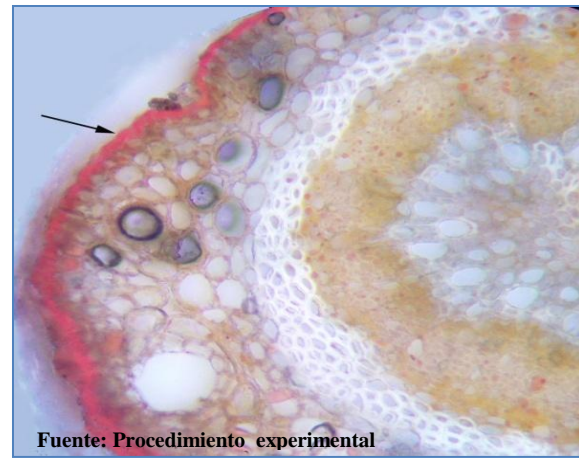


Figura 142. Foliolo, grasas y aceites positivo en epidermis de la nervadura central. (Aumento 400x). Tinción: Sudán IV.

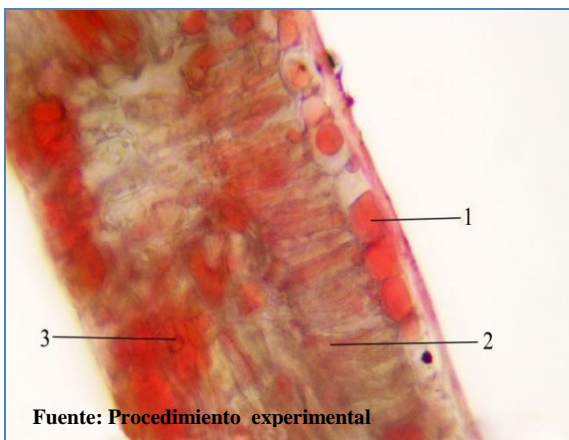


Figura 143. Foliolo, grasas y aceites positivos en: Epidermis adaxial (1), Parénquima empalizada (2), Parénquima esponjoso (3). (Aumento 400x). Tinción: Sudán IV.

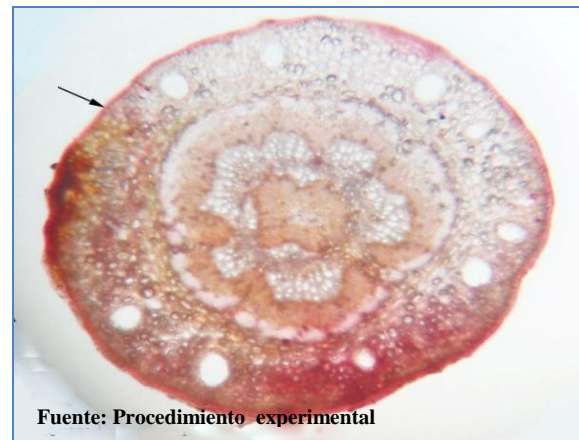
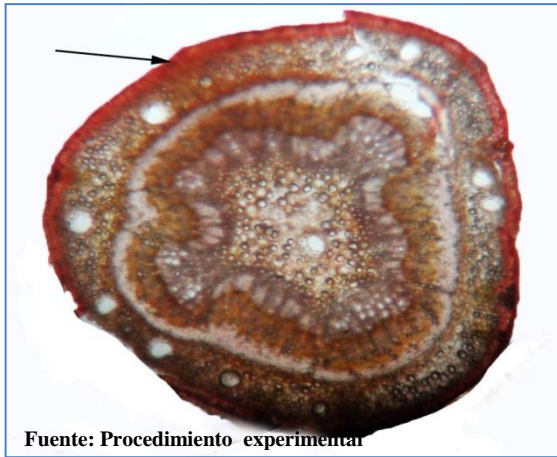
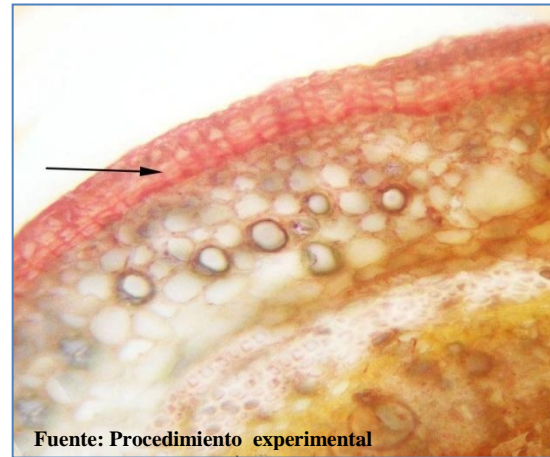


Figura 144. Peciólulo, grasas y aceites positivos en epidermis. (Aumento 100x). Tinción: Sudán IV.



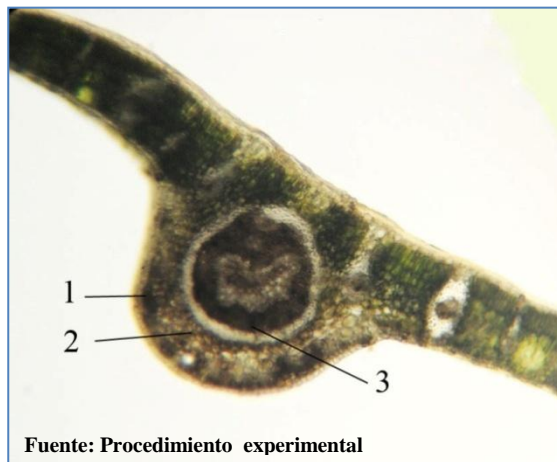
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 145. Pecíolo, grasas y aceites positivos en epidermis. (Aumento 100x). Tinción: Sudán IV.



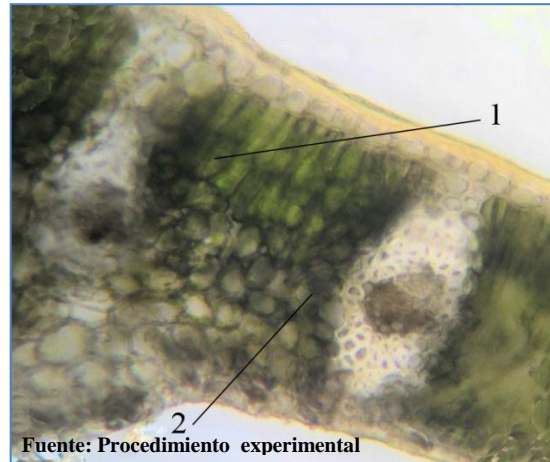
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 146. Pecíolo, grasas y aceites positivos en epidermis. (Aumento 400x). Tinción: Sudán IV.



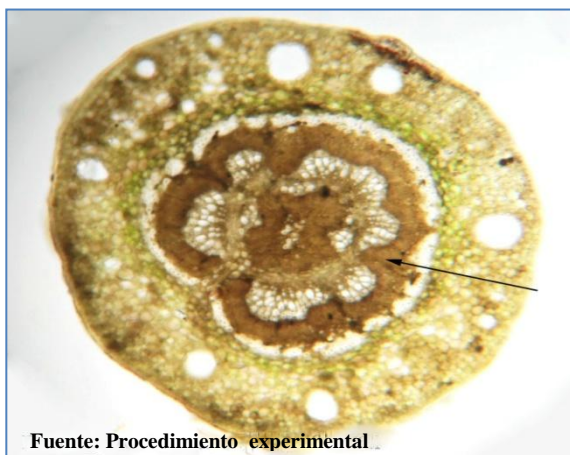
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 147. Folículo, taninos positivos en: Colénquima (1), Parénquima (2), Floema (3). (Aumento 100x). Tinción: Sulfato férrico.



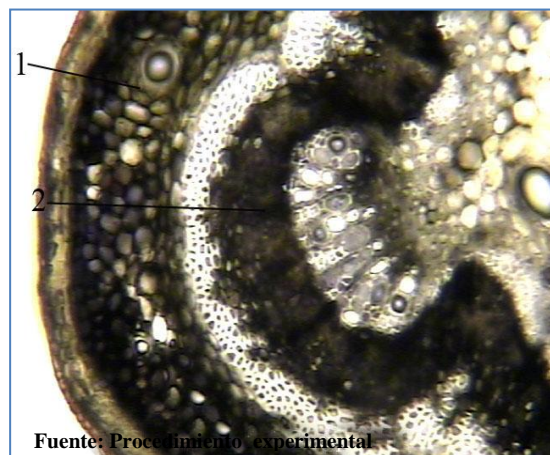
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 148. Folículo, taninos positivos en: Parénquima en empalizada (1), Parénquima esponjoso (2). (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



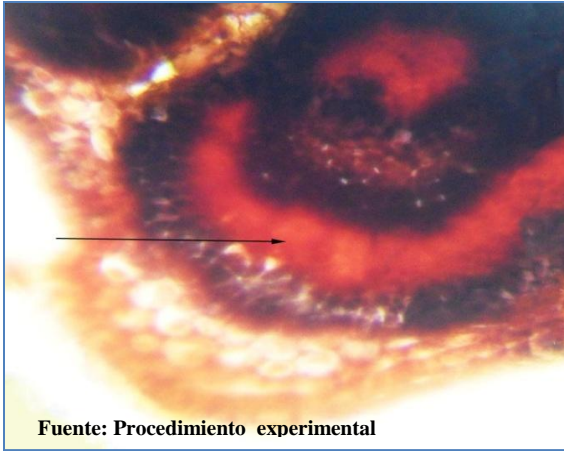
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 149. Pecíolulo, taninos levemente positivos en el floema. (Aumento 100x). Tinción: Sulfato férrico.



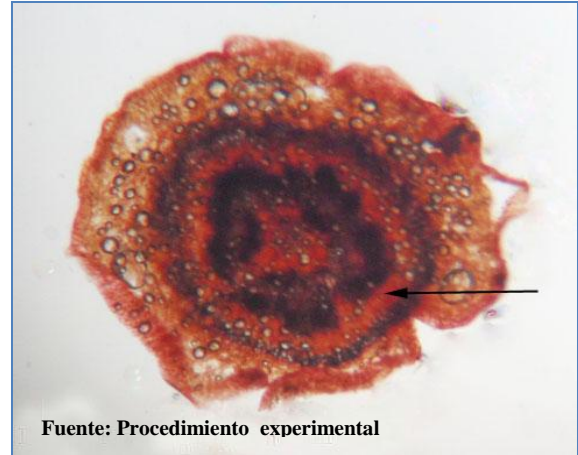
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 150. Pecíolo, taninos positivos en: Colénquima (1), Floema (2). (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



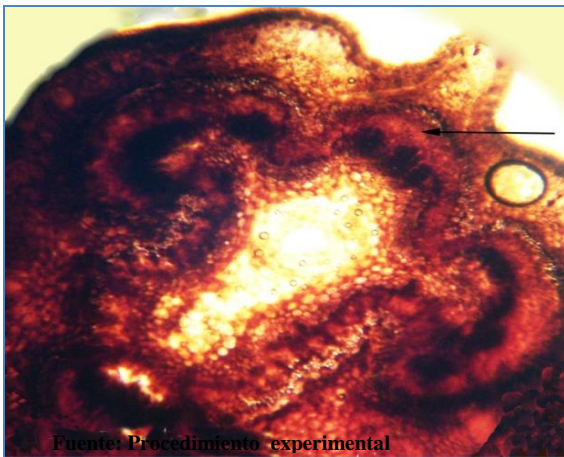
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 151. Foliolo, saponina positiva en el floema. (Aumento 400x). Tinción: H_2SO_4 concentrado.



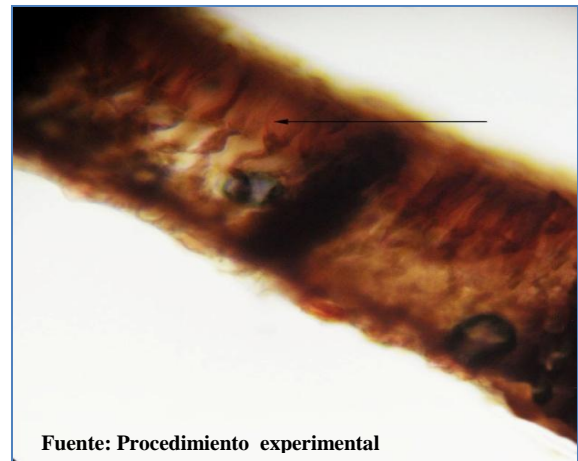
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 152. Pecíolo, saponina positiva en floema. (Aumento 400x). Tinción: H_2SO_4 concentrado.



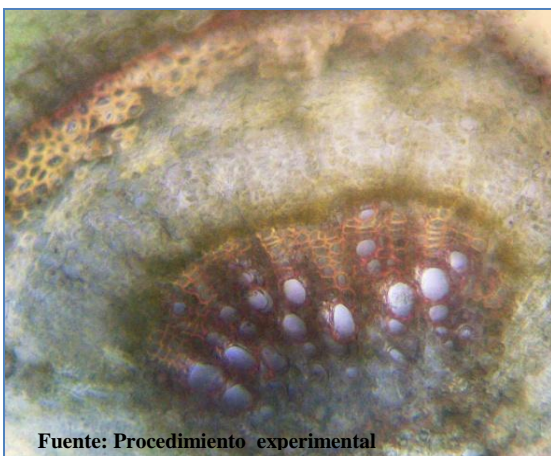
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 153. Pecíolo, saponina positiva en el floema. (Aumento 400x). Tinción: H_2SO_4 concentrado.



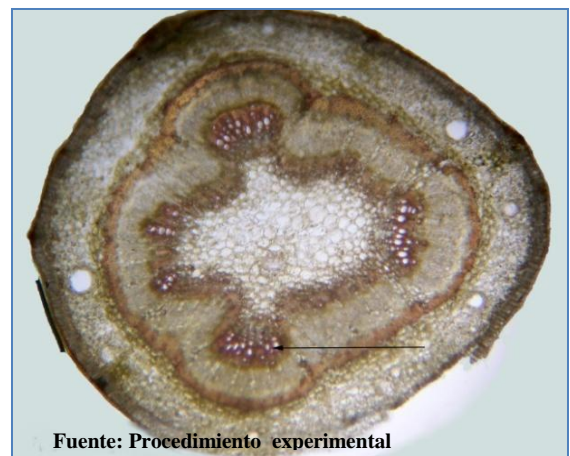
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 154. Foliolo, saponina levemente positiva en parénquima en empalizada. (Aumento 400x). Tinción: H_2SO_4 concentrado.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 155. Pecíolo, lignina positiva en haces del xilema. (Aumento 400x). Tinción: Floroglucina

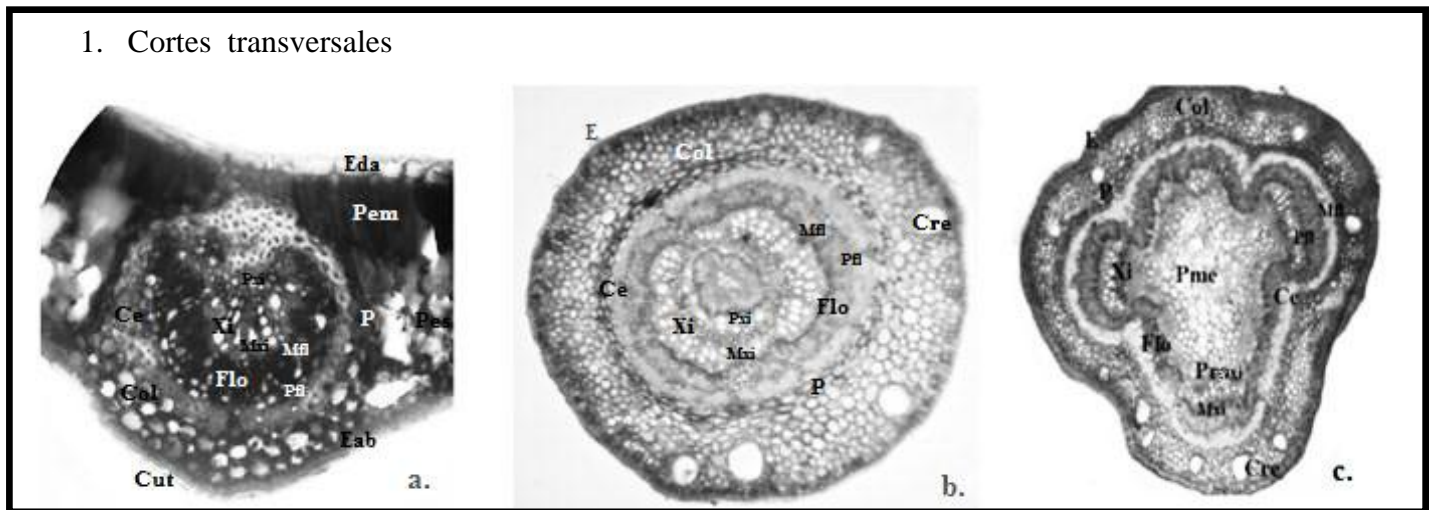


Fuente: Procedimiento experimental

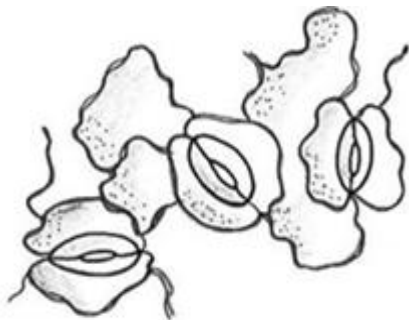
Figura 156. Pecíolo, lignina positiva en haces del xilema. (Aumento 400x). Tinción: Floroglucina

4. Cartilla micrográfica

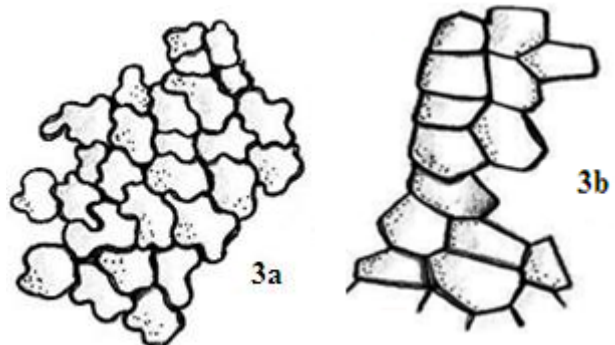
A continuación se presentan las figuras de las características distintivas de la droga vegetal de *H. courbaril*.



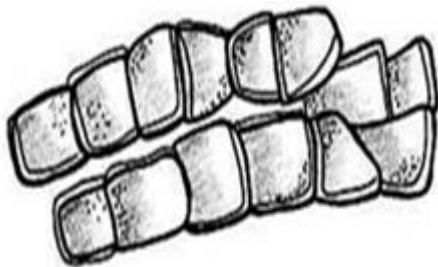
2. Epidermis con estomas diacíticos



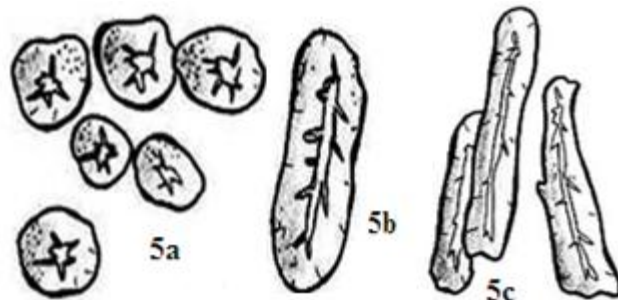
3. Epidermis



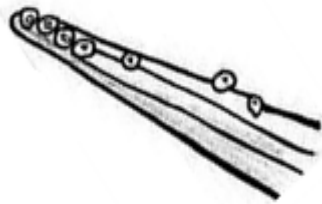
4. Células parenquimáticas



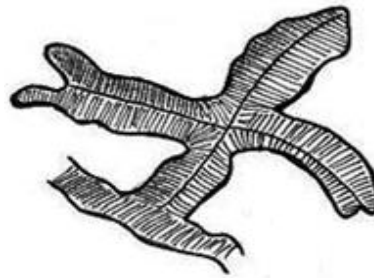
5. Células del esclerénquima



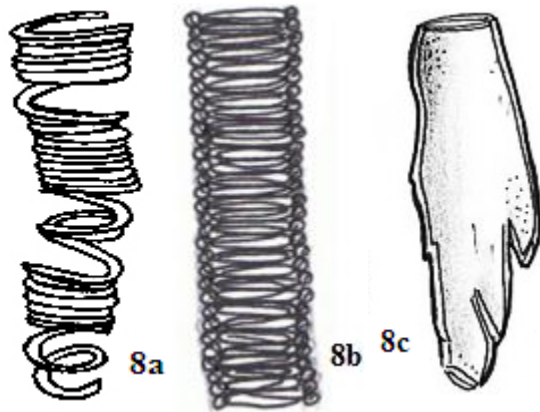
6. Fibra con cristales



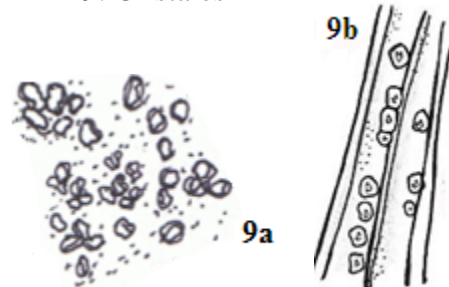
7. Traqueidas



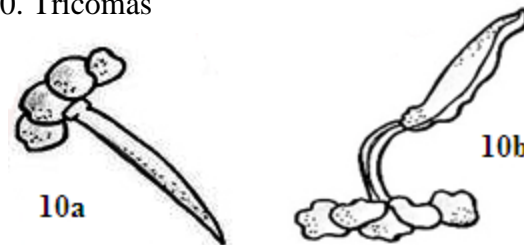
8. Elementos del xilema



9. Cristales



10. Tricomas



1. Cortes transversales. 1a, Folíolo. 1b, Pecíolulo. 2c, Pecíolo. Se observan los tejidos fundamentales y vasculares que lo conforman: Epidermis adaxial (Ead), epidermis abaxial (Eba), epidermis (E), cutícula (Cut), colénquima (Col), canales resiníferos (Cre), parénquima (P), parénquima en empalizada (Pem), parénquima esponjoso (Pes), células esclerenquimáticas (Ce), floema (Flo), protofloema (Pfl), metafloema (Mfl), xilema (Xi), metaxilema (Mxi), proxilema (Pxi).
2. Epidermis del folíolo con estomas diacíticos.
3. Epidermis. 3a, epidermis superior del folíolo, pecíolulo y pecíolo. 3b, hipodermis o células de corcho para pecíolulo y pecíolo.
4. Células parenquimáticas del pecíolulo y pecíolo.
5. Células del esclerénquima. 5a, braquiesclereidas en el pecíolulo y pecíolo. 5b, macroesclereidas en el folíolo, pecíolulo y pecíolo. 5c, fibroesclereidas para el folíolo.
6. Fibra del folíolo con incrustaciones de cristales solitarios de oxalato de calcio.
7. Traqueida helicada del folíolo.
8. Elementos del xilema. 8a, xilema del tipo helicoidal laxa para pecíolulo y pecíolo. 8b, xilema del tipo doble helicada para el folíolo, pecíolulo y pecíolo. 8c, placa perforada simple en el folíolo.
9. Cristales de oxalato de calcio. 9a, de tipo arenas. 9b, solitario sobre la nervadura central del folíolo.
10. Tricomas del folíolo. 10a, tector simple. 10b, glandular bicelular.

C. *P. lunatus*

1. Caracteres macroscópicos de identificación botánica: Las hojas son de tipo trifoliadas, folíolos ovados con ápice deltoide, base redondeada glabros o esparcidamente pubescentes, estípulas pequeñas lanceoladas, inflorescencia axilar o lateral en pseudoracimos cortos o alargados hasta 25 cm de largo; las flores con estandarte verde, alas y quillas blancas, lilas o púrpuras, de 1.5 cm de largo, cáliz campanulado de 2-3 mm de largo, estandarte ancho y plano. Con 2-4 semillas reniformes, comprimidas, de color negro, gris café o moteado. Las raíces fibrosas y tuberosas, los tallos glabros de 0.5-4 m de largo (Figura 157). Se preparó e identificó el ejemplar de herbario y se ingresó en el Herbario Biología de Guatemala (BIGU), Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC; con el número 52929 (Anexo 1, 2).



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 157. Ejemplar de herbario de *P. lunatus*.

2. Caracteres micromorfológicos e histológicos para identificación

a) Caracteres micromorfológicos: En el folíolo bifacial, peciólulo y pecíolo se observaron los tejidos vasculares y los fundamentales de sostén. El tejido vascular de estos se encuentra dispuesto centralmente. El haz vascular, conformado por el xilema y floema, es de tipo colateral cerrado para el folíolo; y perifloemático para el peciólulo y pecíolo ya que el floema se encuentra rodeando al xilema (Figura 158, 159, 160). Para las 3 partes en estudio por su localización el xilema es endarco (Figura 159, 160, 161, 162). En el folíolo se denotan 3 haces vasculares, en el peciólulo se observaron de 4-7 haces vasculares ocupando una posición central en forma de cilindro sin presentarse parénquima medular; a diferencia del pecíolo en el que se evidenciaron de 5-7 alrededor del parénquima medular (Figura 159, 160, 161). Los haces vasculares del pecíolo forman un anillo continuo semejante a una estela del tipo sifonostela-euestela (160).

En el tejido fundamental se observaron tejidos de colénquima anular, parénquima, esclerénquima con paredes lignificadas y parénquima medular con células de diversos tamaños pero de similar morfología; este último únicamente en el pecíolo presentándose en abundante cantidad (Figura 159, 160, 161, 163, 164). En el parénquima del peciólulo se observaron abundantes cristales estiloides alargados de oxalato de calcio (Figura 165). Por medio de un corte transversal del folíolo se diferenciaron los tejidos fundamentales de la lámina foliar, se identificó parénquima en empalizada y esponjoso; el último se encuentra hacia la epidermis abaxial con una distribución y aspecto irregular redondeado integrado por 3-4 capas separadas por espacios intercelulares. El parénquima en empalizada se encuentra conformado por 1-2 capas de células de contornos lisos con distribución a lo largo del folíolo dirigidas hacia la epidermis adaxial (Figura 166). En la nervadura central se observó una protuberancia desplazada hacia la epidermis adaxial formada por colénquima (Figura 161).

En el tejido epidérmico, la epidermis adaxial se observó más gruesa con cutícula evidente, mientras que la abaxial es irregular y cutícula no evidente; ambas son monoestratificadas (Figura 166). Para la epidermis del folíolo y pecíolo se observaron tricomas glandulares brevifurcados y uncinados de revestimiento (Figura 167, 168, 169, 170), además tricomas

glandulares secretores en el peciolo (Figura 171); en el peciólulo se evidenciaron tricomas unicelular lineales y protectores (Figura 172, 173). Del corte transversal de semilla se observó el embrión de la misma (Figura 174).

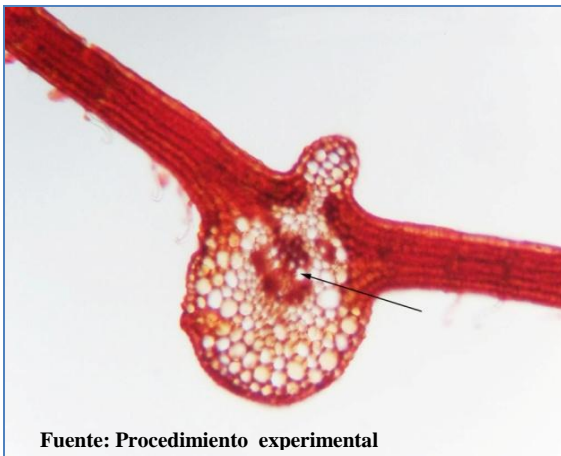


Figura 158. Foliolo, tejido vascular dispuesto centralmente. (Aumento 100x). Tinción: Safranina 1%.

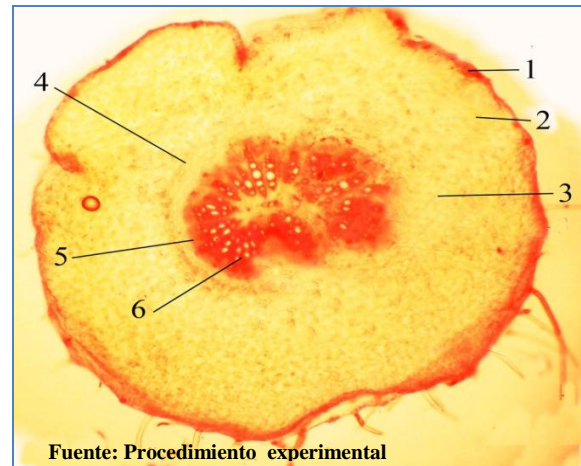


Figura 159. Peciólulo, tejido vascular y fundamental de sostén. Epidermis (1), Colénquima (2), Parénquima (3), Esclerenquima (4), Floema (5), Xilema (6). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

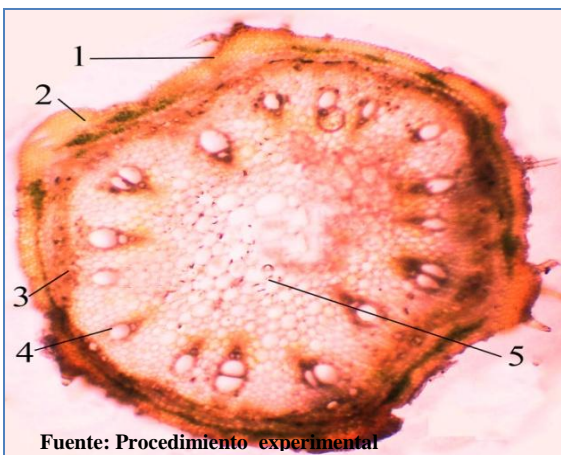


Figura 160. Peciolo, tejidos vasculares y fundamentales de sostén. Epidermis (1), Colénquima (2), Floema (3), Xilema (4), Parénquima medular (5). (Aumento 400x). Tinción: Safranina fast-green.

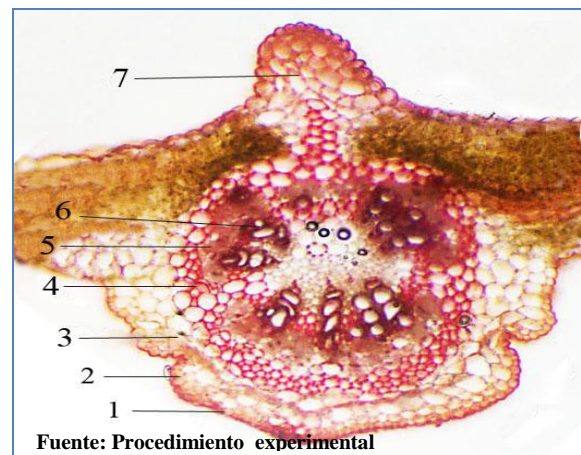
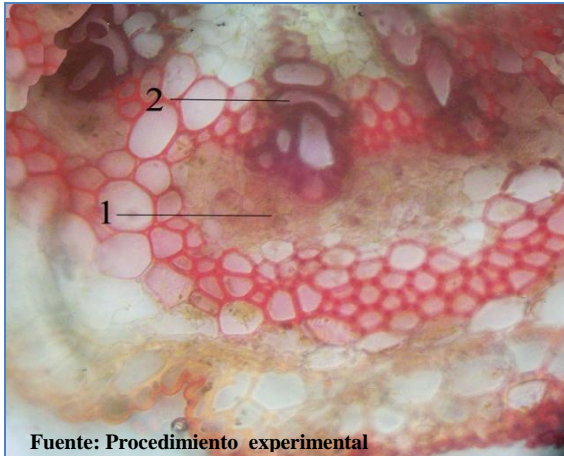
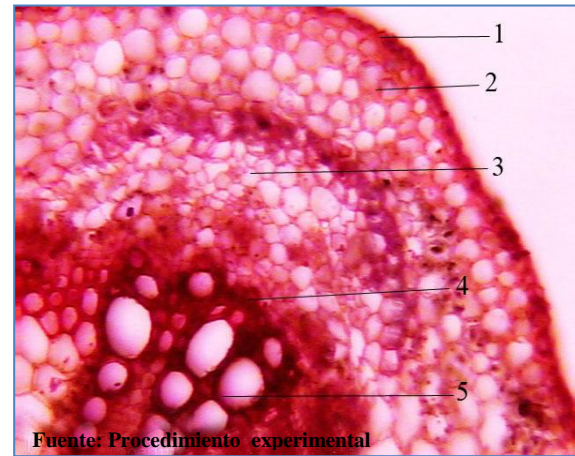


Figura 161. Foliolo, tejidos vasculares y fundamentales de sostén. Epidermis (1), Colénquima (2), Parénquima (3), Esclerenquima (4), Floema (5), Xilema (6), Colénquima (7). (Aumento 400x). Tinción: Safranina fast-green.



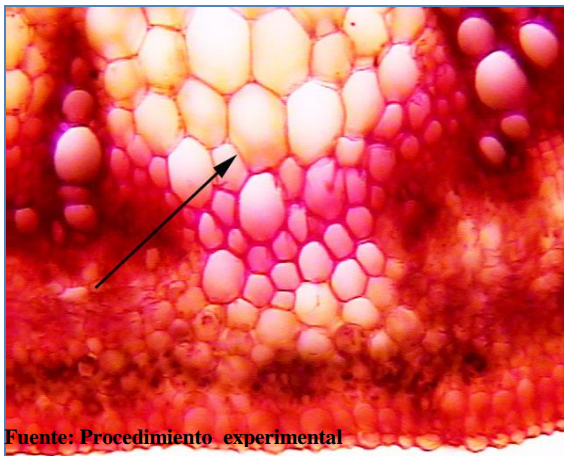
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 162. Foliolo, tejidos vasculares. Floema (1), Xilema (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina fast-green.



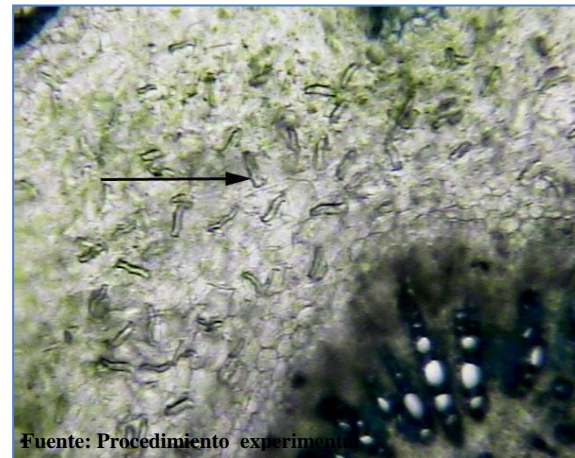
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 163. Peciolo, tejidos fundamentales y vasculares. Epidermis (1), Colénquima (2), Parénquima (3), Floema (4), Xilema (5). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



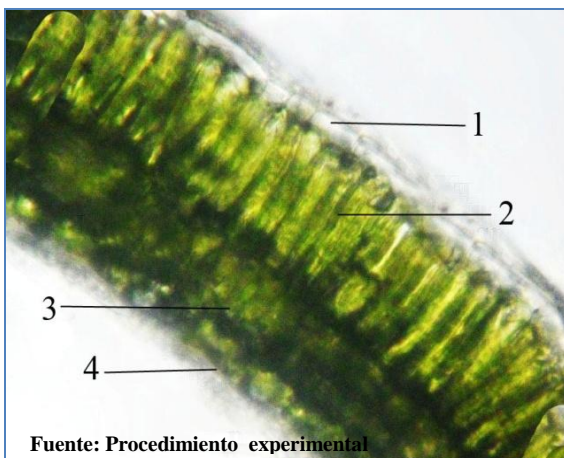
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 164. Peciolo, parénquima medular. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



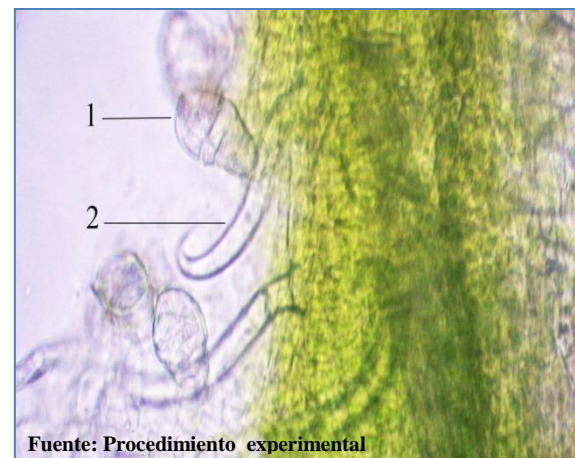
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 165. Peciólulo, cristales estiloides de oxalato de calcio en el parénquima. (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



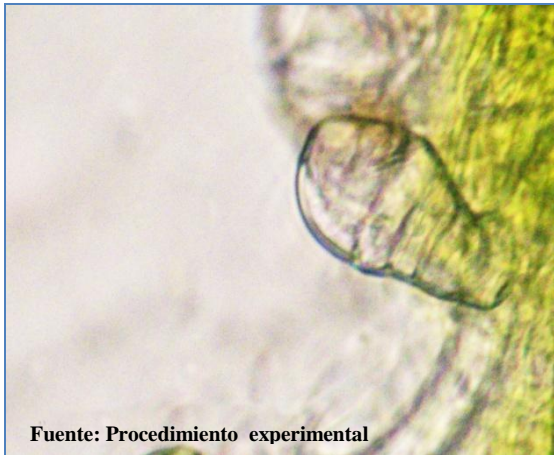
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 166. Foliolo, tejidos fundamentales de la lámina foliar. Cutícula de epidermis adaxial (1), Parénquima en empalizada (2), Parénquima esponjoso (3), Epidermis abaxial (4). (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



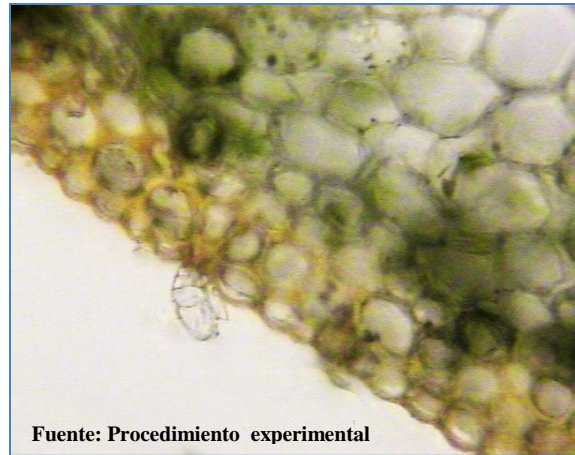
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 167. Foliolo. Tricomas glandulares brevifurcados (1), Uncinados de revestimiento (2). (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



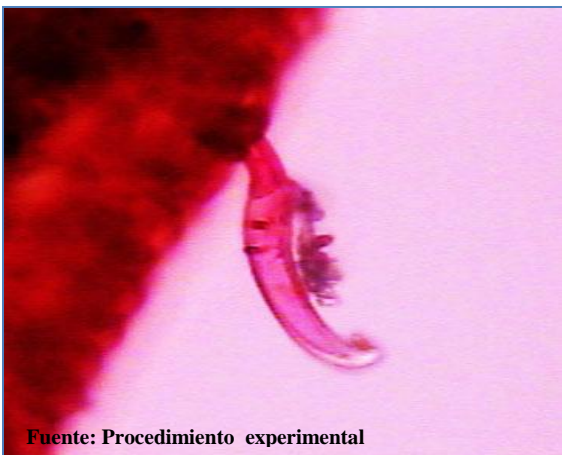
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 168. Foliolo, tricoma glandular brevifurcado. (Aumento 1000x). Tinción: Sulfato férrico.



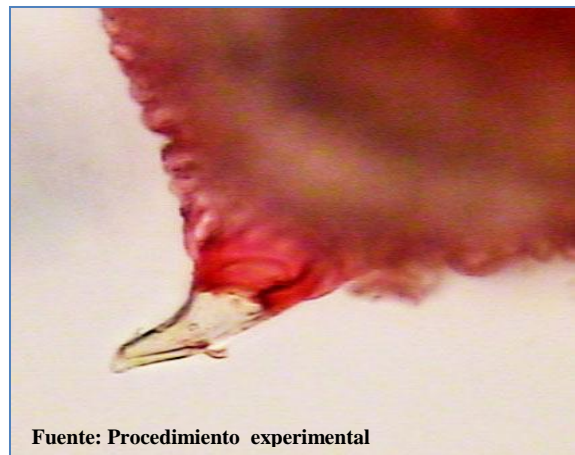
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 169. Pecíolo, tricoma glandular brevifurcado. (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 170. Pecíolo, tricoma uncinado de revestimiento. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 171. Pecíolo, tricoma glandular secretor. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 172. Pecíolulo, tricomas unicelulares lineales. (Aumento 400x). Tinción: Safranina al 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 173. Pecíolulo, tricoma protector. (Aumento 400x). Tinción: Safranina al 1%.



Figura 174. Semilla, embrión. (Aumento 400x).
Tinción: Safranina 1%.

b) Diafanizado del folíolo: Presenta ápice deltoide con abundantes tricomas unicelulares lineales (Figura 175). Se visualizaron elementos traqueales con puntuación en forma de hélice a lo largo del folíolo (Figura 176, 177). La nervación es abierta y reticulada, el término de la venación es de tipo anastomosada; presenta margen entero (Figura 178). Se observó la vascularización foliar (Figura 175). Así mismo, se observó la venación en la nervadura central (Figura 179). En la epidermis abaxial se observaron células de bordes irregulares y aparatos estomáticos conformados por estomas paracíticos, sin presencia de cloroplastos en sus células oclusivas; estas últimas se encuentran acompañadas a cada lado por una o más células subsidiarias cuyos ejes longitudinales son paralelos a los de las células estomáticas y a la apertura del estoma. Por debajo de la epidermis adaxial se visualizó el tejido parenquimático denominado clorénquima conformado por células de forma redonda de diversos tamaños (Figura 180, 181, 182). Se observaron bases de tricomas unicelulares lineales conformadas por 6 células y glandulares brevifurcados por 10 células con disposición radial respecto al tricoma (Figura 182, 183). Además, se visualizaron tricomas unicelulares lineales y glandulares brevifurcados sobre la nervadura central (Figura 184); inmersos en la misma se presentaron abundantes cristales solitarios rectangulares y romboidales de oxalato de calcio (Figura 185).

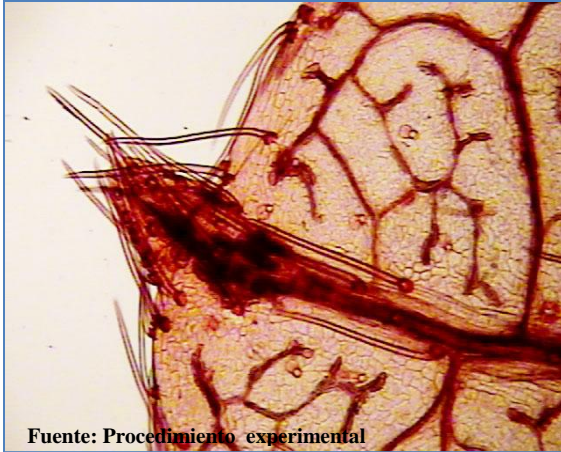


Figura 175. Folíolo, ápice deltoide con abundantes tricomas unicelulares lineales y vascularización foliar. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Figura 176. Folíolo, traqueida con puntuación en forma de hélice. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Figura 177. Folíolo, traqueidas con puntuación en forma de hélice. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Figura 178. Folíolo, nervación abierta y reticulada, término de venación anastomosada, margen entero. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

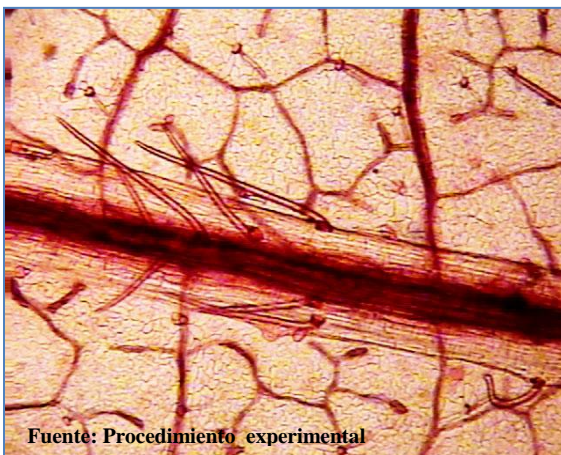


Figura 179. Folíolo, venación de la nervadura central. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Figura 180. Folíolo, epidermis abaxial con estomas paracíticos y sus células subsidiarias. (Aumento 1000x). Tinción: Safranina 1%.

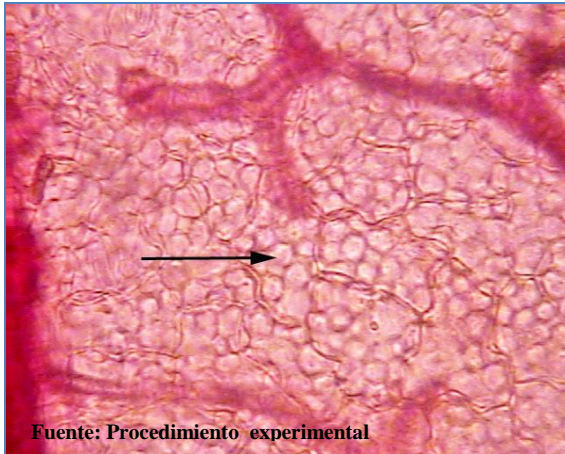


Figura 181. Foliolo, epidermis adaxial obsérvese tejido del clorénquima. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

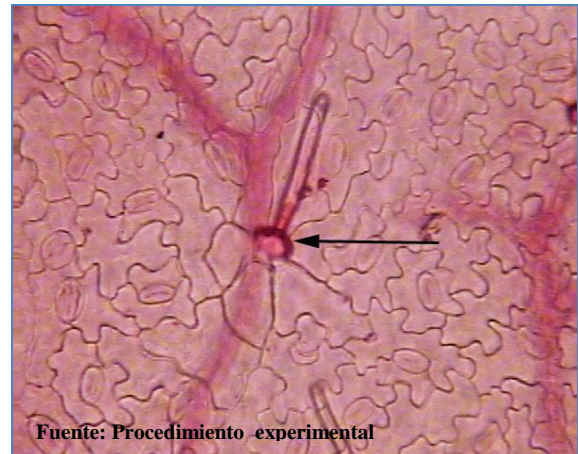


Figura 182. Foliolo, base de seis células del tricoma unicelular lineal y estomas paracíticos. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Figura 183. Foliolo, base de tricoma glandular brevifurcado. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Figura 184. Foliolo, tricomas unicelulares lineales y glandulares brevifurcados sobre la nervadura central. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Figura 185. Foliolo, cristales solitarios de oxalato de calcio en la nervadura central. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

c) Disociado del folíolo, peciólulo, pecíolo y semilla: Las estructuras encontradas en el disociado del peciólulo y pecíolo fueron las mismas, por lo tanto se muestra una figura para ambos. En el folíolo, peciólulo y pecíolo se observaron células grandes, irregulares y poligonales de la epidermis superior muy unidas entre sí (Figura 186, 187); en el folíolo se presentaron células de la hipodermis o de corcho (Figura 188).

Se visualizaron células esclerenquimáticas con paredes engrosadas de forma variada, en el folíolo, peciólulo y pecíolo se encontraron braquiesclereidas como células cortas de forma isodiamétrica y macrosclereidas alargadas y puntiagudas de forma prismática (Figura 189, 190, 191, 192, 193). Para el folíolo se evidenciaron fibrotraqueidas (Figura 194), en el peciólulo, pecíolo y semilla se observaron fibroesclereidas de forma isodiamétrica alargadas y puntiagudas (Figura 195, 196). Se hallaron en las semillas otros tipos de fibras alargadas con extremos ahusados y paredes secundarias (Figura 197).

En el folíolo, peciólulo, pecíolo y semilla se presentaron células del tejido parenquimático las cuales son de forma irregular unidas entre sí por medio de sus extremos formando cadenas (Figura 198, 199, 200, 201). Se encontraron elementos del xilema del tipo helicoidal, para el folíolo, peciólulo y pecíolo helicada laxa; además para el folíolo doble helicada mientras que en el peciólulo y pecíolo xilema anular (Figura 202, 203). Para el folíolo se visualizaron los vasos del xilema perforados con puntuaciones escalariformes (Figura 204), y una porción de los tubos xilemáticos: la placa perforada simple (Figura 205). Se observaron estructuras vasculares en el peciólulo y pecíolo, los vasos del floema (Figura 206). El folíolo presentó abundantes cristales de oxalato de calcio del tipo estiloides y arenas. Se observaron en gran cantidad, en el peciólulo y pecíolo, cristales estiloides alargados de oxalato de calcio. También se encontraron cristales solitarios rectangulares y romboidales de oxalato de calcio en el folíolo, peciólulo, pecíolo y semilla (Figura 201, 207, 208, 209). En el folíolo se observaron gránulos de almidón (Figura 199).

Los tricomas glandulares brevifurcados se observaron en el folíolo, peciólulo y pecíolo con bases de 10 células en disposición radial (Figura 210, 211, 212). Se visualizaron tricomas unicelulares lineales, en el peciólulo y pecíolo con bases de 7 células en disposición radial (Figura 212, 213); además en el folíolo se observaron los mismos con cristales arenosos de

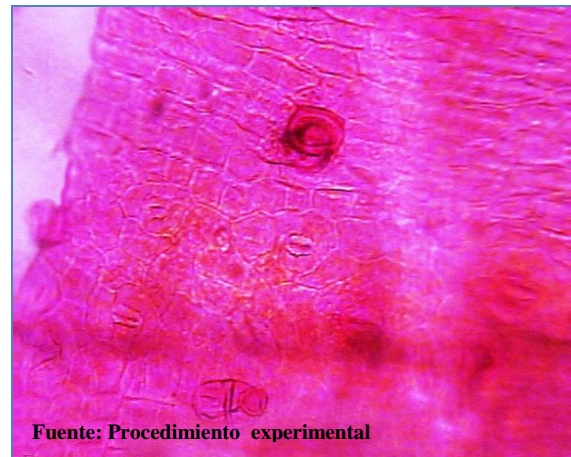
oxalato de calcio incrustados en el interior y con gránulos de reserva en el extremo de su base (Figura 214, 215). Sobre el cilindro vascular del peciólulo y pecíolo se encontraron abundantes bases de tricomas (Figura 216). En la semilla se hallaron tricomas uncínados de revestimiento (Figura 217).

Se observaron plástidos redondeados por una doble membrana, en el folíolo con pigmentos carotenoides posiblemente de carotina denominados cromoplastos del tipo globuloso (Figura 218); en la semilla se evidenciaron sin pigmentos denominados leucoplastos del tipo amiloplasto en forma ovalada (Figura 219).



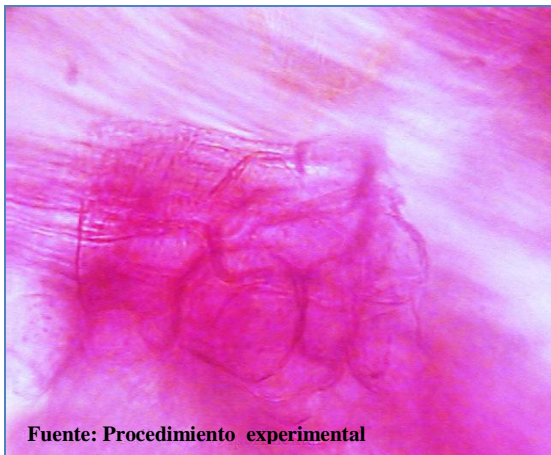
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 186. Folíolo, células de la epidermis superior. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 187. Pecíolo, células de la epidermis superior. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



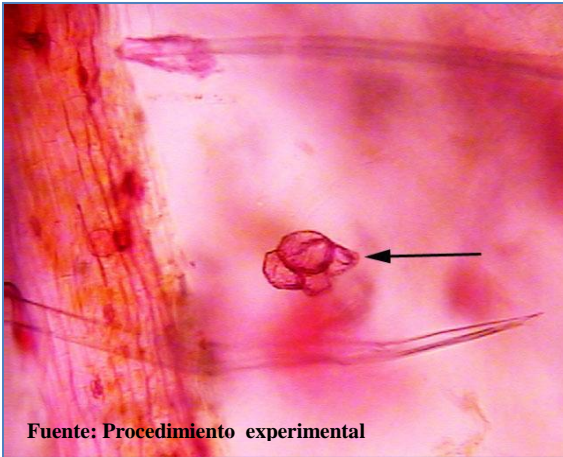
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 188. Folíolo, células de la hipodermis o de corcho. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 189. Folíolo, braquiesclereidas. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 190. Pecíolo, braquiesclereidas. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 191. Folíolo, macrosclereida. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



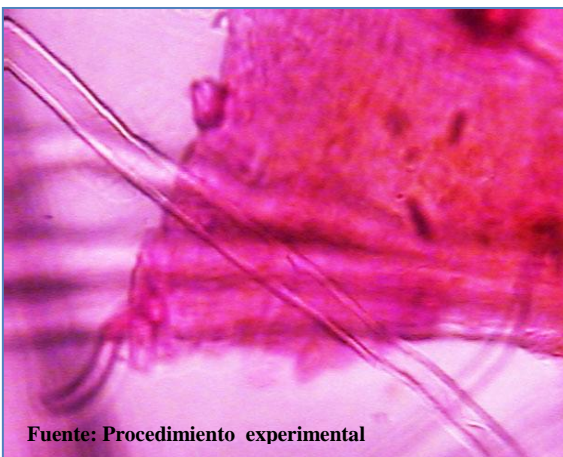
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 192. Pecíolo, macrosclereidas. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 193. Pecíolo, macrosclereida. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 194. Folíolo, fibrotraqueidas. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 195. Pecíolo, fibrosclereida. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



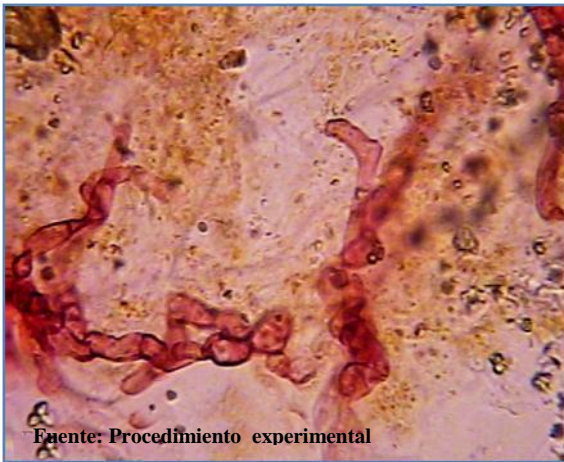
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 196. Semilla, fibroesclerida. (Aumento 400x).
Tinción: Safranina 1%.



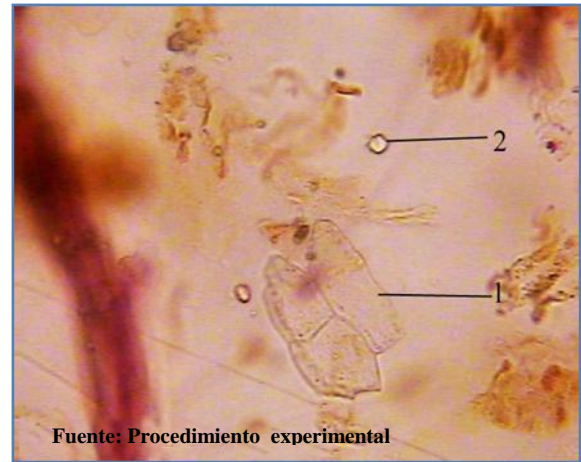
Fuente: Procedimiento experimental

**Figura 197. Semilla, fibra alargada con extremos
ahusados y paredes secundarias.** (Aumento 400x).
Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 198. Folíolo, células de tejido parenquimático.
(Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



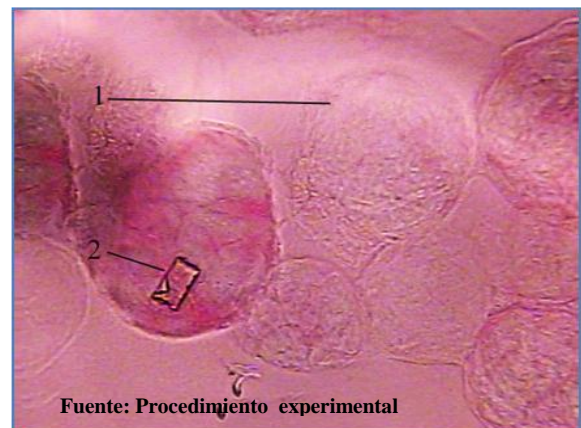
Fuente: Procedimiento experimental

**Figura 199. Folíolo. Células del tejido
parenquimático (1), Gránulos de almidón (2).**
(Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



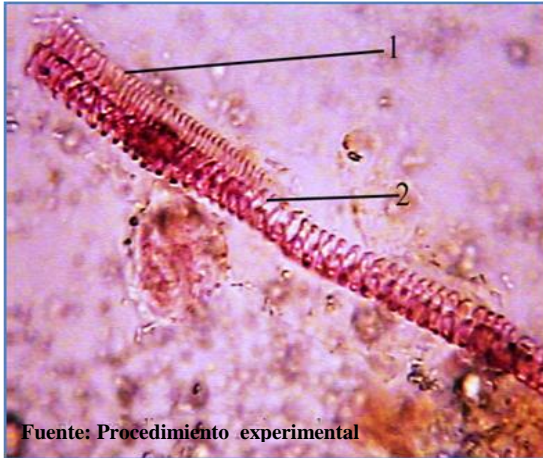
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 200. Pecíolo, células del tejido parenquimático.
(Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



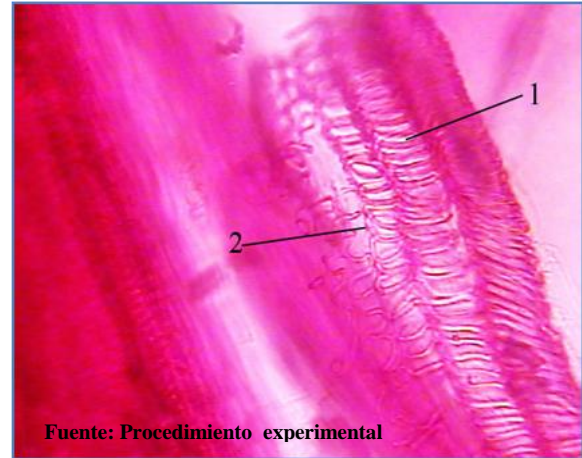
Fuente: Procedimiento experimental

**Figura 201. Semilla. Células del tejido parenquimático
(1), Cristal solitarios de oxalato de calcio (2).** (Aumento
400x). Tinción: Safranina 1%.



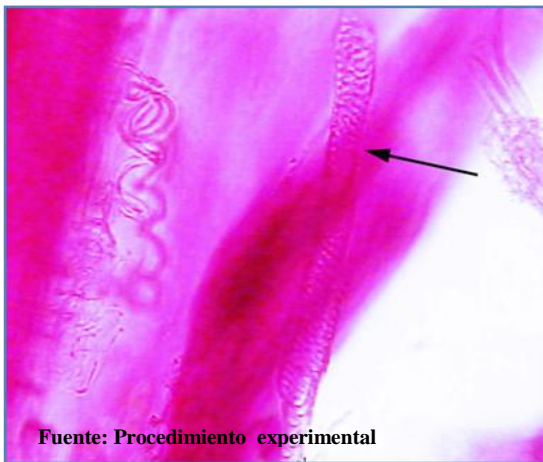
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 202. Foliolo. Xilema helicoidal laxa (1), Xilema helicoidal doble helicada (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 203. Pecíolo. Xilema helicoidal laxa (1), Xilema anular (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 204. Foliolo, elementos de los vasos del xilema perforados con puntuaciones escalariformes. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



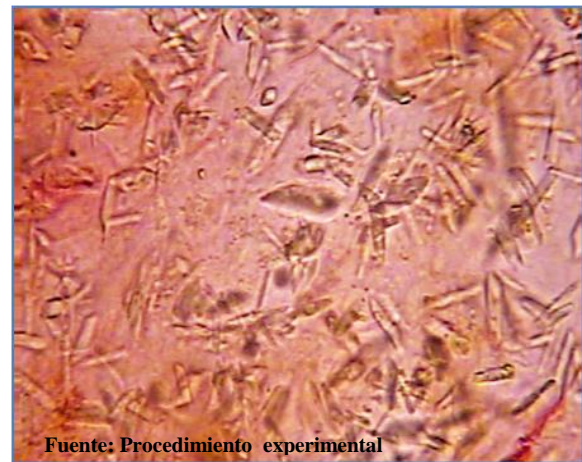
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 205. Foliolo, placa perforada simple. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 206. Pecíolo, vasos del floema. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 207. Foliolo, cristales estiloides, solitarios y arenas de oxalato de calcio. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 208. Pecíolo, cristales estiloides de oxalato de calcio. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



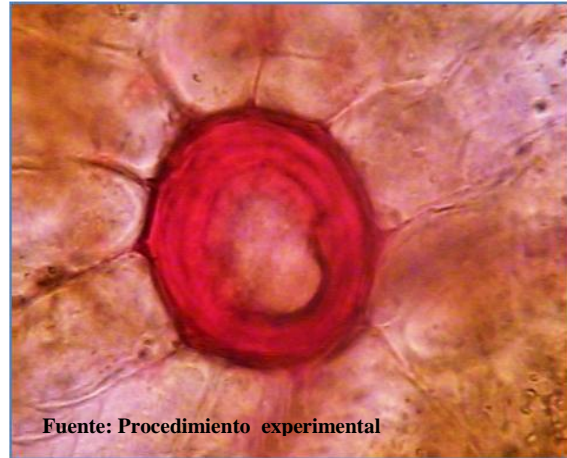
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 209. Pecíolo, cristales solitarios rectangulares y romboidales de oxalato de calcio. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



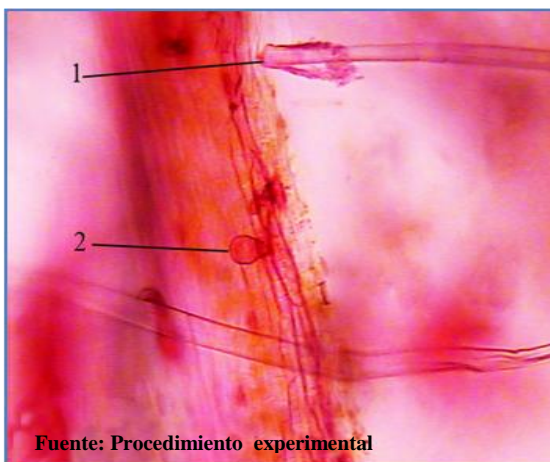
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 210. Folíolo, tricomas glandulares brevifurcados. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 211. Folíolo, base de tricoma glandular brevifurcado. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 212. Pecíolo. Tricoma unicelular lineal (1), Tricoma glandular brevifurcado (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



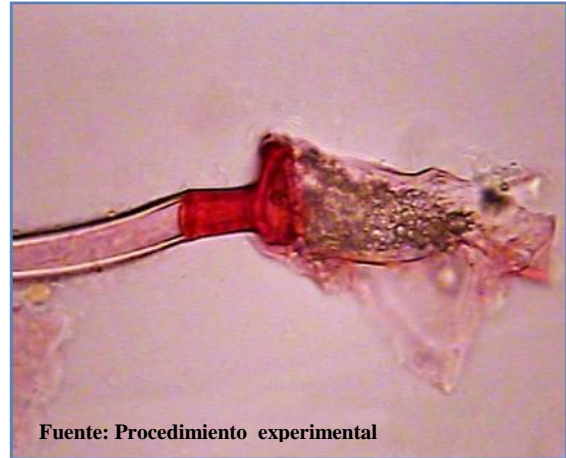
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 213. Pecíolo, tricoma unicelular lineal con una base de 7 células. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



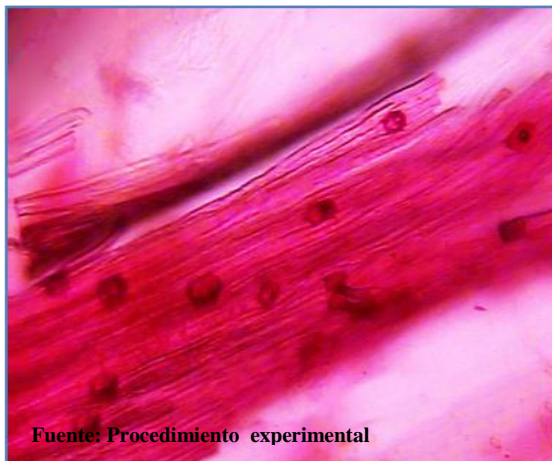
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 214. Foliolo, tricoma unicelular lineal con cristales arenosos de oxalato de calcio en su interior. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 215. Foliolo, tricoma unicelular lineal con gránulos de reserva en el extremo de su base. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 216. Pecíolo, abundantes bases de tricomas sobre cilindro vascular. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



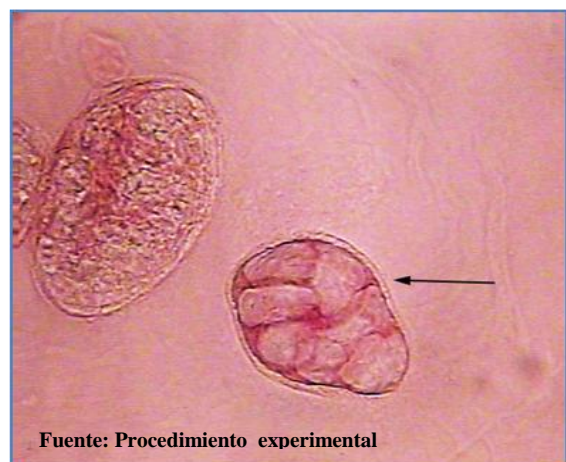
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 217. Semilla, tricoma uncinado de revestimiento. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 218. Foliolo, cromoplasto del tipo globuloso. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 219. Semilla, amiloplastos ovalados. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

3. Tamizaje histoquímico del folíolo, peciólulo y pecíolo

a) Alcaloides: La reacción fue positiva en la epidermis, colénquima, parénquima en empalizada y esponjoso del corte transversal del folíolo. En el peciólulo resultó positiva para el xilema, mientras que en el pecíolo es positiva para el esclerénquima y levemente positiva en la epidermis y en el colénquima (Figura 220, 221, 222, 223, 224).

b) Mucílagos: Se evidenció reacción positiva en los tricomas unicelulares lineales de revestimiento ubicados en el término de la lámina foliar y sobre la epidermis del peciólulo; en los tricomas de aspecto glanduloso de la nervadura central del folíolo y en los tricomas glandulares bicelulares de revestimiento del pecíolo (Figura 225, 226, 227, 228). Fue positiva en la epidermis de la nervadura central, en la adaxial, abaxial de la lámina foliar; y en la epidermis del peciólulo y pecíolo (Figura 226, 227, 229, 230). Así, mismo para las 3 partes en estudio fue positiva en el xilema. En el folíolo y pecíolo resultó positiva en el floema. En el colénquima fue levemente positiva para el folíolo y positiva en el peciólulo y pecíolo. Únicamente las células esclerenquimáticas del pecíolo mostraron reacción positiva (Figura 226, 227, 230, 231, 232, 233).

c) Grasas y aceites: Se encontraron en el folíolo levemente positivas en la epidermis de la nervadura central, en la adaxial, abaxial de la lámina foliar y en los tricomas unicelulares lineales de revestimiento (Figura 234, 235). En el peciólulo positivas en la epidermis y el colénquima (Figura 236); a diferencia del pecíolo que fueron levemente positivas en la epidermis y el xilema (Figura 237).

d) Taninos: Se observó reacción positiva en la epidermis y xilema de la nervadura central, en el parénquima en empalizada y esponjoso de la lámina foliar (Figura 238, 239). Para el peciólulo y pecíolo se evidenció positiva en la epidermis, floema y xilema (Figura 240, 241, 242).

e) Saponinas: Resultó positiva para las 3 partes en estudio, pero no se logró evidenciar la morfología específica por medio de una figura debido a que se destruyó el material vegetal al reaccionar con el ácido sulfúrico concentrado (Figura 243, 244).

f) Lignina: Para el peciólulo y pecíolo la reacción fue positiva en el xilema y sus haces (Figura 245, 246).

g) Aleuronas: Se realizó únicamente en la semilla, observándose estas como estructuras cristalinas y amorfas de coloración amarillo-naranja (Figura 247).

En el inciso E se muestra la comparación de las pruebas histoquímicas y las determinaciones cualitativas en tubo de ensayo - pruebas presuntivas / Ensayos de cianidina y leucoantocianina- que apoyan la confirmación de la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios y algunos constituyentes inertes.

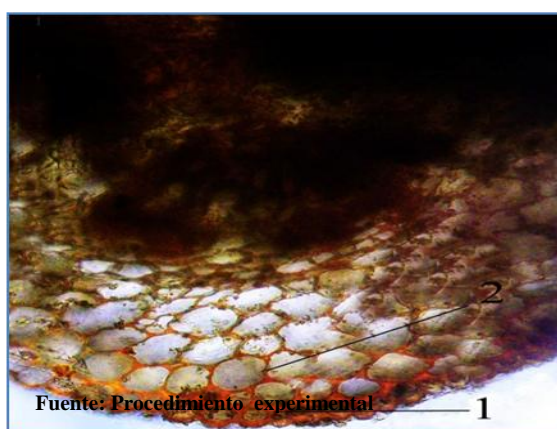


Figura 220. Foliolo, alcaloides positivos en: Epidermis (1), Colénquima (2). (Aumento 400x). Tinción: Drangendorff.

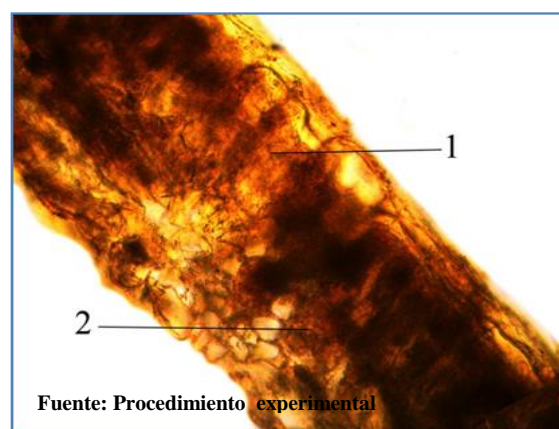


Figura 221. Foliolo, alcaloides positivos en: Parénquima empalizada (1), Parénquima esponjoso (2). (Aumento 400x). Tinción: Drangendorff.

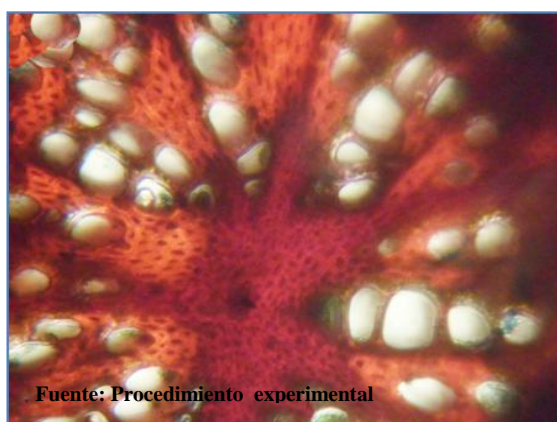


Figura 222. Peciólulo, alcaloides positivos en el xilema. (Aumento 400x). Tinción: Drangendorff.

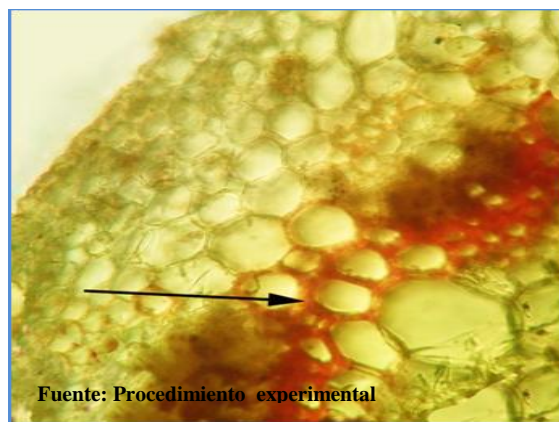
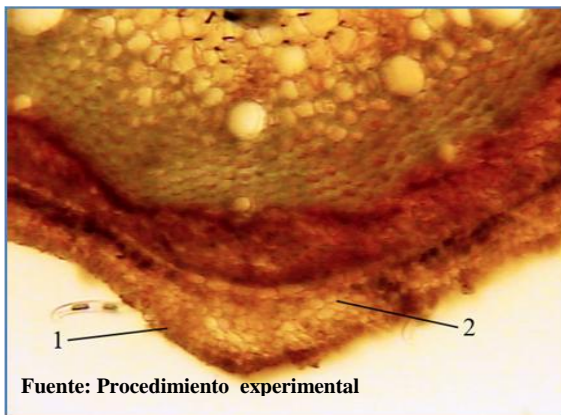
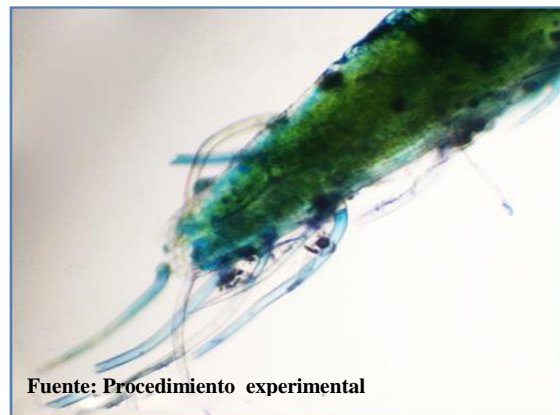


Figura 223. Peciolo, alcaloides positivos en células de esclerenquima. (Aumento 400x). Tinción: Drangendorff.



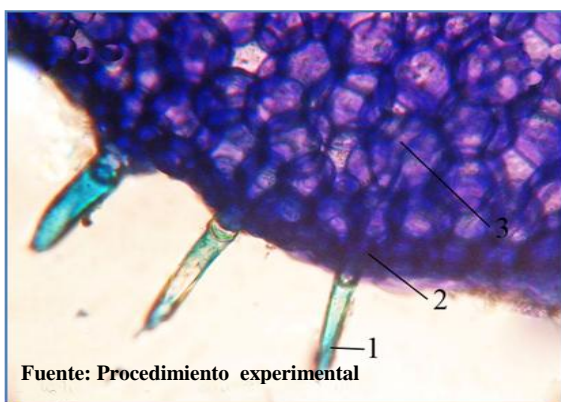
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 224. Pecíolo, alcaloides levemente positivos en: Epidermis (1), Colénquima (2). (Aumento 400x).
Tinción: Drangendorff.



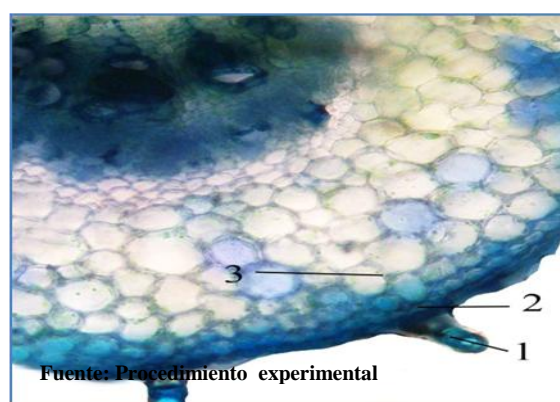
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 225. Folíolo, mucílagos positivos en tricomas unicelulares lineales de revestimiento. (Aumento 400x).
Tinción: Azul de cresilo 1%.



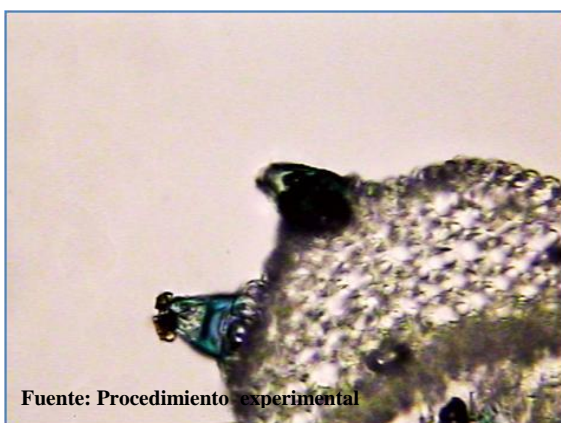
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 226. Pecíolulo, mucílagos positivo en: Tricomas unicelulares lineales (1), Epidermis (2), Colénquima (3). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



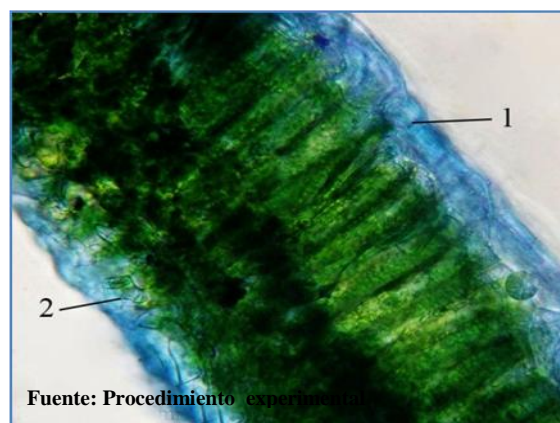
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 227. Folíolo, mucílagos positivos en: Tricomas de aspecto glanduloso (1), Epidermis (2). Levemente positivos en el Colénquima (3). (Aumento 400x).
Tinción: Azul de cresilo 1%.



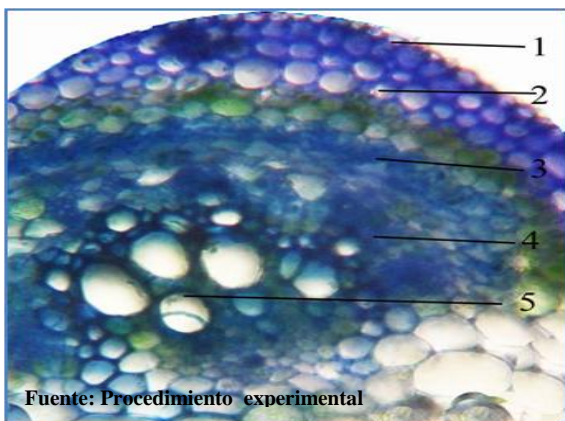
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 228. Pecíolo, mucílagos positivos en tricomas glandulares bicelulares. (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



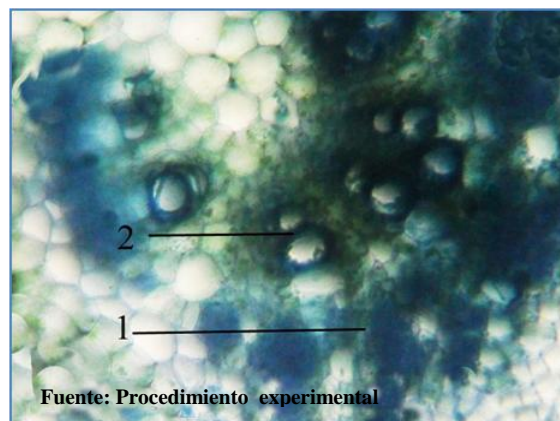
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 229. Folíolo, mucílagos positivo en: Epidermis adaxial (1), Epidermis abaxial (2). (Aumento 400x).
Tinción: Azul de cresilo 1%.



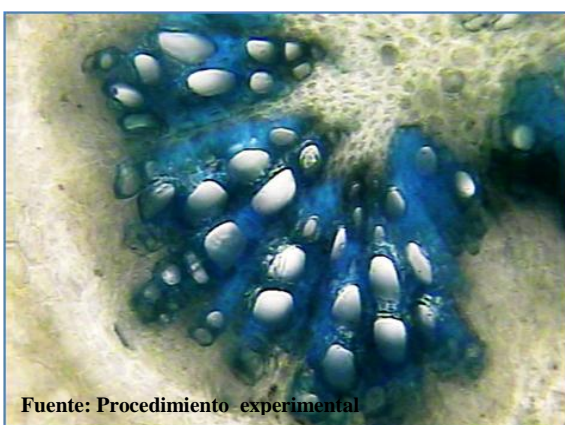
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 230. Pecíolo, mucílagos positivos en: Epidermis (1), Colénquima (2), Esclerénquima (3), Floema (4), Xilema (5). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



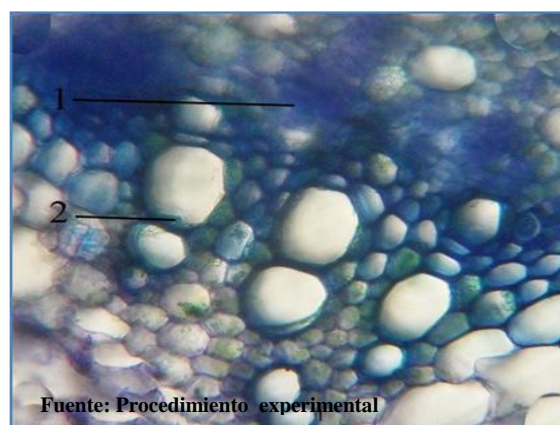
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 231. Folíolo, mucílagos positivo en: Floema (1), Xilema (2). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



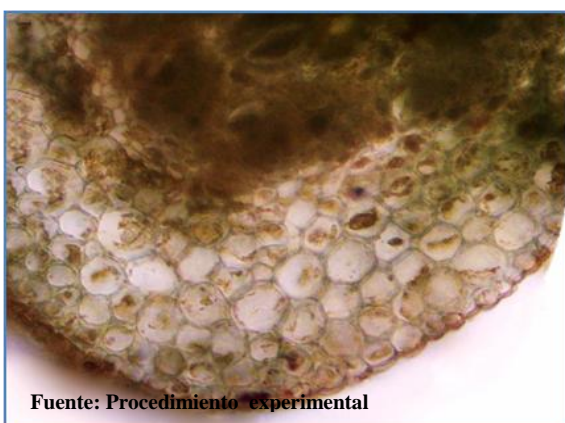
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 232. Pecíolo, mucílagos positivos en el xilema. (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



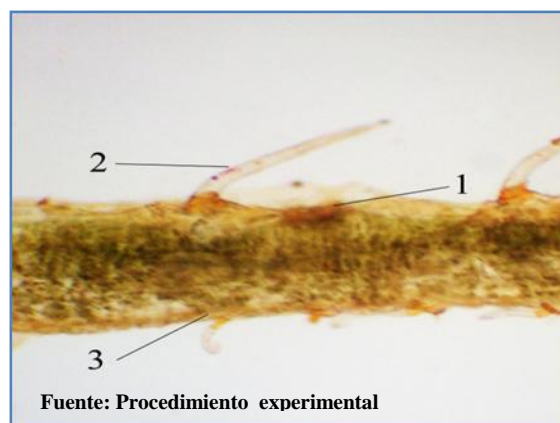
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 233. Pecíolo, mucílagos positivos en: Floema (1), Xilema (2). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



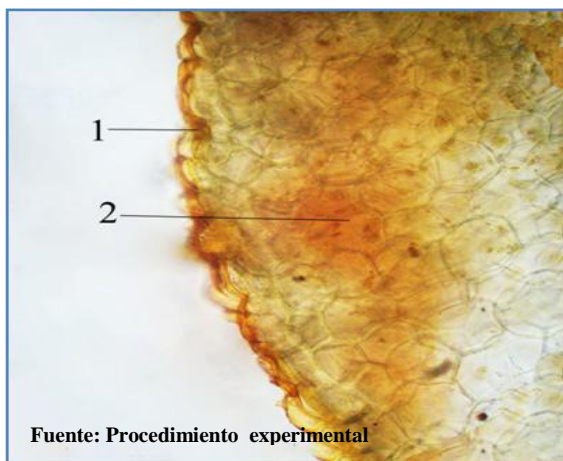
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 234. Folíolo, grasas y aceites levemente positivos en epidermis de nervadura central. (Aumento 400x). Tinción: Sudán IV.



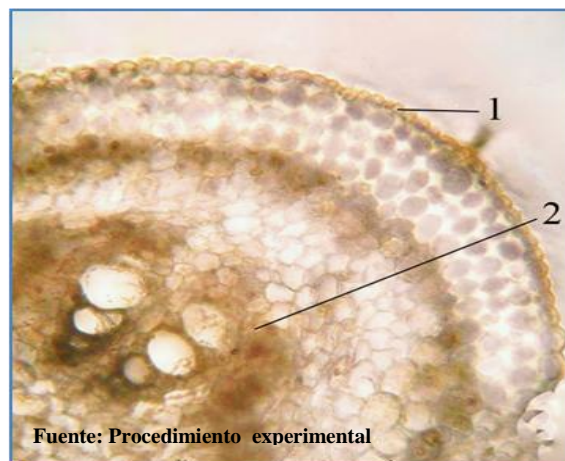
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 235. Folíolo, grasas y aceites levemente positivos en: Epidermis adaxial (1), Tricomas unicelulares lineales (2), Epidermis abaxial (3). (Aumento 400x). Tinción: Sudán IV.



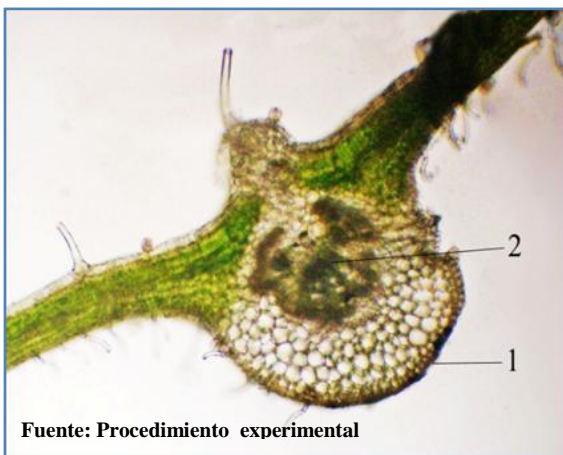
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 236. Pecíolo, grasas y aceites positivos en: Epidermis (1), Colénquima (2). (Aumento 400x). Tinción: Sudán IV.



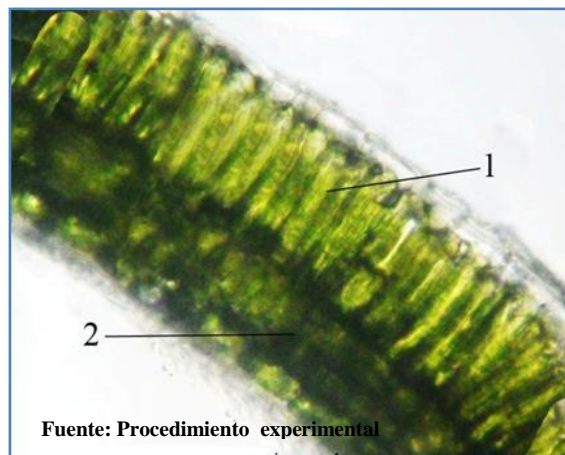
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 237. Pecíolo, grasas y aceites levemente positivos en: Epidermis (1), Xilema (2). (Aumento 400x). Tinción: Sudán IV.



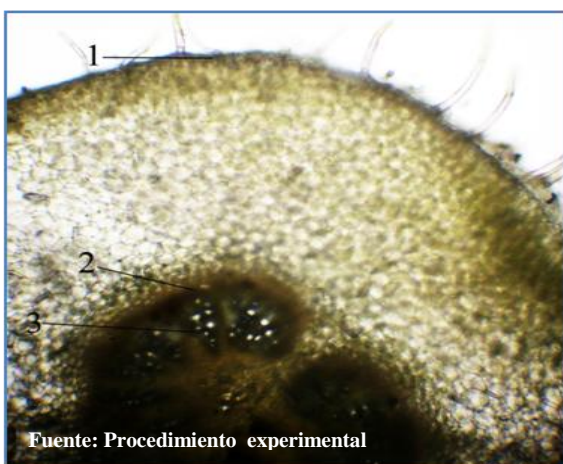
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 238. Folíolo, taninos positivos en: Epidermis (1), Xilema (2). (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



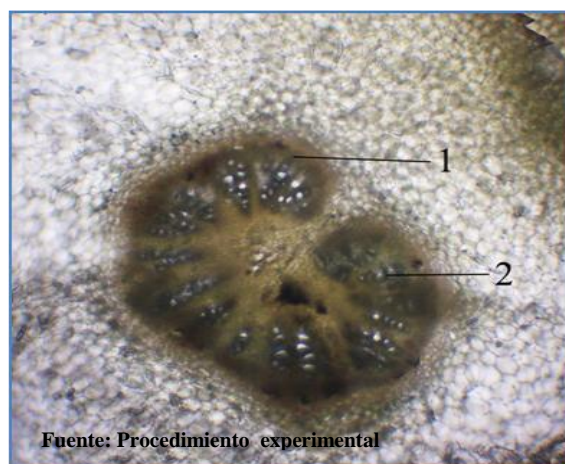
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 239. Folíolo, taninos positivos en: Parénquima en empalizada (1), Parénquima esponjoso (2). (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



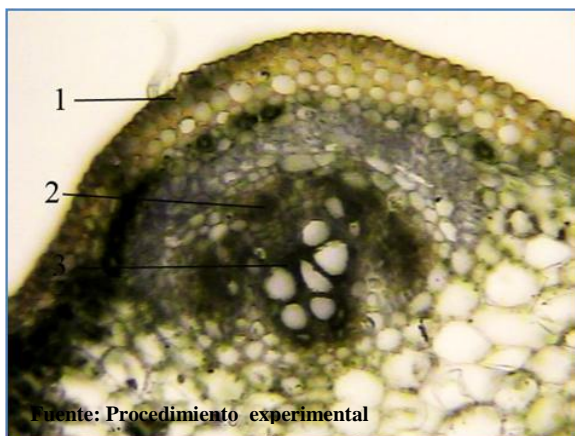
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 240. Pecíolo, taninos positivos en: Epidermis (1), Floema (2), Xilema (3). (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 241. Pecíolo, taninos positivos en: Floema (1), Xilema (2). (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



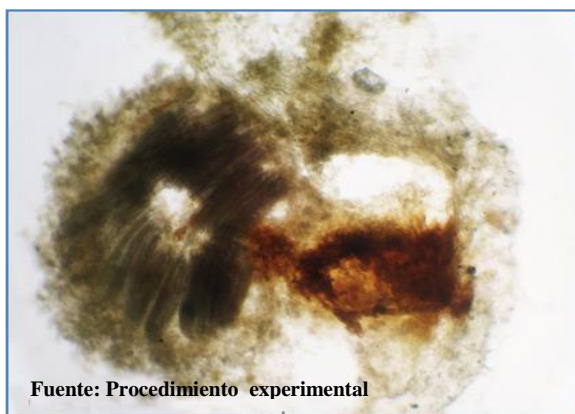
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 242. Pecíolo, taninos positivos en: Epidermis (1), Floema (2), Xilema (3). (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



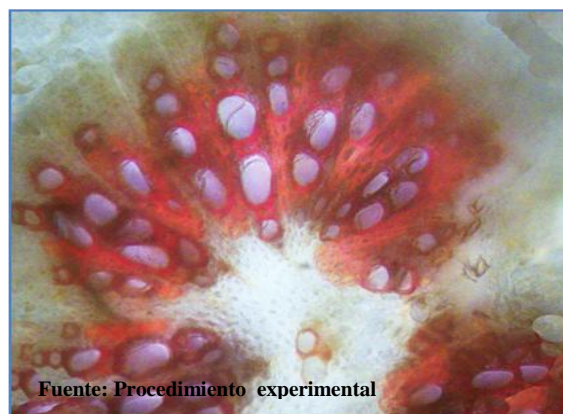
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 243. Folíolo, saponinas positivas. (Aumento 400x). Tinción: H_2SO_4 concentrado.



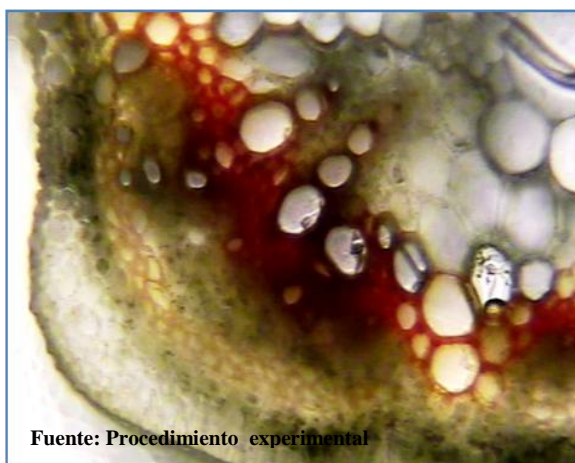
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 244. Pecíolulo, saponinas positivas. (Aumento 400x). Tinción: H_2SO_4 concentrado.



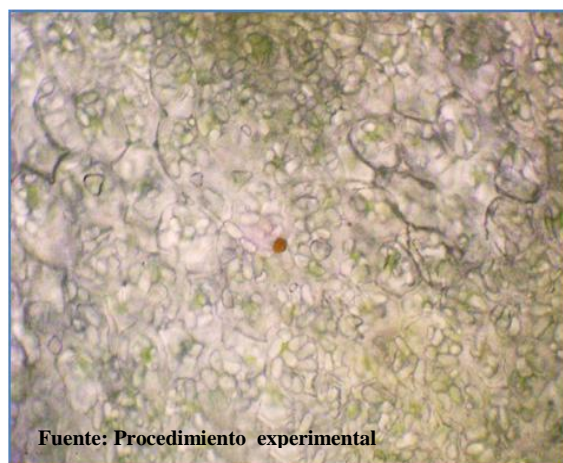
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 245. Pecíolulo, lignina positiva en el xilema. (Aumento 400x). Tinción: Floroglucina.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 246. Pecíolo, lignina positiva en el xilema. (Aumento 400x). Tinción: Floroglucina.



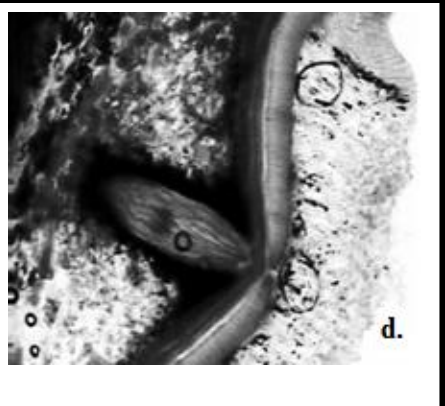
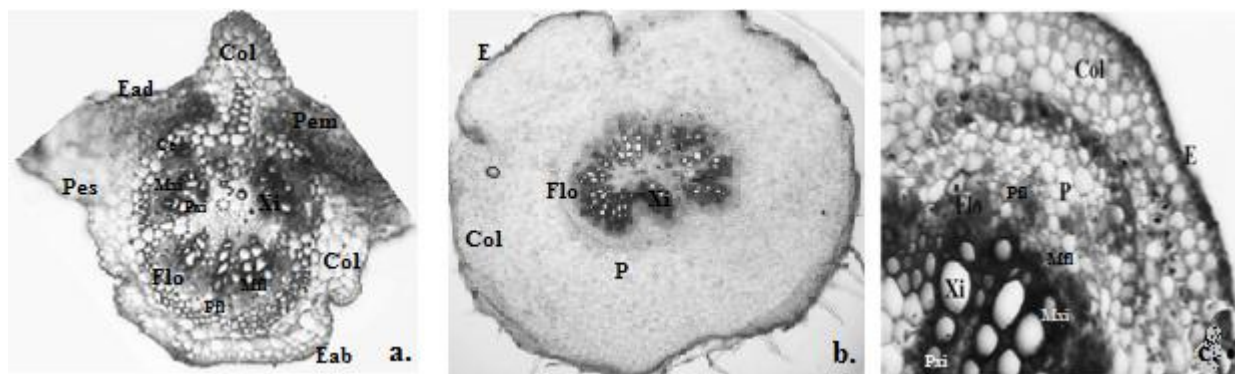
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 247. Semilla, aleuronas de coloración amarillo-naranja. (Aumento 400x). Tinción: Naranja G.

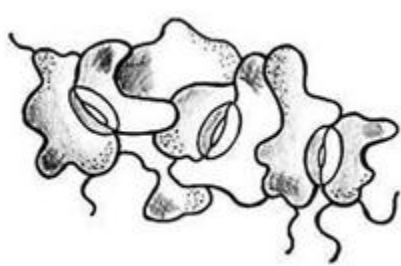
4. Cartilla micrográfica

A continuación se presentan las figuras de las características distintivas de la droga vegetal de *P. lunatus*.

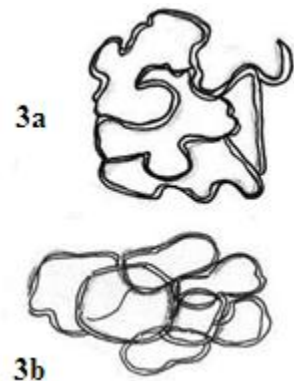
1. Cortes transversales



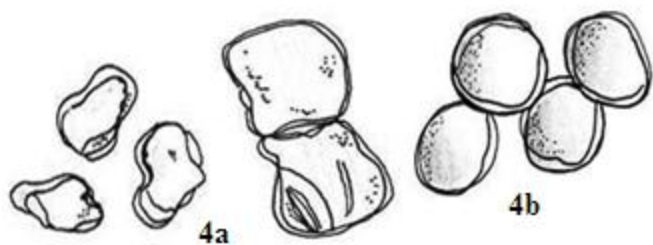
2. Epidermis con estomas



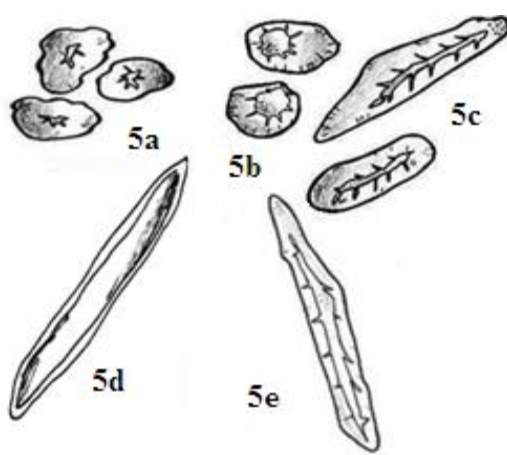
3. Epidermis



4. Células parenquimáticas



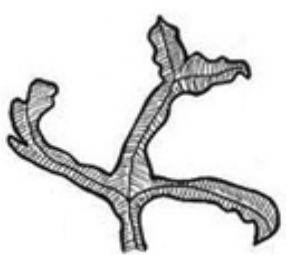
5. Células del esclerénquima



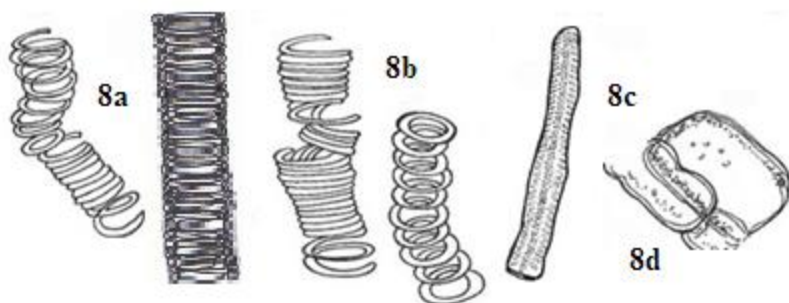
6. Fibra



7. Traqueida



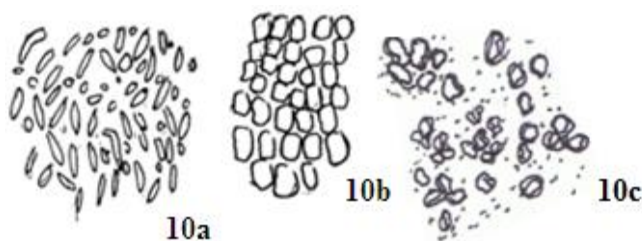
8. Elementos del xilema



9. Vasos del floema



10. Cristales



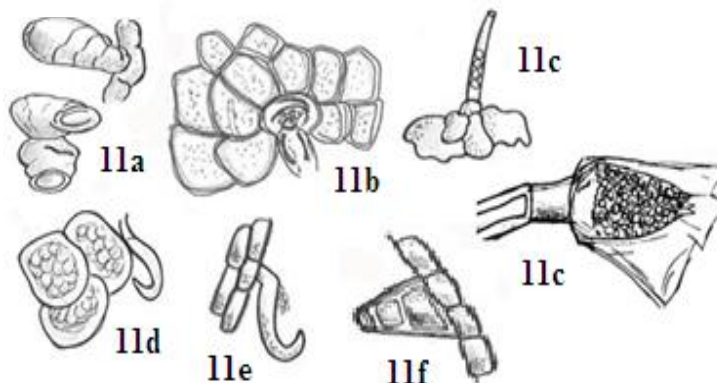
12. Gránulos de almidón



13. Plástidos



11. Tricomas



1. Cortes transversales. 1a, Folíolo. 1b, Peciólulo. 1c, Pecíolo. 1d, Semilla. Se observaron los tejidos fundamentales y vasculares: Epidermis adaxial (Ead), epidermis abaxial (Eba), epidermis (E), cutícula (Cut), colénquima (Col), parénquima (P), parénquima en empalizada (Pem), parénquima esponjoso (Pes), células esclerenquimáticas (Ce), floema (Flo), protofloema (Pfl), metafloema (Mfl), xilema (Xi), metaxilema (Mxi), proxilema (Pxi).
2. Epidermis con estomas paracíticos del folíolo.
3. Epidermis. 3a, epidermis superior del folíolo, peciólulo y pecíolo. 3b, hipodermis o células de corcho para el folíolo.
4. Células parenquimáticas. 4a, del folíolo, peciólulo y pecíolo. 4b, de la semilla.
5. Células del esclerénquima. 5a, braquiesclereidas del folíolo. 5b, braquiesclereidas del pecíolo y peciólulo. 5c, macroesclereidas del folíolo, peciólulo y pecíolo. 5d, fibrotraqueida del folíolo. 5e, fibroesclereidas del peciólulo, pecíolo y semilla.
6. Fibra alargada con extremos ahusados de la semilla.
7. Traqueida helicada del folíolo.
8. Elementos de xilema. 8a, tipo helicoidal laxa y doble helicada del folíolo. 8b, tipo helicoidal laxa y anular del peciólulo y pecíolo. 8c, vasos del xilema perforados con puntuaciones escalariformes del folíolo. 8d, placa perforada simple del folíolo.
9. Vasos del floema del peciólulo y pecíolo.
10. Cristales de oxalato de calcio. 10a, estiloides en el folíolo, peciólulo y pecíolo. 10b, solitarios en el folíolo, peciólulo, pecíolo y semilla. 10c, arenas en el folíolo.
11. Tricomas. 11a, glandular brevifurcado en el folíolo, peciólulo y pecíolo. 11b, unicelular lineal con base de 7 células en disposición radial para el peciólulo y pecíolo. 11c, unicelular lineal con cristales incrustados en su interior y con gránulos de reserva en el extremo de su base. 11d, uncinado de revestimiento para la semilla acompañado de amiloplastos ovalados. 11e, uncinado de revestimiento en el folíolo, peciólulo y pecíolo.
12. Gránulos de almidón en el folíolo.
13. Plástidos. 13a, cromoplasto del tipo globuloso con pigmentos carotenoides en el folíolo. 13b, leucoplasto del tipo amiloplasto en la semilla.

D. *S. occidentalis*

1. Caracteres macroscópicos de identificación botánica: Las hojas poseen un tamaño de 10-30 cm de largo en racimos axilares, sépalos de 6-9 mm; las flores con pétalos amarillos de 2 cm; y con frutos en vainas café oscuro, lineares, planos de 6-12 cm largo por 6-9 mm de ancho. Las semillas son ovales café-olivo de 3-4 mm de largo. Los folíolos formados por 4-6 pares son ovalados-lanceolados de 3-7 cm, con ápice agudo o acuminado (Figura 248). Se preparó e identificó el ejemplar de herbario y se ingresó en el Herbario Biología de Guatemala (BIGU), Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC con el número 52930 (Anexo 1, 2).



Figura 248. Ejemplar de herbario *S. occidentalis*.

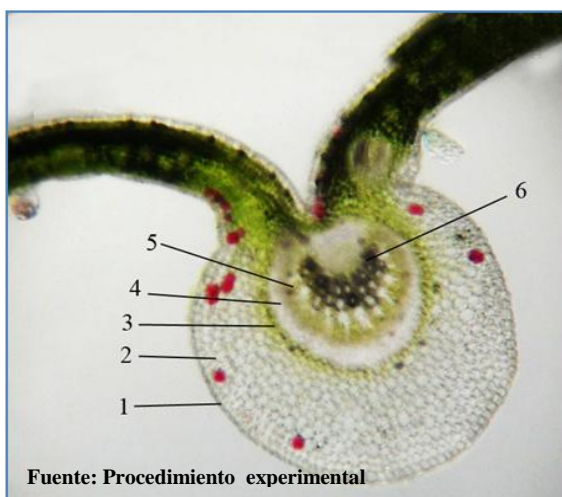
2. Caracteres micromorfológicos e histológicos para identificación

a) Caracteres micromorfológicos: En el folíolo bifacial, peciólulo y pecíolo se observaron los tejidos vasculares y los fundamentales de sostén. El tejido vascular de estos se encuentra dispuesto centralmente. El haz vascular, conformado por el xilema y floema, del folíolo y pecíolo son de forma colateral cerrada mientras que el del peciólulo es de forma perifloemática (Figura 249, 250, 251). Por su localización el xilema es endarco para las 3 partes en estudio (Figura 252, 253, 254). En el folíolo se denota solo un haz vascular, en el peciólulo se observaron 2-3 haces vasculares ocupando una posición central en forma de cilindro sin presentarse parénquima medular; a diferencia del pecíolo en el cual se evidenciaron de 3-5 distribuidos en los extremos del mismo y con parénquima medular en el centro (Figura 249, 250, 251). Los haces vasculares del pecíolo forman un anillo continuo semejante a una estela del tipo sifonostela-euestela (Figura 251).

En el tejido fundamental se observaron para el folíolo, peciólulo y pecíolo tejidos de colénquima anular, parénquima, esclerénquima con paredes lignificadas y parénquima medular con células grandes de bordes delgados con diversos tamaños pero de similar morfología; este último únicamente en el pecíolo presentándose en gran cantidad. En el folíolo y peciólulo se presentó abundante cantidad de colénquima anular. En el folíolo se observaron pigmentos antociánicos fucsia en el colénquima anular de la nervadura central, parénquima en empalizada, esponjoso y en la terminación del folíolo (Figura 249, 250, 252, 255, 256, 257). Por medio de un corte transversal del folíolo se identificaron los tejidos fundamentales de la lámina foliar, se identificó parénquima en empalizada y esponjoso; el último se encuentra hacia la epidermis abaxial con una distribución y aspecto irregular conformado por células rectangulares separadas por espacios intercelulares e integrado por 4 capas. El parénquima en empalizada se encuentra conformado por una capa de células de contornos lisos con distribución a lo largo del folíolo sobre la epidermis adaxial. Se observaron haces vasculares transcurrentes dispuestos en forma vertical rodeados de parénquima (Figura 258).

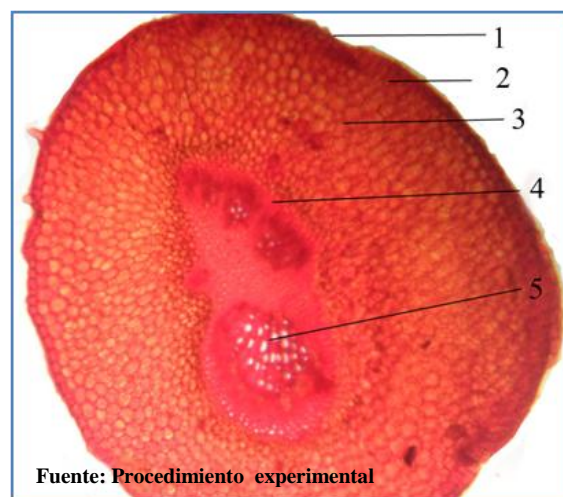
En el tejido epidérmico, la epidermis adaxial se observó más gruesa con cutícula evidente, mientras que la abaxial es irregular y cutícula no evidente; ambas son monoestratificadas

(Figura 258). En la epidermis del folíolo se observaron tricomas glandulares multicelulares y unicelulares (Figura 257, 259). En el peciólulo se evidenciaron tricomas de aspecto glanduloso (Figura 260) y para el pecíolo uncinados de revestimiento (Figura 261). Se observaron cristales solitarios rectangulares de oxalato de calcio sobre el parénquima de la nervadura central del folíolo (Figura 262).



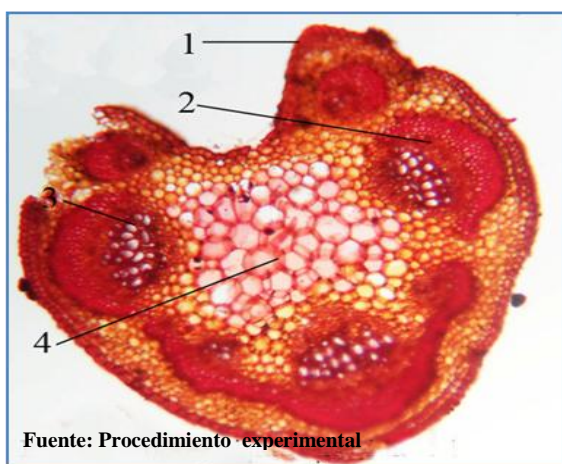
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 249. Folíolo, tejidos vasculares y fundamentales de sostén. Epidermis (1), Colénquima (2), Parénquima (3), Células esclerenquimáticas (4), Floema (5), Xilema (6). (Aumento 100x). Preparación: en fresco.



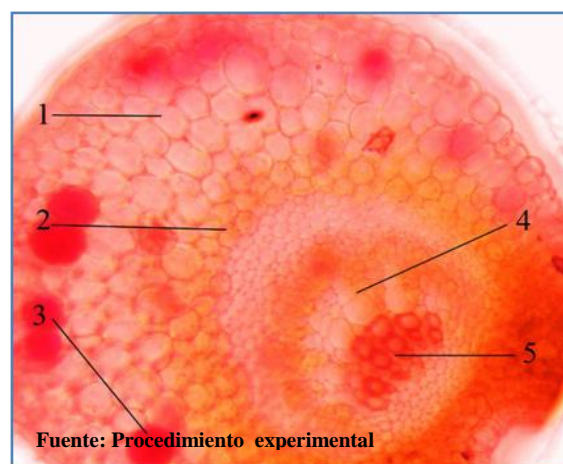
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 250. Peciólulo, tejidos vasculares y fundamentales de sostén. Epidermis (1), Colénquima (2), Parénquima (3), Floema (4), Xilema (5). (Aumento 100x). Tinción: Safranina 1%.



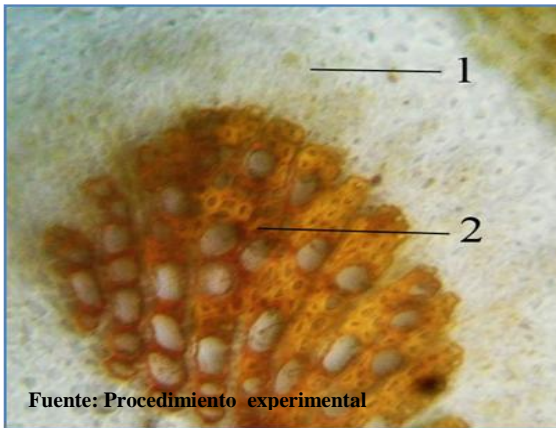
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 251. Peciólulo, tejidos vasculares y fundamentales de sostén. Epidermis (1), Floema (2), Xilema (3), Parénquima medular (4). (Aumento 100x). Tinción: Safranina fast-green.



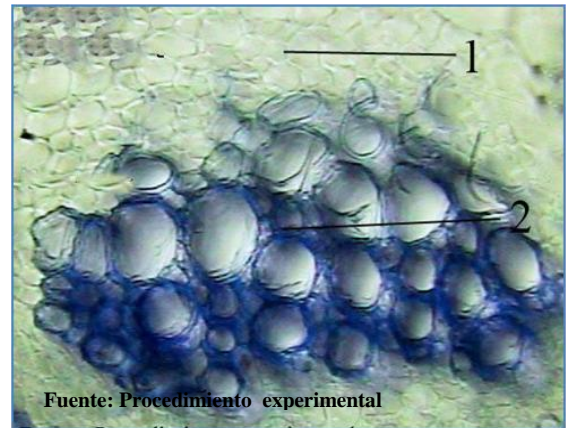
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 252. Folíolo, tejidos vasculares y fundamentales de sostén. Colénquima (1), Parénquima (2), Pigmentos antocianicos fucsia (3), Floema (4), Xilema (5). (Aumento 400x). Tinción: Safranina fast-green.



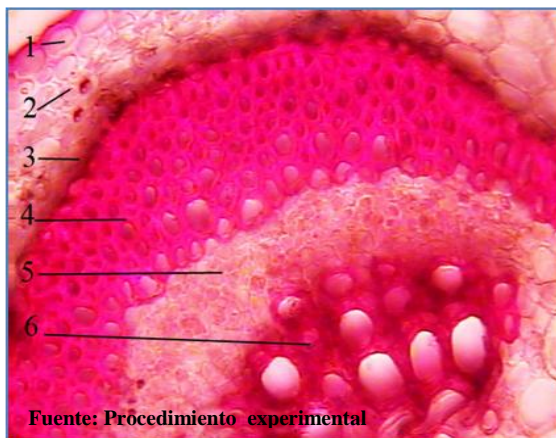
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 253. Pecíolo, tejido vascular. Floema (1), Xilema (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina fast-green.



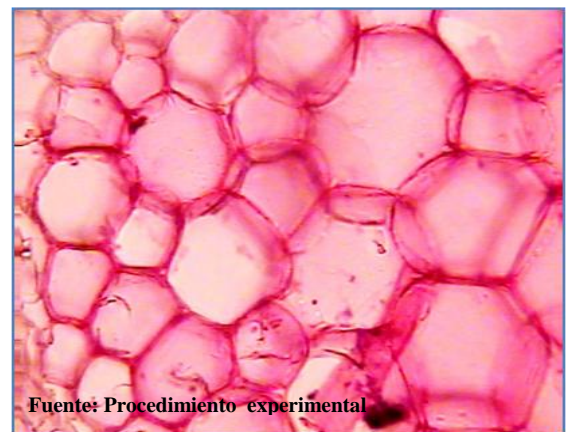
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 254. Pecíolo, tejido vascular. Floema (1), Xilema (2). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



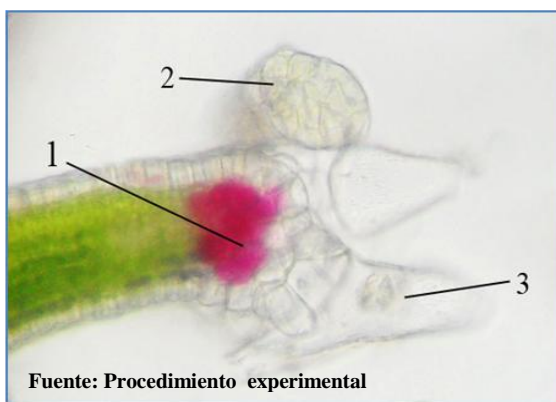
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 255. Pecíolo, tejidos fundamentales. Epidermis (1), Colénquima (2), Parénquima (3), Esclerenquima (4), Floema (5), Xilema (6). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



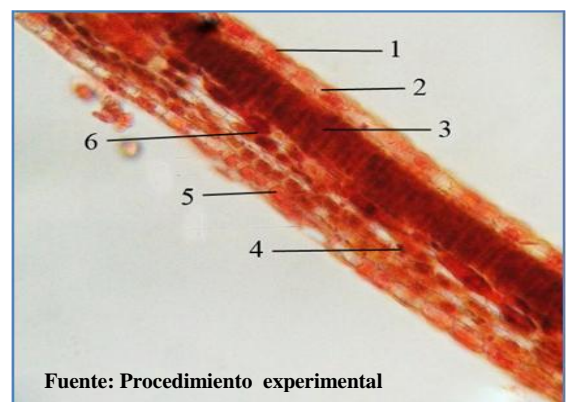
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 256. Pecíolo, tejido de parénquima medular. (Aumento 1000x). Tinción: Safranina 1%.



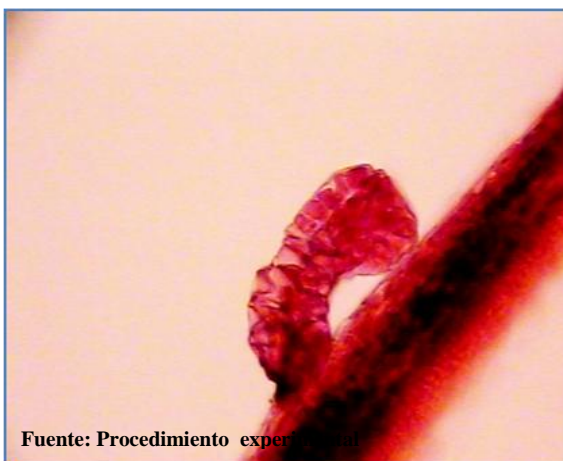
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 257. Folíolo, corte trasversal de la terminación del folíolo. Pigmentos antocianicos fucsia (1), Tricoma glandular multicelular (2), Tricoma unicelular. (Aumento 100x). Preparación: En fresco.



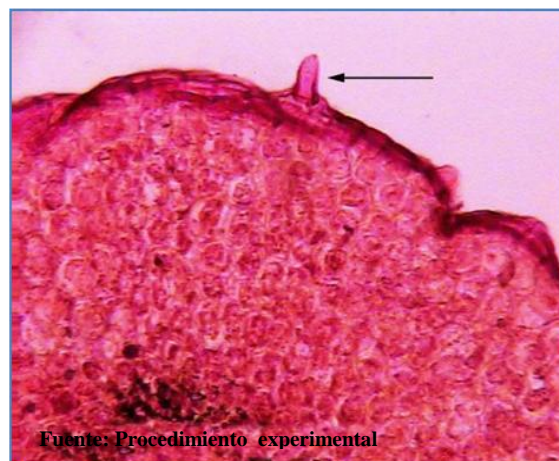
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 258. Folíolo, tejidos de la lámina foliar. Cutícula (1) Epidermis adaxial (2), Parénquima en empalizada (3), Parénquima esponjoso (4), Epidermis abaxial (5), Haz vascular transcurrente (6). (Aumento 400x). Tinción: Safranina fast-green.



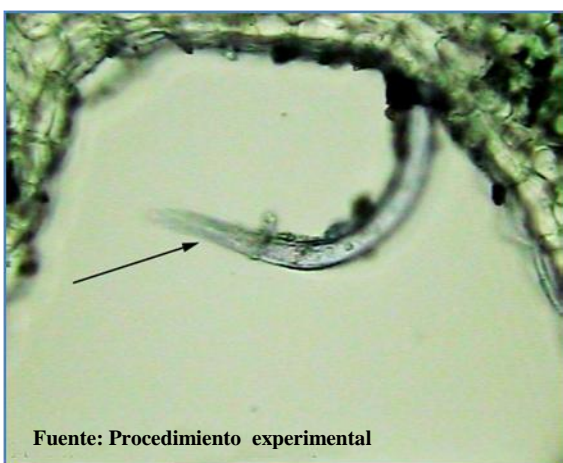
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 259. Folíolo, tricoma glandular multicelular.
(Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



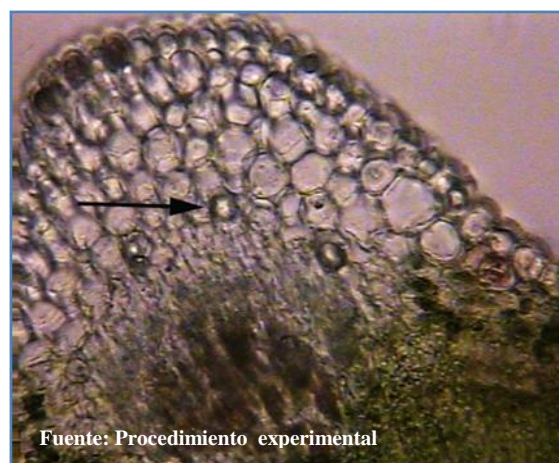
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 260. Pecíolulo, tricoma de aspecto glanduloso. (Aumento 100x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 261 Pecíolo, tricoma uncinado de revestimiento.
(Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.

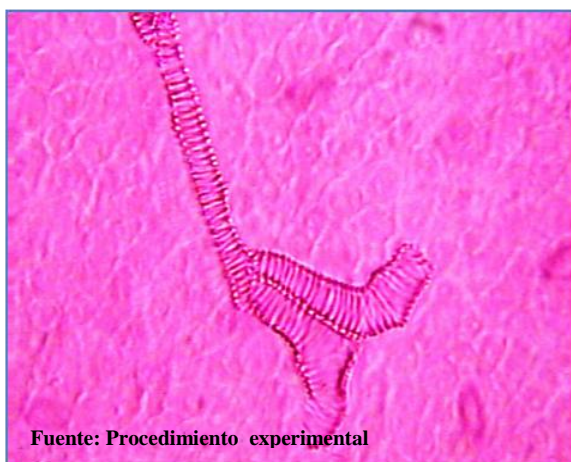


Fuente: Procedimiento experimental

Figura 262. Folíolo, cristales solitarios de oxalato de calcio. (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.

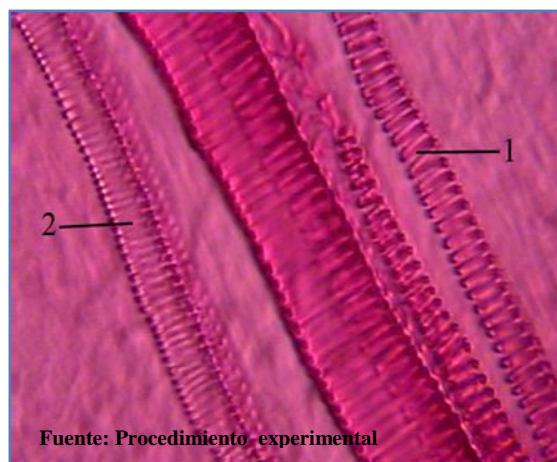
b) Diafanizado del folíolo: Se visualizaron elementos traqueales con engrosamientos helicoidales (Figura 263). El xilema es del tipo helicoidal laxa y doble helicada (Figura 264). La nervación es reticulada y abierta, el término de la venación es de tipo anastomosada. Presentó margen dentado con tricomas en el borde. Así, mismo se observó la venación de la nervadura central (Figura 265, 266). En la epidermis adaxial y abaxial se evidenciaron células de bordes irregulares y abundantes aparatos estomáticos conformados por estomas diacíticos, sin presencia de cloroplastos en sus células oclusivas y con 2 células subsidiarias arregladas en línea paralela, horizontal y diagonal al eje transversal del folíolo (Figura 265, 267). Por debajo de la epidermis adaxial se visualizó el tejido parenquimático denominado clorénquima conformado por células grandes de forma redonda separadas por

pequeños espacios intercelulares (Figura 268). Se observaron tricomas glandulares multicelulares y sus bases sobre la epidermis adaxial (Figura 269, 270), además se encontraron glándulas capitadas (Figura 271). Se visualizaron otros tipos de tricomas, abundantes estrigosos en el borde del folíolo caracterizados por su forma aguda y base agrandada (Figura 266); y unicelulares lineales sobre la nervadura central (Figura 272). Se encontraron sobre la nervadura central abundantes cristales solitarios rectangulares de oxalato de calcio y en la epidermis adaxial del folíolo en forma de drusas (Figura 273, 274).



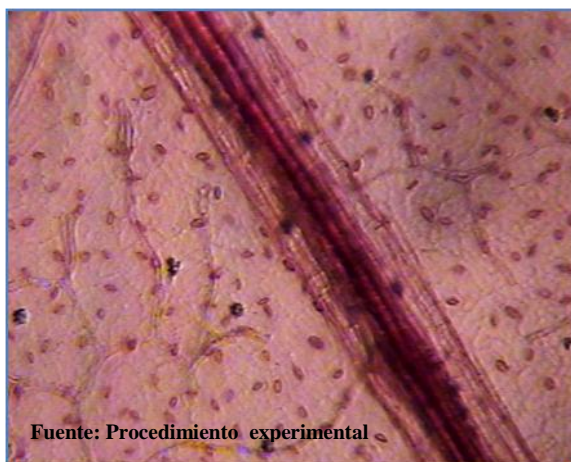
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 263. Folíolo, elementos traqueales con engrosamientos helicoidales. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



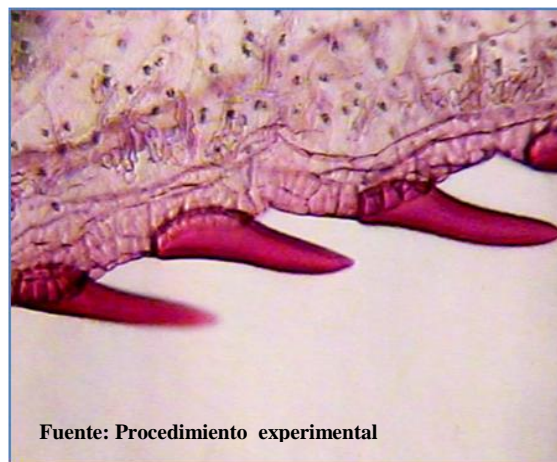
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 264. Folíolo. Xilema helicoidal laxa (1), Xilema doble helicada (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 265. Folíolo, Epidermis adaxial, nervación reticulada y abierta, nótese los estomas diacíticos. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



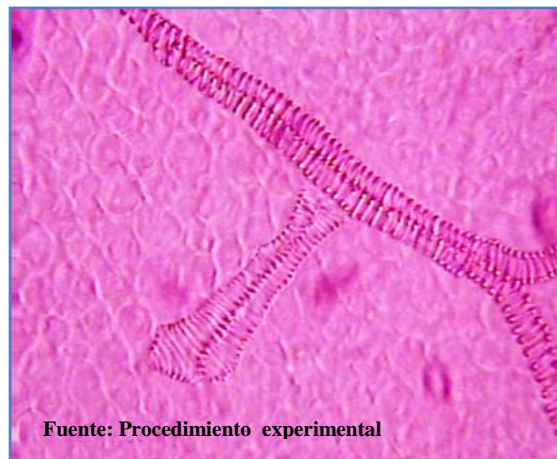
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 266. Folíolo, término de venación anastomosada, margen reticulada, con tricomas estrigosos en el borde. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



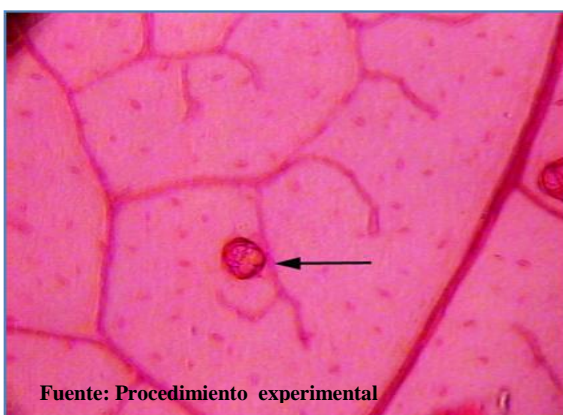
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 267. Folíolo, estomas diacíticos en epidermis abaxial. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 268. Folíolo, tejido del clorénquima. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 269. Folíolo, bases de tricomas en epidermis adaxial. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



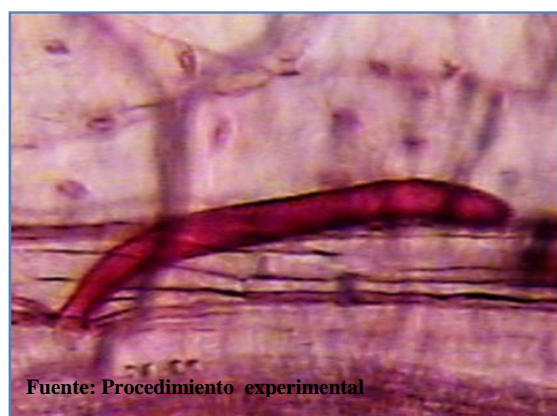
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 270. Folíolo, tricoma glandular multicelular. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



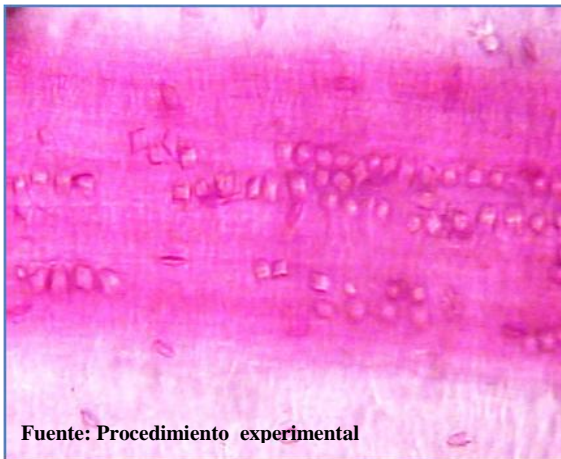
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 271. Folíolo, glándula capitada. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



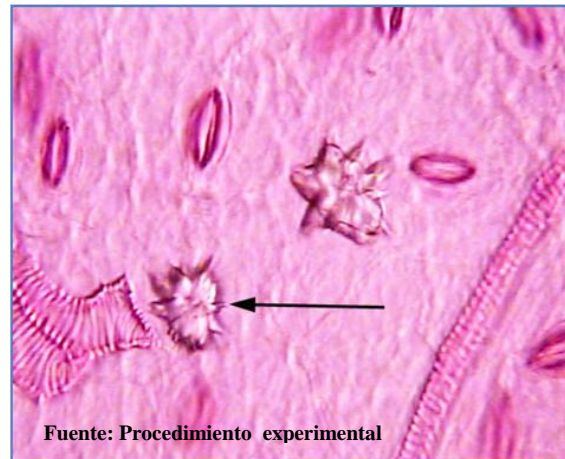
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 272. Folíolo, tricoma unicelular lineal en la nervadura central. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 273. Folíolo, cristales solitarios de oxalato de calcio en nervadura central. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 274. Folíolo, cristales de oxalato de calcio en forma de drusa sobre epidermis. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

c) Disociado del folíolo, peciólulo y pecíolo: Las estructuras encontradas en el disociado del peciólulo y pecíolo fueron las mismas por lo tanto se muestra una figura para ambos. En el peciólulo y pecíolo se observaron células grandes rectangulares muy unidas entre sí formando una capa de epidermis (Figura 275).

Se visualizaron células esclerenquimáticas con paredes engrosadas de formas variadas, en el folíolo se encontraron braquiesclereidas y macrosclereidas; estas últimas también en el peciólulo y pecíolo (Figura 276, 277, 278). En el folíolo, peciólulo y pecíolo se evidenciaron fibroesclereidas alargadas con extremos ahusados y paredes gruesas (Figura 279, 280). Se hallaron en el folíolo otros tipos de fibras alargadas (Figura 281).

Para el peciólulo y pecíolo se encontraron células parenquimáticas de forma irregular unidas entre sí por sus extremos (Figura 282). Se observaron varios tipos de xilema, helicoidal laxa en el folíolo, peciólulo y pecíolo; además doble helicada en el folíolo y helicoidal anular en forma de anillo para el peciólulo y pecíolo (Figura 283, 284, 285). Se visualizaron en el folíolo abundantes cristales de oxalato de calcio en forma de arena y drusas (Figura 286, 287); así mismo, presentó una gran cantidad de tricomas estrigosos con forma puntiaguda, tectores de cobertura y glandulares multicelulares (Figura 288, 289, 290). En el peciólulo y pecíolo se hallaron 2 tipos de tricomas, glandulares secretores unicelulares y uncinados de revestimiento (Figura 291, 292).

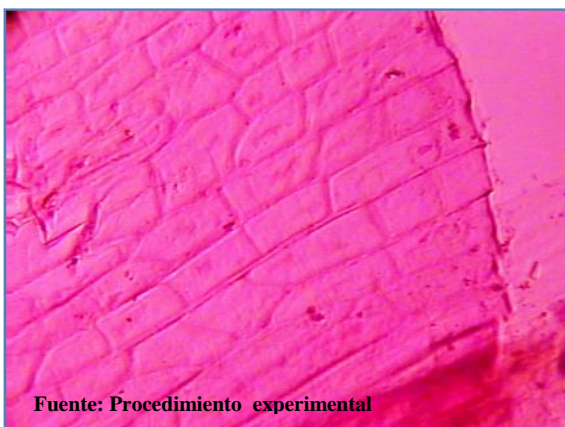


Figura 275. Pecíolo, células de epidermis. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Figura 276. Folículo, braquiesclereidas. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

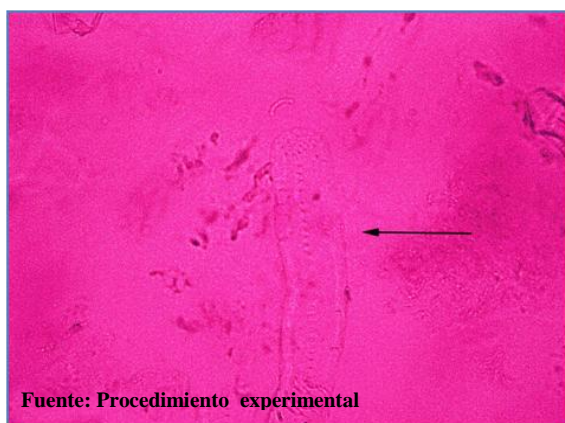


Figura 277. Folículo, macrosclereidas. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

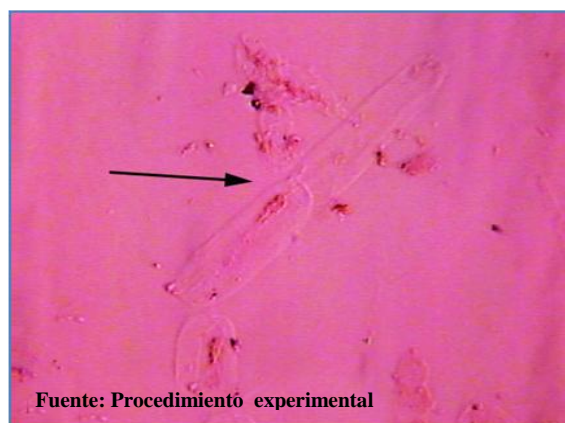


Figura 278. Pecíolo, macrosclereidas. (Aumento 400x). Tinción Safranina 1%.

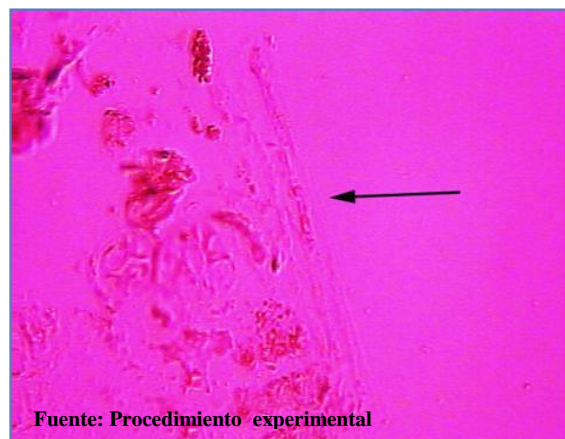


Figura 279. Folículo, fibroesclereidas. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

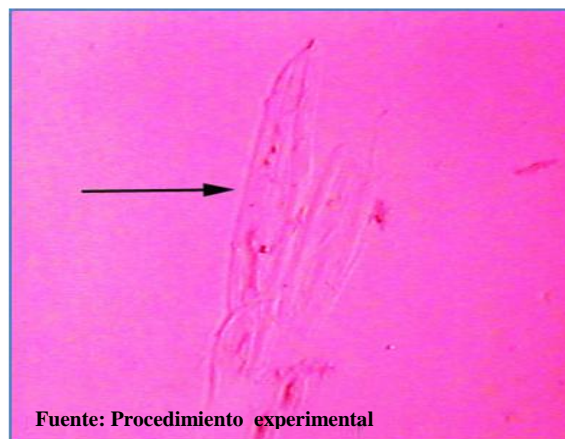
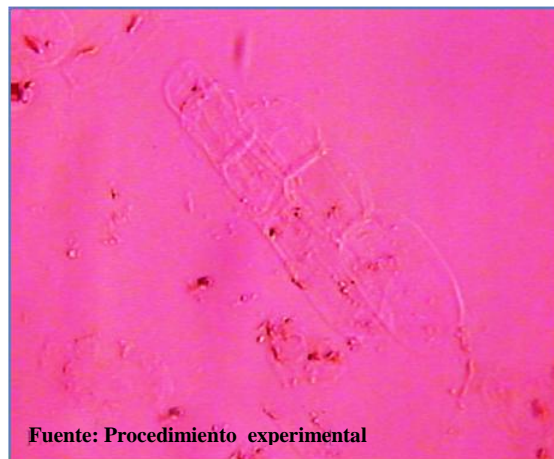


Figura 280. Pecíolo, fibroesclereidas. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



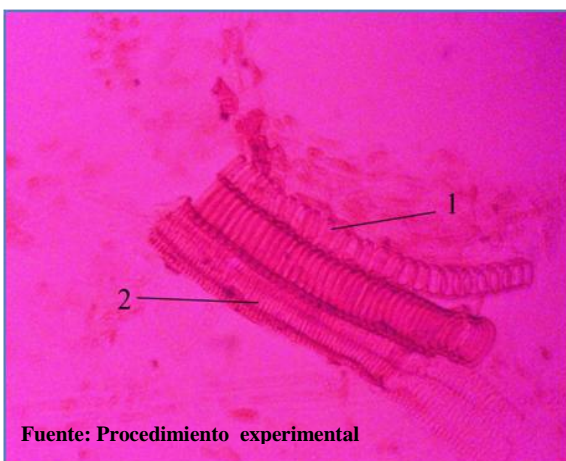
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 281. Foliolo, fibra alargada. (Aumento 400x).
Tinción: Safranina 1%.



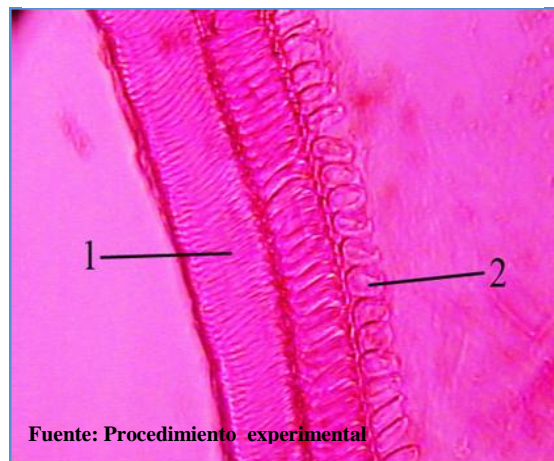
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 282. Pecíolo, células parenquimáticas.
(Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



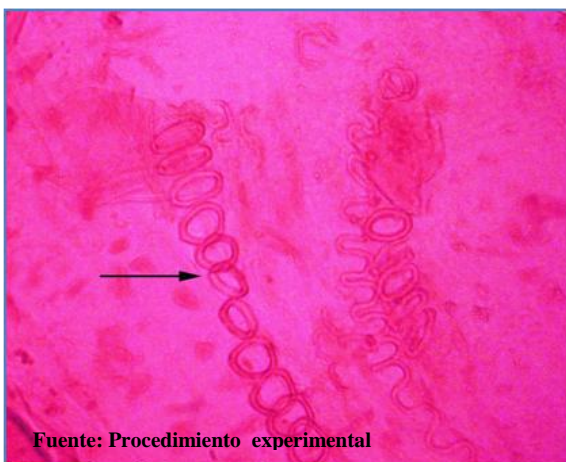
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 283. Foliolo. Xilema helicoidal laxa (1), Xilema doble helicada (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



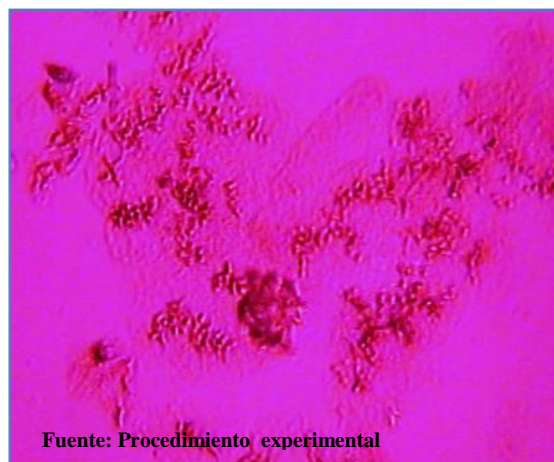
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 284. Pecíolo. Xilema helicoidal laxa (1), Xilema helicoidal anular (2). (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



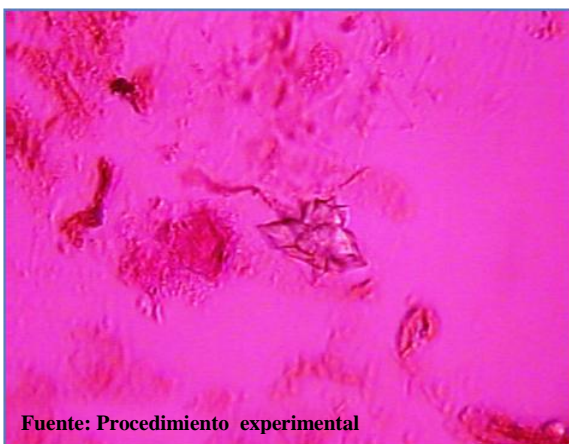
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 285. Pecíolo, xilema helicoidal anular.
(Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



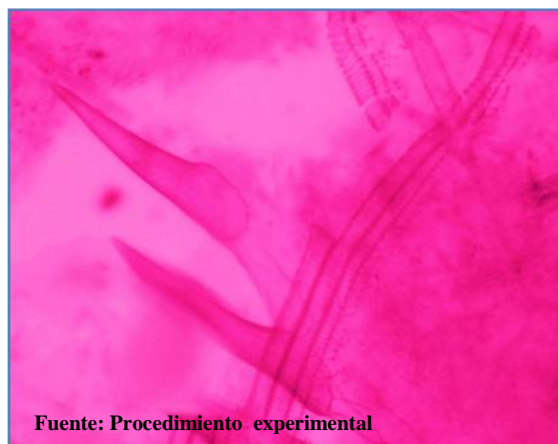
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 286. Foliolo, cristales de oxalato de calcio del tipo arena. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



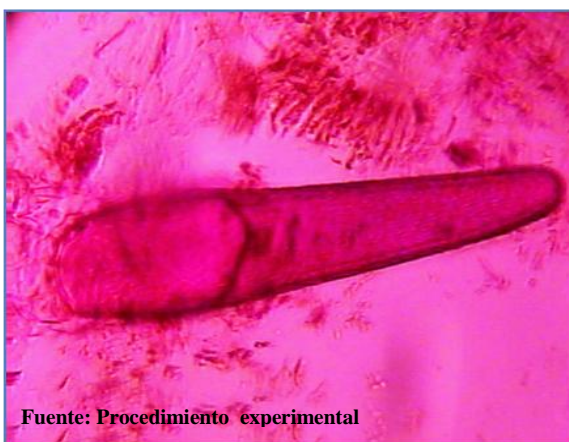
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 287. Foliolo, cristales de oxalato de calcio en forma de drusas. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



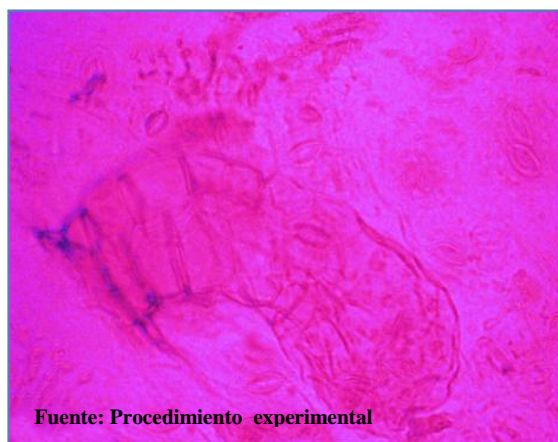
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 288. Foliolo, tricomas estrigosos. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



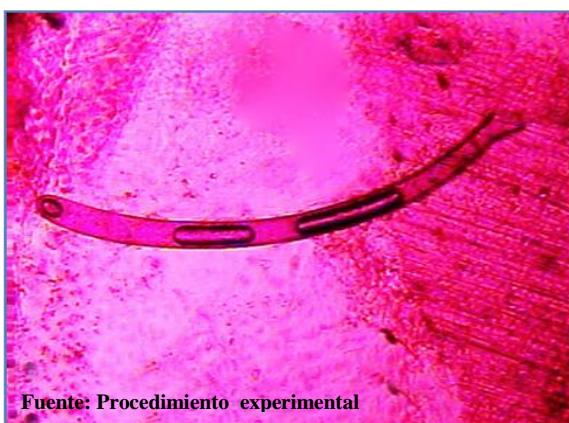
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 289. Foliolo, tricoma tector de cobertura. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 290. Foliolo, tricoma glandular multicelular. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 291. Pecíolo, tricoma secretor unicelular. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 292. Pecíolo, tricomas uncinados de revestimiento. (Aumento 400x). Tinción: Safranina 1%.

3. Tamizaje histoquímico del folíolo, peciólulo y pecíolo

a) Alcaloides: No se encontró precipitado rojo ladrillo característico de una reacción positiva en los tejidos del folíolo, peciólulo y pecíolo (Figura 293, 294, 295, 296).

b) Mucílagos: El folíolo mostró reacción positiva en la epidermis abaxial de la nervadura central, en la adaxial y abaxial de la vaina del folíolo; en el parénquima, los haces del xilema y levemente positiva en el colénquima y parénquima esponjoso (Figura 297, 298, 299). La epidermis y el xilema del peciólulo y pecíolo mostraron reacción positiva, además en el pecíolo en las células esclerenquimáticas y parénquima medular; mientras que en el peciólulo en el parénquima. La reacción se evidenció levemente positiva para el colénquima, células esclerenquimáticas y floema del peciólulo (Figura 300, 301, 302).

c) Grasas y aceites: Se encontraron presentes para el folíolo en la epidermis abaxial de la nervadura central, en la abaxial de la vaina del folíolo; en los tricomas glandulares multicelulares, en el floema; en algunas células del colénquima y parénquima (Figura 303). Para el peciólulo y pecíolo, la epidermis y algunas células del colénquima mostraron reacción positiva; además para el pecíolo en los tricomas tectores de revestimiento, en pocas células del parénquima medular y en el floema se presenciaron algunas gotas de aceite (Figura 304, 305, 306).

d) Taninos: Resultaron positivos para el parénquima esponjoso y levemente positivo en la empalizada y en el xilema de la lámina foliar (Figura 307, 308). En el peciólulo no se evidenció la coloración negro-azulado o negro-verdoso por lo que se consideró negativo (Figura 309). Para el pecíolo la reacción fue positiva en el parénquima, xilema y levemente positiva en algunas células del colénquima (Figura 310, 311).

e) Saponinas: Se evidenciaron positivas para las 3 partes de la planta en estudio, pero no se logró identificar la morfología específica por medio de una figura debido a que el material vegetal se destruyó al reaccionar con el ácido sulfúrico concentrado.

f) Lignina: En el xilema del peciólulo se observó una reacción levemente positiva a diferencia del peciolo en la cual los haces del xilema se mostraron positivos (Figura 312, 313).

En el inciso E se muestra la comparación de las pruebas histoquímicas y las determinaciones cualitativas en tubo de ensayo - pruebas presuntivas / Ensayos de cianidina y leucoantocianina- que apoyan la confirmación de la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios y algunos constituyentes inertes.

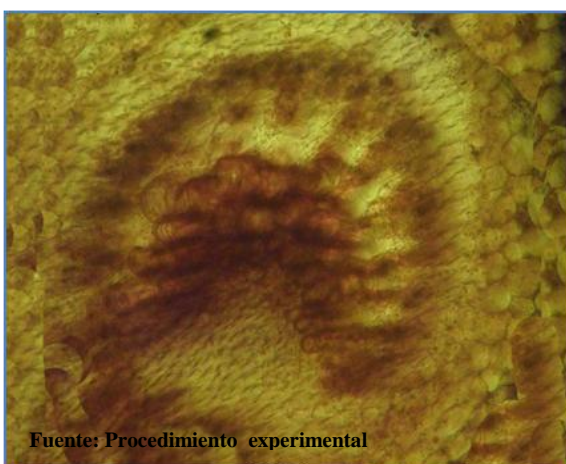


Figura 293. Foliolo, alcaloides negativos. (Aumento 400x). Tinción: Drangendorff.

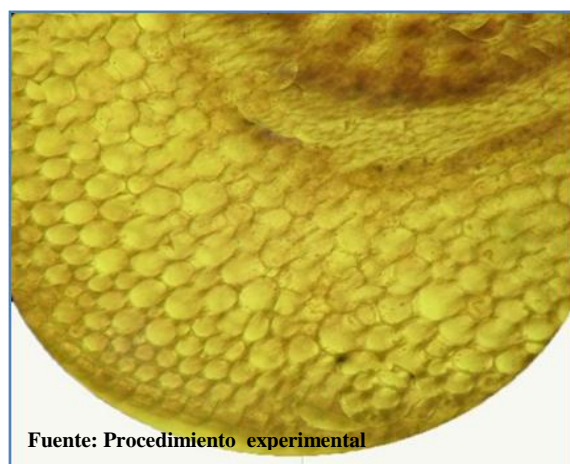


Figura 294. Foliolo, alcaloides negativos. (Aumento 400x). Tinción: Drangendorff.



Figura 295. Peciólulo, alcaloides negativos. (Aumento 100x). Tinción: Drangendorff.

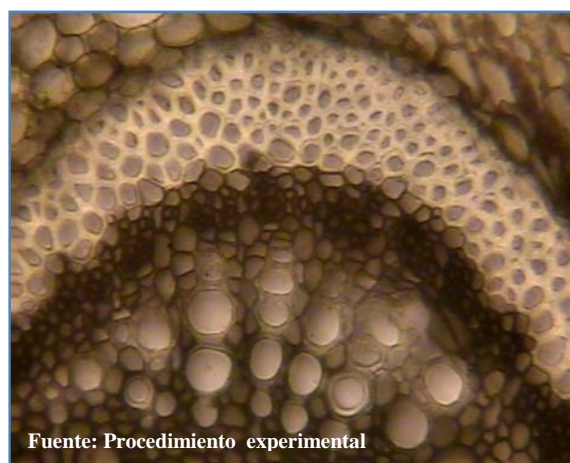
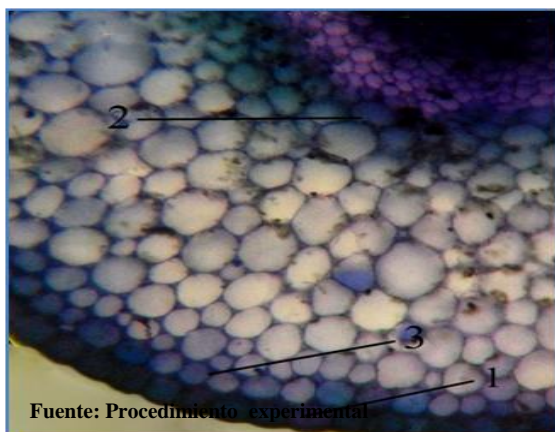
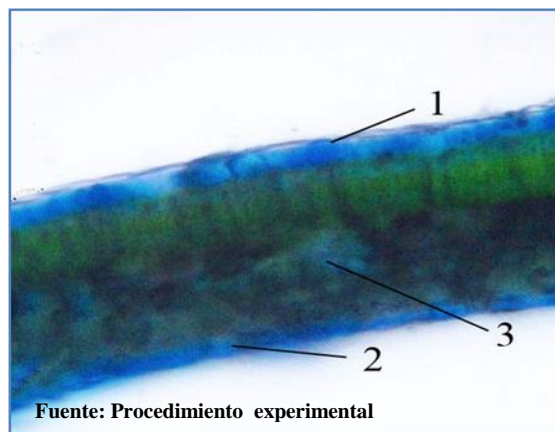


Figura 296. Peciolo, alcaloides negativos. (Aumento 400x). Tinción: Drangendorff.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 297. Folíolo, mucílagos positivos en: Epidermis (1), Parénquima (2). Levemente positivos en: Colénquima (3). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



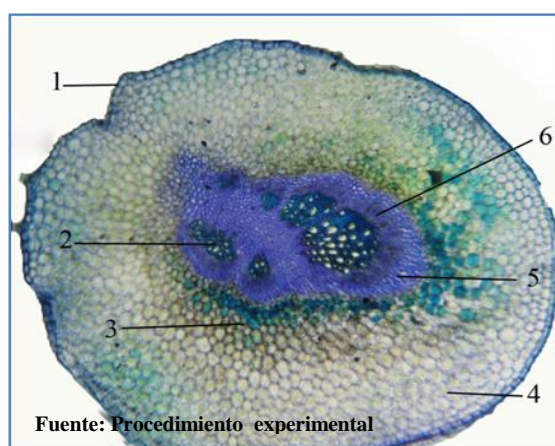
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 298. Folíolo, mucílagos positivos en: Epidermis adaxial (1), Epidermis abaxial (2). Levemente positivos en: Parénquima esponjoso (3). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



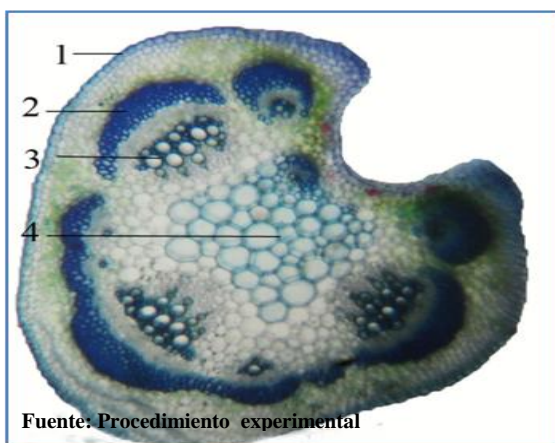
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 299. Folíolo, mucílagos positivo en haces del xilema. (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



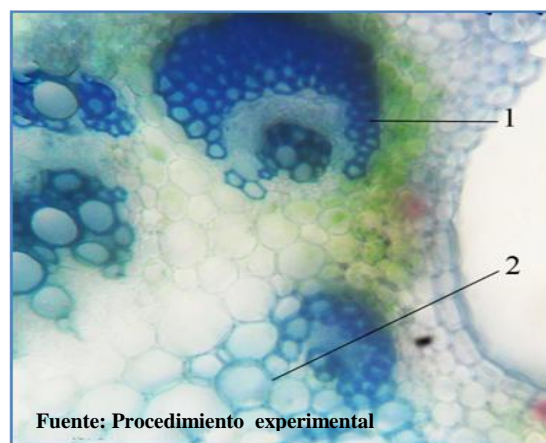
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 300. Pecíolo, mucílagos positivo en: Epidermis (1), Xilema (2), Parénquima (3). Levemente positivos en: Colénquima (4), Células esclerenquimáticas (5), Floema (6). (Aumento 100x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



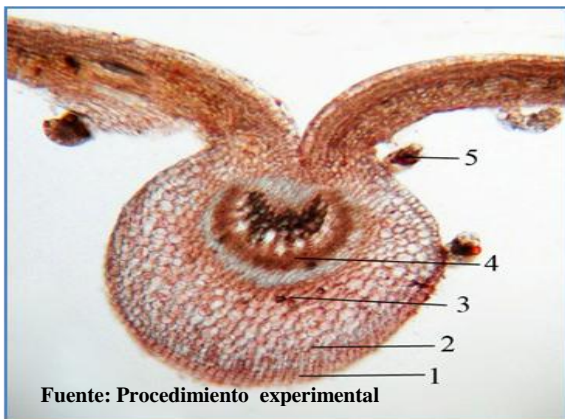
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 301. Pecíolo, mucílagos positivos en: Epidermis (1), Células del esclerénquima (2), Xilema (3), Parénquima medular (4). (Aumento 100x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



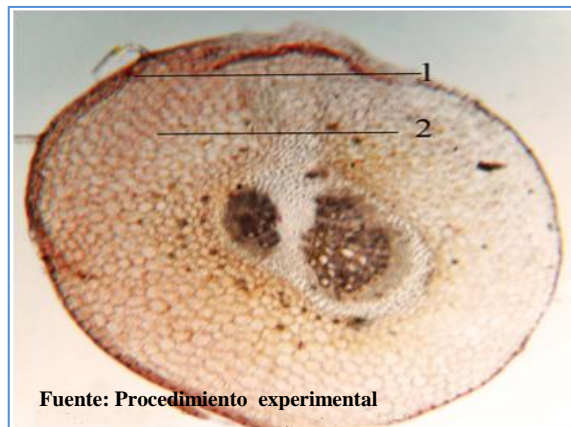
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 302. Pecíolo, mucílagos positivos en: Células de esclerénquima (1), Parénquima medular (2). (Aumento 400x). Tinción: Azul de cresilo 1%.



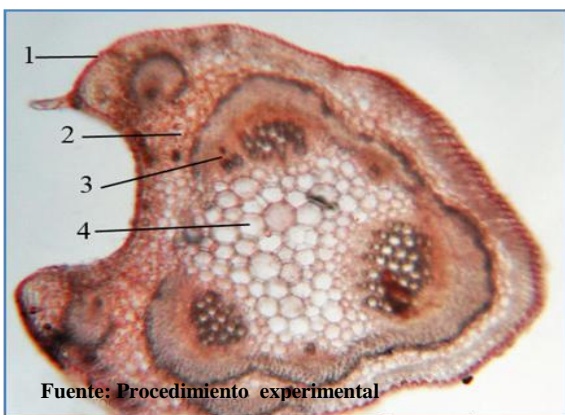
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 303. Foliolo, grasas y aceites positivos en: Epidermis (1), Colénquima (2), Parénquima (3), Floema (4), Tricomas glandulares multicelulares (5). (Aumento 100x). Tinción: Sudán IV.



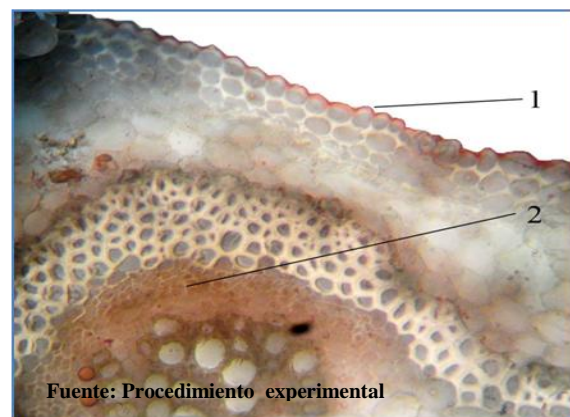
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 304. Peciólulo, grasas y aceites positivos en: Epidermis (1), Colénquima (2). (Aumento 100x). Tinción: Sudán IV.



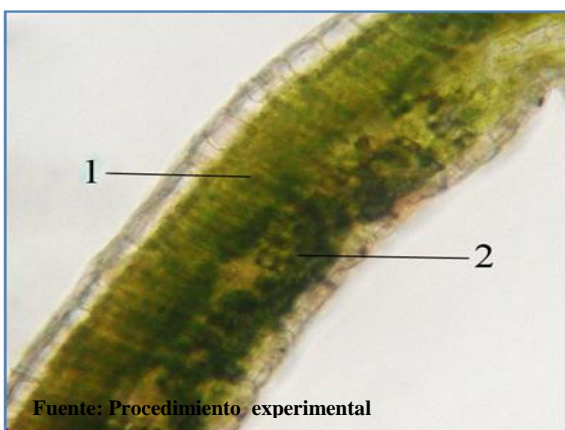
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 305. Peciolo, grasas y aceites positivos en: Epidermis (1), Colénquima (2), Floema (3), Parénquima medular (4), Tricoma tector de revestimiento (5). (Aumento 100x). Tinción: Sudán IV.



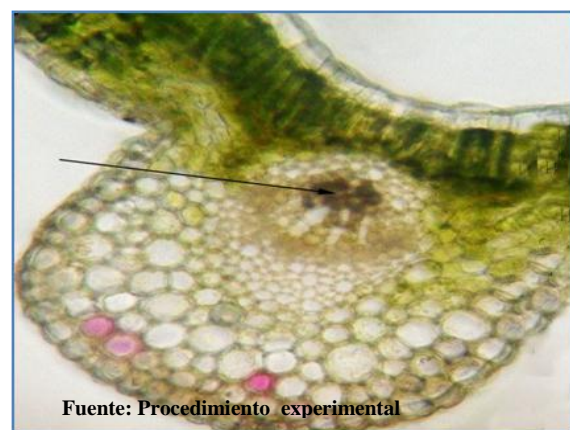
Fuente: Procedimiento experimental

Figura 306. Peciolo, grasas y aceites positivos en: Epidermis (1), Floema (2). (Aumento 100x). Tinción: Sudán IV.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 307. Foliolo, taninos positivos en: Parénquima esponjoso (1). Levemente positivos en parénquima empalizada (2). (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



Fuente: Procedimiento experimental

Figura 308. Foliolo, taninos positivos en el xilema. (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.



Figura 309. Pecíolo, taninos negativos. (Aumento 100x). Tinción: Sulfato férrico.

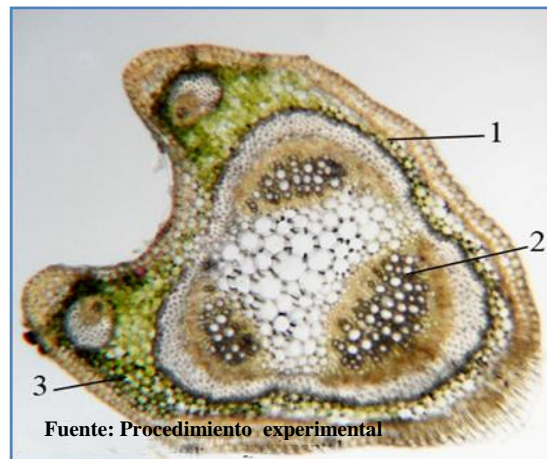


Figura 310. Pecíolo, taninos positivos en: Parénquima (1), Xilema (2). Levemente positivos en: Colénquima (3). (Aumento 100x). Tinción: Sulfato férrico.

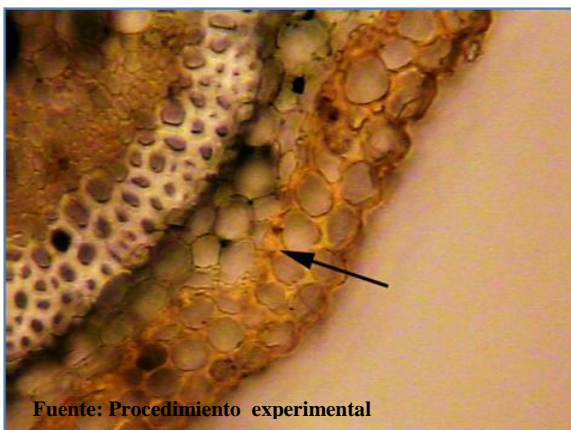


Figura 311. Pecíolo, taninos levemente positivos en células de colénquima. (Aumento 400x). Tinción: Sulfato férrico.

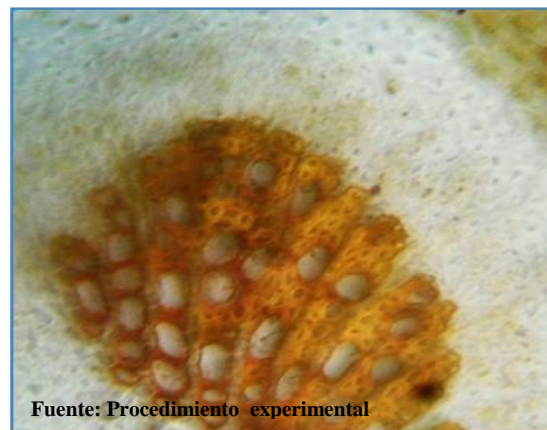


Figura 312. Pecíolo, lignina levemente positiva en xilema. (Aumento 400x). Tinción: Floroglucina.

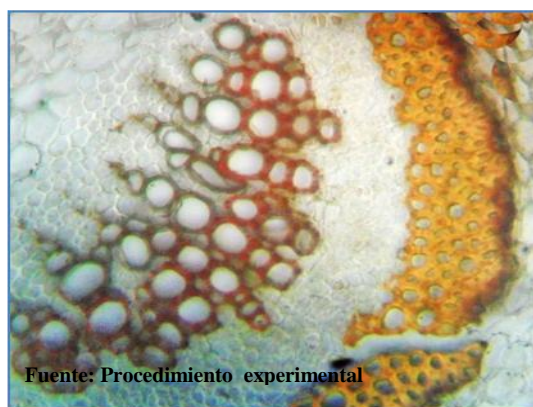
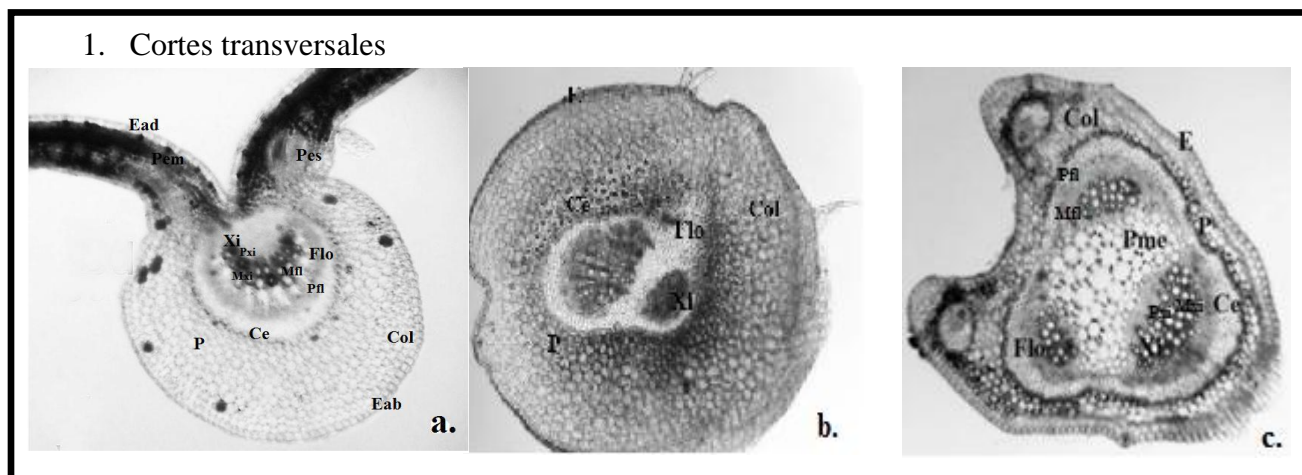


Figura 313. Pecíolo, lignina positiva en haces de xilema. (Aumento 400x). Tinción: Floroglucina.

4. Cartilla micrográfica

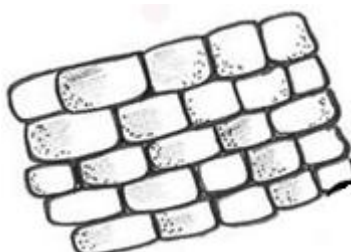
A continuación se presentan las figuras de las características distintivas de la droga vegetal de *S. occidentalis*.



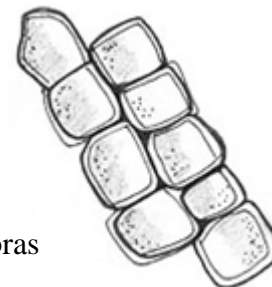
2. Epidermis con estomas



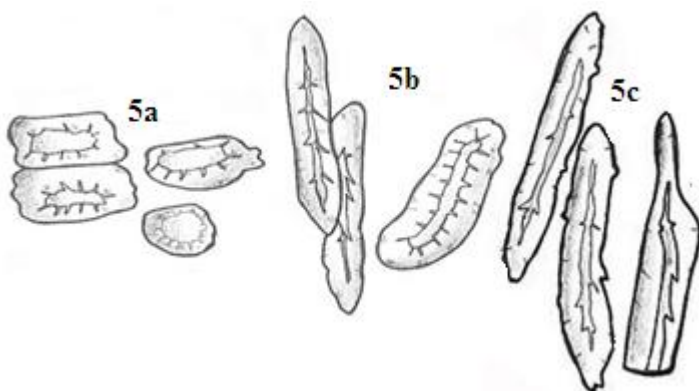
3. Células epidérmicas



4. Células parenquimáticas



5. Células del esclerénquima



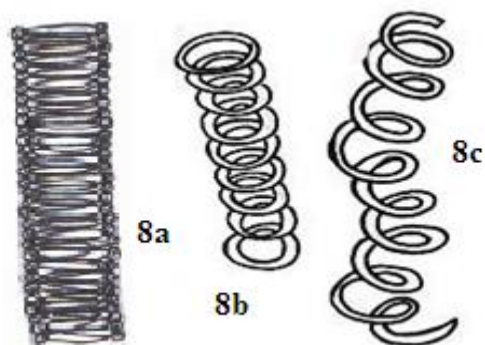
6. Fibras



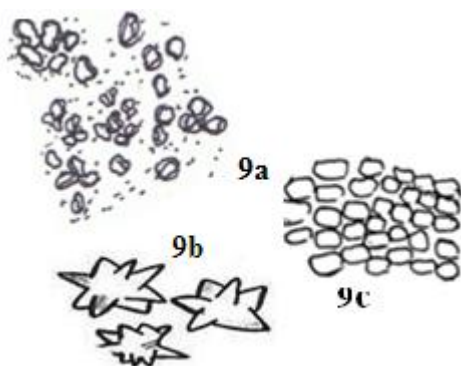
7. Traqueidas



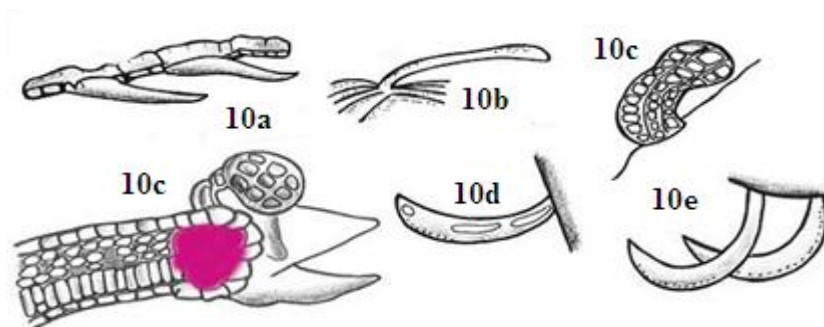
8. Tipos de xilema



9. Cristales



10. Tricomas



11. Glándula capitada



1. Cortes transversales. 1a, Folíolo. 1b, Pecíolulo. 1c, Pecíolo. Se observaron los tejidos fundamentales y vasculares. Se observaron: Epidermis adaxial (Ead), epidermis abaxial (Eba), epidermis (E), cutícula (Cut), colénquima (Col), parénquima (P), parénquima en empalizada (Pem), parénquima esponjoso (Pes), células esclerenquimáticas (Ce), floema (Flo), protofloema (Pfl), metafloema (Mfl), xilema (Xi), metaxilema (Mxi), proxilema (Pxi)
2. Epidermis con estomas diacíticos del folíolo.
3. Células epidérmicas rectangulares del pecíolulo y pecíolo.
4. Células parenquimáticas del pecíolulo y pecíolo.
5. Células del esclerénquima. 5a, braquiesclereidas del folíolo. 5b, macrosclereidas del folíolo, pecíolulo y pecíolo. 5c, fibroesclereidas del folíolo.
6. Fibra alargada del folíolo.
7. Traqueida helicada del folíolo.
8. Tipos de xilema. 8a, doble helicada del folíolo. 8b, helicoidal anular del pecíolulo y pecíolo. 8c, helicoidal laxa del folíolo, pecíolulo y pecíolo.
9. Cristales de oxalato de calcio en el folíolo. 9a, del tipo arena. 9b, en forma de drusas. 9c, del tipo solitario.
10. Tricomas. 10a, estrigosos en el borde del folíolo. 10b, unicelular lineal del folíolo. 10c, glandular multicelular y unicelular sobre epidermis del folíolo. 10d, glandular secretor unicelular del pecíolulo y pecíolo. 10e, uncinados de revestimiento de pecíolulo y pecíolo.
11. Glándula capitada sobre epidermis adaxial del folíolo.

E. Comparación de las pruebas histoquímicas y las determinaciones cualitativas en tubo de ensayo - pruebas presuntivas / Ensayos de cianidina y leucoantocianina-

La Tabla 1 muestra una comparación de las pruebas histoquímicas realizadas para la determinación de metabolitos secundarios y constituyentes inertes en las diferentes partes de la droga vegetal de cada una de las especies de leguminosas en estudio. Las partes que se evaluaron fueron folíolo, peciólulo y pecíolo; y únicamente se evaluó la semilla en *P. lunatus*. Las 4 leguminosas presentaron un comportamiento similar en las reacciones histoquímicas, variando algunas veces en 1-2 pruebas histoquímicas.

Tabla 1. Comparación de las pruebas histoquímicas del material vegetal en estudio

Metabolitos secundarios y constituyentes inertes	Especies de leguminosas												Esperado	
	<i>D. robinoides</i>			<i>H. courbaril</i>			<i>P. lunatus</i>			<i>S. occidentalis</i>				
	Partes de la droga vegetal													
	F	P	Pec	F	P	Pec	F	P	Pec	S	F	P	Pec	
Alcaloides	+	+	+	-	+	±	+	+	+	Nr	-	-	-	Precipitado rojo ladrillo
Mucílagos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Nr	+	+	+	Coloración azul Francia
Grasas y aceites	±	+	±	+	+	+	±	+	±	Nr	+	+	+	Coloración rojo-anaranjado
Taninos	+	+	±	+	±	+	+	+	+	Nr	±	-	+	Coloración negro-azulado/ negro-verdoso
Saponinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Nr	+	+	+	Coloración amarillo-rojo
Lignina	Nr	±	+	Nr	+	+	Nr	+	+	Nr	Nr	±	+	Coloración roja
Aleuronas	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	+	Nr	Nr	Nr	Coloración rojo-anaranjado

Fuente: Datos experimentales

F: Folíolo, P: Peciólulo, Pec: Pecíolo, S: Semilla; +: Positivo, -: Negativo, ±: Levemente positivo Nr: No se realizó

Los metabolitos secundarios alcaloides, saponinas y taninos para proporcionar resultados válidos a la histoquímica realizada necesitaron pruebas presuntivas en tubo de ensayo; la Tabla 2 sintetiza estos resultados y los efectuados al metabolito flavonoides el cual no se determina mediante pruebas histoquímicas sino por los Ensayos de cianidina y leucoantocianina.

Tabla 2. Comparación de las determinaciones cualitativas en tubo de ensayo-pruebas presuntivas / Ensayos de cianidina y leucoantocianina- del material vegetal en estudio

Metabolitos secundarios	Especies de leguminosas												Esperado
	<i>D. robinoides</i>			<i>H. courbaril</i>			<i>P. lunatus</i>			<i>S. occidentalis</i>			
	Partes de la droga vegetal												
	F	P	Pec	F	P	Pec	F	P	Pec	F	P	Pec	
Alcaloides	+	+	+	-	+	±	+	+	+	-	-	-	Formación de precipitado rojo durante 30 min
Taninos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	±	Formación de precipitado azul-verdoso durante 30 min
Saponinas													Coloración azul-verdosa/conservación de espuma durante 30 min
Test de espuma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	
Flavonoides													
Ensayo cianidina	+	-	+	+	±	+	+	-	+	-	-	-	Tonalidad roja en etanol
Flavonoides													
Ensayo leucoantocianina	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Tonalidad rojo-violeta

Fuente: Datos experimentales

F: Folíolo, P: Peciólulo, Pec: Pecíolo; +: Positivo, -: Negativo, ±: Levemente positivo

F. Tamizaje fitoquímico a través de ensayos macro y semimicro

En la Tabla 3 se observan los ensayos presuntivos macro y semimicro realizados a los extractos etanólicos de las drogas vegetales, en los que se evaluaron la formación de precipitados y complejos coloreados en comparación con los tubos testigos de cada determinación. Los ensayos se efectuaron en tubos de ensayo y se realizaron para alcaloides, antraquinonas, flavonoides y taninos. Se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina-CCF- convencional para la caracterización fitoquímica.

Tabla 3. Ensayos presuntivos macro y semimicro de los extractos etanólicos de las drogas vegetales

Metabolitos secundarios		Extractos etanólicos de las drogas vegetales				Esperado
		<i>D. robinoides</i>	<i>H. courbaril</i>	<i>P. lunatus</i>	<i>S. occidentalis</i>	
Alcaloides	Reactivo de Mayer's	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Coloración blanco-crema, formación de precipitado o turbidez al cabo de 2 hrs
	Reactivo de Dragendorff	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Coloración rojo-naranja, formación de precipitado o turbidez al cabo de 2 hrs
	Reactivo de Wagner	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Color marrón, formación de precipitado o turbidez al cabo de 2 hrs
Antraquinonas	Prueba de Bornträger	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Coloración rojo-rosado en fase alcalina
	Flavonas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Coloración amarillo-rojo y/o formación de precipitados
Flavonoides	Flavonoles	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Coloración rojo-magenta y/o formación de precipitados
	Flavononas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Coloración rojo-magenta-violeta-azul y/o formación de precipitados
	Isoflavonas	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Coloración amarilla y/o formación de precipitados
	Isoflavononas, chalconas y auronas	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Sin coloración y formación de precipitados
Taninos	Catecol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Coloración grisáceo-negro y/o formación de precipitados
	Pirogalol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Coloración negro-azulado y/o formación de precipitados

Fuente: Datos experimentales

Se realizó la caracterización fitoquímica por CCF a los extractos etanólicos de las 4 especies de leguminosas en estudio, para determinar la presencia específica de los metabolitos que resultaron positivos en los ensayos macro y semimicro. Se efectuaron comparaciones con algunos estándares de rutina y otros específicos. La Tabla 4 evidencia los estándares corridos que fueron compatibles con dichos extractos.

Tabla 4. Caracterización fitoquímica de los extractos etanólicos de las drogas vegetales por cromatografía en capa fina

Metabolitos secundarios	Características de los estándares			Extractos etanólicos de las drogas vegetales							
				<i>D. robinoides</i>		<i>H. courbaril</i>		<i>P. lunatus</i>		<i>S. occidentalis</i>	
	Estándar	Rf	Color	Rf	Color	Rf	Color	Rf	Color	Rf	Color
Antraquinonas	Antraquinona	0.96	A	0.87	A	0	-	0.96	A	0.86	A
	Antrona	0.96	C	0.97	C	0.96	C	0	-	0.99	C
Aceites volátiles	Cariofileno	0.51	F	0	-	0.53	F	0	-	0	-
	Nerol	0.35	V	0	-	0	-	0	-	0.36	V
Flavonoides	Apigenina	0.97	Vc	0.96	V	0.96	V	0.96	Vc	0.97	V
	Ácido clorogénico	0.58	A	0	-	0.52	A	0	-	0.52	A
Saponinas	Estándar de saponinas	0.94	L	0.92	M	0.92	M	0.92	L	0.91	M
	B-sitosterol	0.90	Vio	0.92	M	0.92	M	0.92	L	0.91	M
	Estigmaesterol	0.90	L	0.92	M	0.92	M	0.92	L	0.91	M

Fuente: Datos experimentales

Rf: Ratio of Front, A: Amarillo, -: No aplica, F: Fucsia, V: Verde, Vc: Verde claro, L: Lila, M: Morado, Vio: Violeta

Así mismo, se corrieron en la cromatoplaça otros estándares específicos los cuales resultaron negativos en los extractos de las leguminosas para los siguientes metabolitos en estudio; para aceites volátiles: 1,8-cineol (Rf: 0.48/ color café), eugenol (Rf: 0.49/ color café oscuro) y mirceno (Rf: 0.93/ color verde); en flavonoides: rutina (Rf: 0.30/ color amarillo) e hiperosido (Rf: 0.71/ color amarillo claro); para saponinas: diosgenina (Rf: 0.90/ color verde claro) y en los alcaloides: atropina (Rf: 0.03/ color naranja) y papaverina (Rf: 0.85/ color naranja).

G. Microscopía analítica cuantitativa

La Tabla 5 muestra las 2 determinaciones cuantitativas realizadas, el índice de estomas y de empalizada, por medio de microscopía. A *D. robinoides* se le realizó únicamente una estimación del índice de estomas ya que estos se encuentran dispuestos entre la epidermis dificultándose el cálculo del mismo. Los cálculos de las 3 especies de leguminosas restantes fueron obtenidos al realizar 10 repeticiones en campos al azar estableciendo rangos con valores mínimos y máximos; además se calcularon valores promedios a partir de las repeticiones.

Tabla 5. Índices de estomas y de empalizada del clorénquima, en las especies de leguminosas en estudio

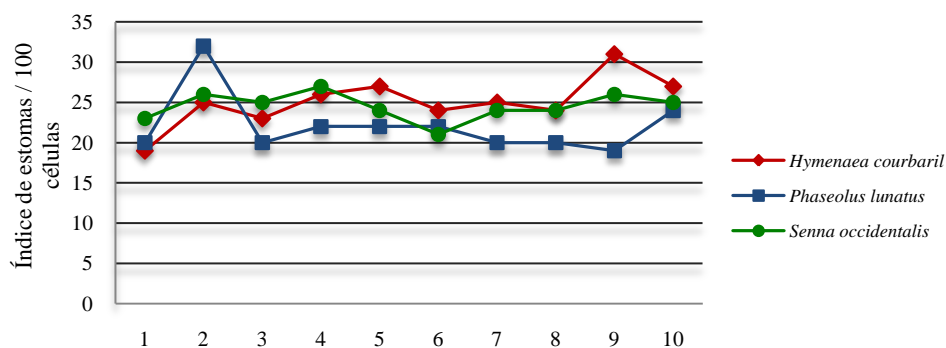
Especies	Índice de estomas		Índice de empalizada	
	Rango*	Valor promedio	Rango*	Valor promedio
<i>D. robinoides</i>	16.00	16.00	NR	NR
<i>H. courbaril</i>	19.00 – 31.00	25.10	4.5 – 5.5	5.00
<i>P. lunatus</i>	19.00 – 32.00	22.10	8.0 – 12.5	10.00
<i>S. occidentalis</i>	21.00 – 27.00	24.5	6.0 – 7.25	7.00

Fuente: Datos experimentales

* Rango máximo y mínimo; obtenido al realizar 10 repeticiones del índice de estomas o empalizada del clorénquima en diferentes posiciones del folíolo. NR: No se realizó.

En la Gráfica 1 se representan mediante puntos las repeticiones realizadas para obtener el promedio del índice de estomas de las 3 especies de leguminosas, de acuerdo a las observaciones microscópicas realizadas en diferentes posiciones de la epidermis del folíolo. Se excluye a *D. robinoides* pues solo posee un valor para su comparación.

Gráfica 1: Índice estomático de 3 especies de leguminosas en estudio



Fuente: Datos experimentales

H. Determinación de humedad y cenizas totales de las 4 leguminosas en estudio

Como se muestra en la Tabla 6, aunque no siendo característico de las especies en estudio, se determinó mediante 4 repeticiones el porcentaje de humedad del material vegetal a modo de preparar la muestra para su análisis químico. Así mismo, se obtuvieron los promedios. El contenido de agua libre ha de ser menor al 10% según lo establecido por la Organización mundial de la salud.

Tabla 6. Porcentaje de humedad de las muestras estudiadas

Especies	Repeticiones (%)				Promedio (%)
	1	2	3	4	
<i>D. robinoides</i>	9.46	8.75	8.25	9.46	8.98
<i>H. courbaril</i>	7.08	6.82	6.80	6.81	6.88
<i>P. lunatus</i>	11.55	9.44	9.40	9.30	9.92
<i>S. occidentalis</i>	6.26	6.33	6.40	7.29	6.56

Fuente: Datos experimentales

Se obtuvieron los residuos que deja la combustión de los materiales vegetales conocidos como cenizas totales y se expresaron porcentualmente. Según indica la Tabla 7 para su determinación se realizaron 4 repeticiones de cada una de las especies de leguminosas en estudio, obteniendo el rango mínimo, máximo y el promedio.

Tabla 7. Porcentaje de cenizas totales del material vegetal en estudio

Especies	Repeticiones				Promedio %CT	Rango mínimo-máximo (%)
	1	2	3	4		
	%CT	%CT	%CT	%CT		
<i>D. robinoides</i>	9.33	9.61	9.54	9.54	9.50	9.33 - 9.54
<i>H. courbaril</i>	3.74	3.84	3.81	3.08	3.62	3.08 - 3.84
<i>P. lunatus</i>	11.25	10.58	10.99	10.80	10.90	10.58 - 11.25
<i>S. occidentalis</i>	10.06	10.19	10.21	10.29	10.19	10.06 - 10.29

Fuente: Datos experimentales

%CT: Porcentaje de cenizas totales, %: Porcentaje

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El control de calidad del material vegetal, constituye un conjunto de técnicas necesarias para estandarizar las características y propiedades esenciales de los productos naturales que determinan las especificaciones requeridas para cumplir potencialmente con los propósitos para los cuales se destina (1).

Debido a estos requerimientos y a que las especies de leguminosas del tipo nativas *D. robinoides*, *H. courbaril*, *P. lunatus* y *S. occidentalis* poseen actividad antifúngica comprobada y son utilizadas para acciones terapéuticas en afecciones dermatomucosas y mucocutáneas causadas por hongos principalmente *F. pedrosoi* y *S. schenckii* contra la fase miceliar; este estudio se centró primordialmente en la identificación botánica y control de calidad de las especies con el objetivo de contribuir al estudio biológico y fitoquímico que evidencia la presencia de metabolitos secundarios que permiten a las mismas tener su actividad antifúngica.

Así mismo, la información recopilada servirá como referencia teórica para la elaboración de monografías de control de calidad relacionadas con los parámetros de identidad y pureza. A su vez estandarizarlos a modo de establecer si la droga vegetal distribuida comercialmente es un material de calidad que puede ser utilizado como materia prima para la elaboración de fitofármacos en la industria fitofarmacéutica, por sus acciones terapéuticas antifúngicas.

Varios autores han reconocido la importancia de las estructuras de la epidermis foliar como caracteres anatómicos importantes para la separación de especies; Lapp en el 2004 en su estudio realizado concluyó que los caracteres anatómicos más importantes para la separación de las especies son: ubicación de los estomas, tipos de tricomas, tipo y disposición de los haces vasculares, presencia de cavidades secretoras en el haz vascular y en la vena principal (50).

Para su estudio la droga vegetal de las 4 especies de leguminosas fue fragmentada evaluando las características individuales del folíolo, peciólulo y pecíolo, a modo de

describir sus componentes, encontrar diferencias e identificar la presencia de metabolitos secundarios en los diferentes tejidos que las constituyen. Según estudios anteriormente realizados por Suárez en el 2008 las semillas de *P. lunatus* posee actividad antifúngica, por tanto se evaluaron sus características microscópicas y fitoquímicas.

Se analizaron las características micromorfológicas e histológicas más importantes que permitieron diferenciar a las 4 especies, especialmente cuando la droga vegetal de estas se encuentra fragmentada:

a) Folíolos: Los datos que se obtuvieron demuestran que existe similitud entre los individuos que conformaron la muestra del estudio pero existen algunas variantes que permiten la diferenciación haciéndolas características de cada especie tales como: El ápice es distinto para todas las especies siendo agudo en *D. robinoides*, cordado para *H. courbaril* y deltoide para las otras 2; el margen es dentado con tricomas estrigosos en el borde de *S. occidentalis*; la forma de los haces vasculares, siendo colateral cerrada para 3 especies y bicolateral para *H. courbaril*. El xilema es del tipo laxa para *D. robinoides*, doble helicada para *H. courbaril* y las otras 2 especies restantes poseen los 2 tipos de xilema; se observaron placas perforadas simples del xilema en el disociado de *H. courbaril* y *P. lunatus*; en esta última especie se observaron vasos del xilema con puntuaciones escalariformes (51, 52).

El parénquima en empalizada suele estar conformado por 1-3 capas, mientras que el esponjoso por 3-8 capas siendo este último de forma rectangular para *S. occidentalis*. En *D. robinoides* se observó clorénquima lagunar. El hábitat natural de *D. robinoides* e *H. courbaril* suele ser de seco a húmedo lo que explica que ambos parénquimas sean más abundantes que en las otras 2 especies ya que al encontrarse en bosques húmedos necesitan que la mayor porción de sus tejidos realicen fotosíntesis captando la poca energía solar convirtiéndola en energía química estable para el alimento de las plantas mientras que el esponjoso se especializa en el intercambio gaseoso. Las leguminosas *P. lunatus* y *S. occidentalis* poseen menor número de capas en ambos parénquimas sin embargo el parénquima esponjoso se presenta en mayor cantidad respecto al número de capas que lo conforman; dicha diferencia se explica en que las plantas se desarrollan en climas de

templado a cálido por lo que el proceso de fotosíntesis se desarrolla con regularidad haciéndose necesarias unas pocas capas de empalizada y a modo de disminuir la posibilidad de asfixia por exceso de agua, en caso se encuentren con ambientes húmedos, el parénquima esponjoso se torna abundante. Por otra parte en el parénquima en empalizada y esponjoso de *S. occidentalis* encontraron pigmentos antociánicos fucsia lo que posiblemente refleje un mecanismo natural contra la radiación solar, este hecho se explica en que el lugar en donde estaba sembrada la planta es un sitio cálido y se encontraba en exposición directa al sol (51, 53).

En *P. lunatus* no se observaron haces vasculares transcurrentes a lo largo de su lámina foliar, para *D. robinoides* estos son de forma cilíndrica rodeados de esclerénquima mientras que en las otras 2 especies restantes están dispuestos verticalmente rodeados de parénquima (51, 54).

Los aparatos estomáticos, encargados de regular la transpiración y el intercambio gaseoso- principalmente CO₂ del exterior al interior de la planta-; de todas las especies están dispuestos en forma paralela, horizontal y diagonal, en 2 de las especies son diacíticos mientras que en *P. lunatus* son paracíticos con una o más células subsidiarias en cada lado de las células oclusivas; y en *D. robinoides* son anomocíticos y anisocíticos con cloroplastos en sus células oclusivas, con 2-5 células subsidiarias y tienen la particularidad de presentarse hundidos en la cutícula de la epidermis abaxial. En el caso de *S. occidentalis* el folíolo se considera anfiestomático ya que presentó aparatos estomáticos en la cara adaxial y abaxial. El índice de estomas por su contenido de aparatos estomáticos en forma ascendente se mencionan: *D. robinoides*, *P. lunatus*, *S. occidentalis* e *H. courbaril*; considerando poseer buen un intercambio gaseoso intracelular y extracelular. Es imprescindible tomar en cuenta que el índice estomático, resulta fácilmente modificable según las condiciones ambientales en las que se desarrollan las plantas (55, 56).

Se cálculo el índice de empalizada del clorénquima, por su contenido en forma ascendente se pueden mencionar: *H. courbaril*, *S. occidentalis* y *P. lunatus*; a diferencia del resto en esta última las células del clorénquima son más abundantes, grandes y redondeadas lo que le permite mayor fijación de carbono (51).

El colénquima de *H. courbaril* es del tipo lagunar mientras que en las otras 3 plantas es del tipo anular. El colénquima de la nervadura central de *P. lunatus* tiene una característica distintiva del resto de los folíolos ya que forma una protuberancia hacia la epidermis adaxial y en *S. occidentalis* posee pigmentos antociánicos fucsia. Se evidenció la presencia de cutícula tanto en la epidermis adaxial y abaxial de *H. courbaril*, lo que le confiere un brillo característico en su observación macroscópica. En la epidermis adaxial de *S. occidentalis* se evidenciaron glándulas capitadas cuya función suele ser secretar sustancias intracelularmente. Se observaron en *P. lunatus* células acumuladoras de sales conocidas como de la hipodermis o corcho. Las braquiesclereidas se observaron en 3 de las especies a excepción de *H. courbaril* mientras que solo en *P. lunatus* se detectaron fibrotraqueidas; se evidenciaron fibras xílicas en *D. robinioides*, además de septadas con incrustaciones de cristales de oxalato de calcio; esta última también en *H. courbaril* mientras que *S. occidentalis* posee otros tipos de fibras con forma alargada (51, 53, 55).

Para todas las especies se evidenciaron en su mayoría diferentes tipos de oxalatos de calcio, este es el biomineral más común en las plantas superiores encontrándose acumulados en el interior de las células como producto de procesos intercelulares; tienen como principal función eliminar el calcio de las plantas logrando la regulación de la acidez; se acumulan en el interior de las células como producto de procesos intercelulares convirtiéndose en un sistema de defensa ya que cuando los herbívoros mastican los folíolos producen pequeñas incisiones en las que la planta coloca el ácido provocando graves irritaciones en las mucosas; además le confiere a la planta aspereza provocando quemaduras sobre los depredadores (51, 57). Solo para *S. occidentalis* se evidenciaron cristales de oxalato de calcio en forma de drusas.

Se observaron gránulos de almidón en *D. robinioides* y *P. lunatus*, además esta última leguminosa presentó plástidos del tipo cromoplasto globuloso con pigmentos carotenoides posiblemente de carotina por la presencia de gránulos de color amarillo y anaranjado (57).

Los tricomas glandulares tienen la función de elaborar sustancias alojadas entre la pared externa de la célula y la cutícula para ser secretas al exterior, estos junto con los de superficie tienen el objetivo de dar protección contra insectos depredadores. Los

incrustados sobre la epidermis son distintos para todas las especies encontrándose en *D. robinoides* pluricelulares monoliformes llamados así por presentar constricciones entre células a modo de rosario con bases de 6-8 células; en *P. lunatus* abundantes uncinados que contribuyen a la protección y glandulares brevifurcados especializados en secretar sustancias inclusive metabolitos que contribuyen a dar protección a la planta contra hongos y microorganismos; y en *S. occidentalis* glandulares multicelulares y unicelulares. Además en el disociado de *D. robinoides* se observaron tricelulares y tectores simples unicelulares, estos últimos también en *H. courbaril* confiriéndole protección a las plantas contra agresiones mecánicas; así mismo, en *H. courbaril* glandulares bicelulares que eliminan compuestos pegajosos que atrapan a los insectos o sustancias tóxicas matando o modificando su comportamiento. Para *P. lunatus* glandulares brevifurcados con bases de 10 células y unicelulares lineales con base de 6 células, ubicados sobre el ápice y la nervadura central, con incrustaciones de cristales arenosos de oxalato de calcio y gránulos de reserva; posiblemente contenga metabolitos secundarios; y en *S. occidentalis* glandulares multicelulares, abundantes estrigosos y tectores de cobertura que brindan protección. Los tricomas son estructuras bastante útiles para la identificación de las especies, sin embargo se debe tener en cuenta que características como la proporción, tamaño y longitud de los tricomas son propensas a cambiar con las condiciones ambientales (52, 56).

b) Peciólulos y pecíolos: Las principales variantes encontradas en las 4 especies de leguminosas son las siguientes, las formas de los haces vasculares denotan notables diferencias ya que en el peciólulo de *H. courbaril*, *S. occidentalis* y *P. lunatus* son de forma perifloemática; en esta último se observó la misma forma en su pecíolo; mientras que el pecíolo de *S. occidentalis* y *D. robinoides* el haz vascular es de forma colateral cerrada; además en *D. robinoides* se evidenció la misma morfología en su peciólulo a diferencia de *H. courbaril* en el que se presentó con forma colateral abierta. El número de haces vasculares varía en todas las especies encontrándose alrededor de 2-7. El peciólulo y pecíolo poseen xilema de tipo helicoidal laxa en *D. robinoides* mientras que en *H. courbaril* xilema laxa y doble helicada y en las otras 2 especies restantes el xilema es de tipo laxa y anular. Respecto al floema se evidenciaron tubos cribosos en el disociado del pecíolo de *D. robinoides* y vasos del floema en el peciólulo y pecíolo de *P. lunatus*. Se presentaron vasos perforados en el peciólulo y pecíolo de *D. robinoides* (51, 52).

Por su diferenciación el colénquima del peciólulo y pecíolo de 3 especies se evidenció del tipo anular mientras que el de *H. courbaril* lagunar, extenso y se observó la presencia de canales resiníferos. El parénquima medular del peciólulo y pecíolo de *D. robinoides* se hallaron canales secretores. Se observó abundante parénquima medular en el pecíolo de *H. courbaril*, *P. lunatus* y *S. occidentalis* (51, 53, 55).

El tejido de esclerénquima del pecíolo correspondiente a las 4 especies de leguminosas le confiere al folíolo sostén, mayor dureza y resistencia mecánica; algunas veces le otorga resistencia contra los depredadores al momento en que estos introducen sus órganos bucales sobre la superficie del folíolo. Se presentaron diferencias en las células esclerenquimáticas, se observaron esclereidas en la epidermis del pecíolo de *D. robinoides*; las braquiesclereidas se evidenciaron en el disociado del peciólulo y pecíolo de las 3 especies a excepción de *S. occidentalis*; de igual forma las fibroesclereidas tanto del peciólulo y pecíolo se encontraron en 3 especies excluyendo a *H. courbaril*; las macroesclereidas del peciólulo y pecíolo de *P. lunatus* y *S. occidentalis* son de formas alargadas y puntiagudas mientras que las de *D. robinoides* se encuentran agrupadas en el pecíolo y en forma de bastón en el peciólulo. Así mismo en el pecíolo de *D. robinoides* se observaron otros tipos de fibras septadas y fibrotraqueidas (53).

En el disociado del peciólulo y pecíolo la epidermis de 3 leguminosas posee células grandes, irregulares y poligonales muy unidas entre sí a diferencia de *S. occidentalis* en las que sus células son rectangulares. En la epidermis del peciólulo de *D. robinoides* se hallaron gránulos de reserva y en el pecíolo estomas anomocíticos y diacíticos. En el peciólulo y pecíolo de *H. courbaril* se observaron células de la hipodermis o de corcho (51, 53).

Respecto a los cristales de oxalato de calcio se observaron distintos tipos, en el pecíolo de *D. robinoides* del tipo estiloides con ubicación lineal y en el esclerénquima de este del tipo solitarios. Se observaron los mismos tanto en el peciólulo y pecíolo de *H. courbaril* y *P. lunatus*, en la primera especie son del tipo arena y en la segunda del tipo solitarios y estiloides (51, 57).

No se observaron tricomas en el peciólulo y pecíolo de *H. courbaril*, en el resto de las especies se observaron diferentes tricomas incrustados sobre la epidermis teniendo el peciólulo y pecíolo de *D. robinoides* unicelulares lineales y únicamente el pecíolo mostró pluricelulares de aspecto glanduloso; para *P. lunatus* la epidermis del peciólulo evidenció tricomas protectores mientras que el pecíolo presentó glandulares brevifurcados con base de 10 células en disposición radial, uncinados de revestimiento y glandulares secretores; y para *S. occidentalis* la epidermis del peciólulo mostró tricomas de aspecto glanduloso a diferencia del pecíolo que presentó uncinados de revestimiento. Además en el disociado se observaron otros tipos de tricomas, teniendo el peciólulo y pecíolo de *D. robinoides* multicelulares; el peciólulo y pecíolo de *P. lunatus* tricomas unicelulares lineales con base de 7 células, y en *S. occidentalis* glandulares secretores unicelulares y uncinados en el peciólulo y pecíolo.

c) Semilla de *P. lunatus*: En su corte transversal se observó el embrión, en el disociado se evidenciaron células del parénquima de forma irregular unidas entre sí por medio de sus extremos; se presentaron fibroesclereidas isodiamétricas alargadas como parte del tejido esclerenquimático y además se observaron otras fibras alargadas con extremos ahusados y paredes secundarias. Se observaron tricomas uncinados y plástidos sin pigmentos denominados leucoplastos del tipo amiloplasto en forma ovalada con deposiciones en capas alrededor de un punto que reservan almidón en forma de gránulos contribuyendo al crecimiento de esta leguminosa en su hábitat natural (51, 53, 55).

Los metabolitos secundarios encontrados en las partes fraccionadas de las drogas vegetales para las 4 especies de leguminosas en estudio fueron los siguientes:

La reacción histoquímica de mucílagos fue positiva para todas las especies, este metabolito tiene la característica de formar soluciones coloidales conformadas por fibras solubles que tienden a hincharse con el agua. En la planta contribuye a la absorción del agua y al encontrarse en abundancia fluye hacia el exterior formando por desecación gomas que sirven de protección contra depredadores y microorganismos. Además por sus propiedades emolientes hidratan y protegen la piel aliviando muchas afecciones como heridas y dermatitis producidas por hongos (58).

La presencia de grasas y aceites volátiles confieren a la planta características odoríficas que le sirven para repeler insectos o depredadores, por esta característica se encuentra primordialmente en la epidermis y cuando se encuentran en abundante cantidad sirven de protección ya que el veneno que producen tiene propiedades bactericidas y fungicidas (58, 59). La histoquímica para *H. courbaril* y *S. occidentalis* resultó positiva mientras que para *D. robinoides* y *P. lunatus* se observó levemente positiva. Los aceites volátiles detectados en la cromatografía en capa fina por la correlación existente entre los Ratio of Front –Rf- y el color de las manchas fueron cariofileno en *H. courbaril* y nerol para *S. occidentalis*, por lo tanto hay presencia de estos en las 2 plantas. Los Rf de las manchas encontradas en la cromatopla de *D. robinoides* y *P. lunatus* no fueron compatibles con ninguno de los estándares por lo tanto se concluyó que las mismas poseen otros tipos de aceites, esta afirmación se apoya con la literatura pues en la composición química de las 4 leguminosas se expresa la existencia de aceites.

Las pruebas histoquímicas de alcaloides se mostraron positivas en *D. robinoides* y *P. lunatus* mientras que en *H. courbaril* se mostró levemente positiva y para *S. occidentalis* negativa; dichos resultados correlacionan con las determinaciones cualitativas realizadas. Así mismo, los ensayos presuntivos macro y semimicro de la cromatografía en capa fina realizados a los extractos etanólicos de las drogas vegetales resultaron iguales confirmando la presencia o ausencia; sin embargo los Rf de los estándares atropina y papaverina no son similares con los encontrados en las leguminosas *D. robinoides*, *P. lunatus* e *H. courbaril*, la explicación más congruente es debido a que los mismos presentan otros tipos de alcaloides ya que en la cromatopla se evidenciaron otras manchas. En lo que respecta a *S. occidentalis* la ausencia de reacción en todas las pruebas es compatible con la literatura ya que en su composición química no se hace referencia sobre la presencia de estos lo que a su vez demuestra que la hoja no es muy tóxica. En las plantas los alcaloides contribuyen a la protección debido a que son venenos vegetales muy activos que bloquean los neuroreceptores en los insectos y depredadores, además producen efectos inhibitorios en el crecimiento de microorganismos patógenos porque se intercalan con el ADN del microorganismo evitando la síntesis de proteínas, induciendo apoptosis e inhibiendo las enzima del metabolismo de carbohidratos por lo que se ha considerado su utilización en pequeñas dosis en los productos fitofarmacéuticos (58, 59).

Tanto la histoquímica como la determinación cualitativa de taninos resultó positiva para *D. robinoides*, *H. courbaril* y *P. lunatus* a diferencia de *S. occidentalis* en el que se evidenció una reacción levemente positiva; al comparar dichos resultados con los ensayos presuntivos macro y semimicro de los extractos etanólicos de las 4 drogas vegetales en los cuales se denotó discrepancia entre ambos resultados; posiblemente este efecto es debido a que los taninos son más polares al agua, pero como los extractos empleados para las leguminosas se encontraban con etanol al 95%, en este medio los taninos no son factibles pues se tornan apolares y por ende no se evidenciaron reacciones positivas aunque el extracto de la planta lo contenga; por lo tanto si se quiere probar medicinalmente se deben extraer con etanol al 50% que contiene partes iguales de agua y alcohol y comprobar mediante cromatografía en capa fina si existen taninos. La literatura reporta taninos en *D. robinoides* e *H. courbaril* por lo que se concluye que estas 2 especies contienen taninos, para *P. lunatus* y *S. occidentalis* según las pruebas histoquímicas y las determinaciones cualitativas en sus composiciones químicas existen taninos. Los taninos se encuentran en las leguminosas en sus formas hidrolizables produciendo efectos repelentes y tóxicos al desnaturalizar las proteínas de los hongos y otros microorganismos (58, 60).

Las saponinas poseen propiedades tensoactivas produciendo espumas en soluciones acuosas, en el organismo vegetal presentan las propiedades insecticidas y fitoprotectoras contra el ataque de microorganismos y herbívoros (59). La histoquímica realizada a las 4 leguminosas reveló reacciones positivas para saponinas, el test de espuma fue compatible con la histoquímica en 3 de las plantas vegetales difiriendo para *S. occidentalis* ya que aunque hubo cambio de coloración no se conservó la espuma en los 30 minutos requeridos considerándose la reacción levemente positiva, la explicación más próxima de dicho fenómeno es dada en que la prueba de espuma es presuntiva y sobre ella interfieren la presencia de metabolitos diferentes al de interés y otros compuestos que provocan que la cantidad de espuma sea inestable; sin embargo en la cromatoplaqueta los colores de las manchas y los Rf de los 4 extractos etanólicos de las especies en estudio fueron compatibles con 3 estándares: estándar de saponinas, β -sitosterol y estigmasterol; por lo que se concluye que todas las especies poseen saponinas.

Para la determinación de flavonoides, los ensayos presuntivos de cianidina fueron negativos para *S. occidentalis* a diferencia de las otras 3 especies en las que se observó positiva; mientras que el ensayo de leucoantocianina fue negativa para *D. robinoides* y *P. lunatus*, positiva para *S. occidentalis* y levemente positiva para *H. courbaril*. Se realizaron ensayos macro y semimicro a los 4 extractos etanólicos encontrándose para todos la presencia de isoflavonas, isoflavononas, chalconas y auronas. En la cromatoplaca se evidenció apigenina ya que el color de las manchas y los Rf son similares con los encontrados en los 4 extractos de la droga vegetal; mientras que las mismas características del estándar ácido clorogénico son compatibles con las de *H. courbaril* y *S. occidentalis*. Los resultados son congruentes con la literatura ya que 3 leguminosas a excepción de *P. lunatus* refieren la presencia de flavonoides en su composición química. La importancia de estos se centra en que brindan defensa a la planta ya que la protegen de agentes oxidantes y la polución ambiental respondiendo ante el estrés microambiental (59).

Se realizó la prueba de Borntäger para la detección presuntiva de antraquinonas encontrándose positiva en el extracto etanólico de *S. occidentalis* mientras que en el resto de extractos de las especies vegetales fue negativa sin embargo al realizar la cromatografía en capa fina con los estándares antraquinona y antrona todas las plantas resultaron positivas para alguno o los 2 estándares por lo que se presume que las concentraciones de estos metabolitos en *D. robinoides*, *H. courbaril* y *P. lunatus* es menor a la concentración mínima detectable por la prueba de Borntäger. Cabe mencionarse que la coloración de las manchas presentadas en las cromatografías de *D. robinoides* y *S. occidentalis* fueron compatibles con la del estándar antraquinona pero no así con su Rf sin embargo eran próximos, dicha alteración es posiblemente dada por interferencias de otras moléculas que no permitieron que las antraquinonas presentes en los 2 extractos vegetales corrieran libremente sobre la cromatoplaca. La literatura de *P. lunatus* no indica la presencia de antraquinonas en su composición química pero si existe para las otras 3 especies, por lo que debido a las características encontradas en el estudio fitoquímico se concluye la existencia de antraquinonas en las 4 leguminosas. Las antraquinonas le confieren a las plantas propiedades irritantes por lo que son ampliamente utilizadas para combatir psoriasis (58, 59).

Se evaluaron 2 constituyentes inertes: la lignina y las aleuronas. La lignina es el constituyente de las paredes que imparte rigidez al peciólulo y pecíolo ya que es acompañante de la celulosa, la presencia de este permite tener hojas más fuertes y resistentes tanto al ataque de las sustancias químicas como a la acción de los organismos. Los tejidos del peciólulo de *D. robinoides* y *S. occidentalis* presentaron una reacción levemente positiva lo que se explica por su inmadurez y correlaciona con la observación macroscópica ya que al tacto estos son blandos y no tan rígidos como en las otras 2 especies (57).

Solamente a la semilla de *P. lunatus* se le realizó la prueba de aleuronas, encontrando cristaloides de estas los cuales constituyen gránulos de proteínas, de reserva alimenticia que el embrión de la semilla utiliza durante la germinación; las aleuronas forman una capa en la semilla que sirve como barrera y resistencia mecánica contra la entrada de microorganismos y tienen una función secretora de enzimas (53, 55).

Las características de pureza se encuentran constituídas en los parámetros de humedad y cenizas totales. Referente al porcentaje de humedad el método de secado es un aspecto fundamental dentro de los estudios farmacognósticos encaminados a establecer la calidad de una droga; el secado del material vegetal elimina suficiente cantidad de agua para conservar la droga y prevenir el enmohecimiento, la acción de las enzimas y de las bacterias, que influyen sobre el deterioro de la misma. Además favorece la conservación y facilita la trituración y la molienda, obteniéndose una forma conveniente para la comercialización, disminuyendo el volumen y peso total del material (61, 62).

Es por ello que el límite en el contenido de agua debe ser determinado para las drogas vegetales, especialmente para aquellas que absorben fácilmente la humedad o en las cuales el deterioro puede ser promovido por la presencia de la misma. El límite de agua establecido por la Organización Mundial de la Salud debe ser menor al 10%, el porcentaje de humedad encontrado para las 4 leguminosas varió entre especies pero todas se encontraron dentro del rango (61, 62).

Otro índice numérico de interés para el análisis de calidad de una droga vegetal es el valor correspondiente a las cenizas totales, el cual da un rango de la mayor o menor cantidad de componentes inorgánicos. Los porcentajes de cenizas encontrados para las 4 leguminosas fue variable lo que podría utilizarse como indicador de calidad y diferenciación entre estas especies, sin embargo es importante recalcar que los valores suelen ser inconstantes e incluso pueden tener una gran variabilidad en el propio material vegetal según la época del año en que se recolecto y las propiedades químicas del suelo en donde son cultivadas; pero si se conoce la locación en la que se encuentran este porcentaje es útil para evidenciar la posible adulteración proveniente de la adición de otras materias inorgánicas o trazas de fertilizantes (61, 62).

X. CONCLUSIONES

1. Este estudio permitió reunir la información necesaria para la elaboración de propuestas de normas de calidad farmacobotánica de 4 especies de leguminosas con actividad antifúngica comprobada, las cuales servirán como referencia teórica en futuros estudios o inclusive en el control de calidad de la droga vegetal para la elaboración de productos fitofarmacéuticos.
2. Por medio de técnicas histológicas e histoquímicas se lograron establecer las características micromorfológicas que permitieron la diferenciación entre las especies en estudio.
3. La presencia de abundantes cristales de oxalato de calcio en sus diversas formas en cada una de las especies, sugiere una forma de distinción entre estas; además demuestra la capacidad tóxica y nociva como defensa contra microorganismos depredadores.
4. La variación en el número de capas de tejido de parénquima en empalizada y esponjoso de las leguminosas sugiere un hallazgo distintivo, indicando a su vez gran capacidad de fotosíntesis e intercambio gaseoso.
5. La diversidad de tricomas observados para las leguminosas propone un parámetro de distinción e identidad de las especies estudiadas, sin embargo la proporción, tamaño y longitud de los mismos suelen cambiar según las condiciones ambientales.
6. El índice de estomas por su contenido ascendente de aparatos estomáticos se mencionan: *D. robinoides*, *P. lunatus*, *S. occidentalis*, e *H. courbaril*. Este puede ser modificable según las condiciones ambientales.
7. El índice de empalizada por su contenido ascendente de células del clorénquima se mencionan: *H. courbaril*, *S. occidentalis* y *P. lunatus*.

8. Las 4 leguminosas presentaron en su composición química todos o algunos de los siguientes metabolitos secundarios: mucílagos, alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides, grasas y aceites.
9. Mediante cromatografía en capa fina se detectaron los siguientes metabolitos secundarios: las saponinas β -sitosterol y estigmasterol en las 4 especies de leguminosas; los aceites volátiles cariofileno y nerol fueron evidenciados solamente en *S. occidentalis* e *H. courbaril*; los flavonoides apigenina y ácido clorogénico, el primero en todas las especies de leguminosas y el segundo en *S. occidentalis* e *H. courbaril*; además antronas y antraquinonas en todas leguminosas en estudio.
10. La humedad es un parámetro no característico de las especies en estudio sin embargo su determinación se hace importante para preparar la muestra que es usada en el análisis químico y a modo de evitar el proceso de enmohecimiento durante el almacenamiento.
11. Los porcentajes de cenizas para las 4 leguminosas fueron variables lo que sugiere su uso como indicador de diferenciación entre las especies.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar a las leguminosas pruebas de bioactividad referentes a sus usos folclóricos medicinales de acuerdo a los grupos de metabolitos secundarios encontrados.
2. Debido a que la ontogenia juega un papel importante en la naturaleza de los constituyentes activos, es de esperar que la concentración de metabolitos secundarios se incremente con la edad de la planta. Además hace variar el número de haces vasculares, y tricomas, por tanto es importante tomar en cuenta para próximos muestreos el estadio fenológico.
3. Los factores ambientales también pueden afectar los constituyentes secundarios, el porcentaje de cenizas, el índice de estomas, y los tricomas; por lo que se recomienda realizar análisis de clima, suelo, flora asociada y métodos de cultivo.
4. Algunos tipos de plantas presentan cierta analogía en las estructuras de los metabolitos secundarios aislados con su composición genética y en consecuencia existe una gran probabilidad que algunos genes que codifican dichos metabolitos se mantengan; por lo que sería conveniente realizar estudios de screening genómico que apoyen la presencia de metabolitos secundarios compatibles entre las especies estudiadas.
5. Realizar estudios de espectrofotometría de masas que proporcionen una estimación cuantitativa de los metabolitos secundarios encontrados.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arauz, M. Control de calidad de productos elaborados a partir de plantas medicinales. Universidad de Occidente. Nicaragua. 2006. 17 pp.
2. Carrillo, M. Procesamiento de plantas medicinales. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. Perú. 2003. 25 pp.
3. Paredes, M. Determinación de algunos estándares de identidad y pureza de cuatro plantas medicinales comercializadas en Guatemala. Maestría multidisciplinaria en producción y uso de plantas medicinales –MUPLAM-. Universidad de San Carlos. Guatemala. 2005. 12 pp.
4. Palma, M. La calidad de los productos medicinales de origen natural. Universidad de Occidente. Nicaragua. 2004. 8 pp.
5. Lachica, M. *et al.* Análisis y control de calidad foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental Zaidín. Anales de Edafología y Agrobiología. Universidad de Almería. España. 2003. 32 pp.
6. Gaedcke, F. *et al.* Herbal medicinal products. Scientific and regulatory basis for development, quality assurance and marketing authorization. Medpharm. Alemania. 2003. 177 pp.
7. Cerón, L. *et al.* Manual Fitoterapéutico. Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas-DIGIMED-. Guatemala. 399-403 pp.
8. Girón, L. *et al.* Control de calidad y sanitario en muestras de plantas medicinales distribuidas en la ciudad de Guatemala. Simposio sobre Biología de Salud Tropical. Centro Mesoamericano de Estudios sobre Tecnología apropiada-CEMAT-. Guatemala. 1986. 3-11 pp.
9. Bela, A. *et al.* Control de calidad de materias primas vegetales para fines farmacéuticos: “manzanilla” *Matricaria recutita* L. Universidad Nacional del Chaco Austral. Argentina. 2000. 2-4 pp.
10. Trueba, Y. *et al.* Evaluación de la actividad antioxidante de *Justicia pectoralis* Jacq “Tilo”. Centro de Investigación y Desarrollo de fitofármacos. Revista Cubana de Investigación y Biomedicina. Cuba. 2001; 20 (1):930. 3 pp.

11. Valera, B. *et al.* Análisis micrográfico de dos hemiparásitarias argentinas usadas en medicina popular y su aplicación en el control de calidad. Trabajo de tesis. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Argentina. 2002; 45-52 pp.
12. Pérez, Y. *et al.* Caracterización y estudio fitoquímico de *Cassia alata*. Revista Cubana Plantas Medicinales 2005; 10 (2):720, 2-4 pp.
13. Rodríguez, F. Caracterización de extractos farmacéuticos de cuatro árboles de uso medicinal en Guatemala. Trabajo de Tesis. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos. Guatemala. 2005. 4-7 pp.
14. Peña, B. *et al.* Estandarización y tamizaje fitoquímico de extractos de frutos de *Punica granatum* L., comercializados en Cuba. Laboratorio Central de Farmacología. Facultad de Ciencias Médicas Dr. Rafael Allende. Cuba. 2008. 8 pp.
15. Cáceres, A. Actividad antimicrobiana de plantas de uso medicinal en Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos. Centro Mesoamericano de Estudios sobre Tecnología apropiada-CEMAT-. Guatemala. 1991. 5-6 pp.
16. García, S. Demostración de la actividad de Guachipilín contra microorganismos causantes de infecciones dérmicas. Trabajo de tesis. Facultad de Medicina. Universidad Francisco Marroquín. Guatemala. 1993. 17-28, 58 pp.
17. Suárez, A. Evaluación de la actividad contra *Fonsecaea pedrosoi* de siete especies de leguminosas popularmente usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones mucocutáneas. Trabajo de tesis. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos. Guatemala. 2008. 1-3 pp.
18. García, A. Inhibición del hongo *Sporothrix schenckii* por especies de leguminosas popularmente usadas en Guatemala para el tratamiento de micosis. Trabajo de tesis. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos. Guatemala. 2009. 2- 4 pp.
19. Bertrand, H. *et al.* Control de calidad . Ediciones Díaz Santos, S.A. Segunda edición. España.1990. 12 pp.
20. Farmacopea Europea. Sustancias químicas y preparados biológicos de referencia. Quinta edición. Europa.2006. 80-98 pp.
21. Solis, P. *et al.* Manual de caracterización y análisis de drogas vegetales y productos fitoterapéuticos. Proyecto desarrollo de Tecnología de Cultivo de Plantas

- Medicinales y Producción de Fitoterápicos. OEA/AICD/AE 089/03. Guatemala. 45 pp.
22. Cáceres, A. Control de calidad de drogas vegetales. Laboratorio fitofarmacéutico-Farmaya-. Universidad de San Carlos. Guatemala. 1993.1-7 pp.
 23. Arias, T. *et al.* Glosario de medicamentos: desarrollo, evaluación y uso. Organización Panamericana de la Salud. Washington. 1999. 312 pp.
 24. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. WHO. Suiza.1998. 10, 25, 26 pp.
 25. Vasisht K. Standarization of herbal medicine. Doc. Tec. Production and Quality Evaluation of Medicinal and Aromatic Plants. Guatemala. 2001. 3-4 pp.
 26. Goodwin, T. Chemistry and biochemistry of plant pigments. Academic Press, Inc. V:2. United States of America.1976. 166-205 pp.
 27. Dominguez, X. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa, S.A. México. 1973. 35 pp.
 28. Kalra, Y.P. Handbook of reference methods for plant analysis. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press. United States of America. 1998. 53 pp.
 29. Núñez, E. *Plantas medicinales de Costa Rica y su folklore*. Editorial Universidad de Costa Rica. 1986. 98 pp.
 30. Pérez, C. Guía dendroenergetica: *Diphysa robinoides* Benth. (Guachipilín). Ministerio de agricultura y ganadería. Dirección general de recursos naturales, renovables, servicio forestal y de fauna. El Salvador. 2000. 2-8 pp.
 31. Niembro, A. Caracterización morfológica y anatómica de semillas forestales. Universidad autónoma de Chapingo. México. 1983. 112 pp.
 32. Cáceres, A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Primera Edición. Editorial Universitaria. Universidad de San Carlos. Guatemala. 1996. 140 pp.
 33. Ronquillo, F. *et al.* Especies vegetales de uso actual y potencial en alimentos y medicinas de las zonas semiáridas del noreste de Guatemala. Universidad de San Carlos. Dirección General de Investigación –DIGI-. Doc. Tec. Cuaderno de Investigación; 7-88. Guatemala. 1998. 219 pp.
 34. Wagner, H. *et al.* Plant drug analysis. In: A thin layer chromatography atlas, Scott, T.A. (Ed). Springer-Verlag, Berlin. United States of America. 1984. 16-226 pp.

35. Morton, J. Atlas of medicinal plants of middle America. Bahamas to Yucatán. Springfield, Charles C. Thomas. Publisher. United States of America. 1981. 140 pp.
36. Correa, J. *et al.* Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. Primera edición. Editorial Guadalupe Ltda. Colombia. 1990. 185 pp.
37. Francis, J. *Hymenaea courbaril* L. Algarrobo, locust. SO-ITF-SM-27. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. United States of America. 1990. 279-283 pp.
38. Argedas, M. Plagas de semillas forestales en América Central y el Caribe. Árboles de Centroamérica. Leguminosae Caesalpinioideae. *Hymenaea courbaril* L. OFI-CATIE, Ficha técnica. Costa Rica. 1997. 120-190 pp.
39. Standley, P. *et al.* Flora of Guatemala. Chicago natural history museum. Press Fieldiana: botany. United States of America. 1946; 24(4):88-374. 200 pp.
40. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad –CONABIO-. Sistema de información de organismos vivos modificados (SIOVM). Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. 2009. 1pp.
41. Martínez, M. Plantas útiles de la flora mexicana. Ediciones Botas. México. 1959. 321 pp.
42. Alonso, J. Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. Primera Edición. Editorial CORPUS. Argentina. 2004. 359 pp.
43. Lombardo, M. *et al.* Aspectos étnicos, biológicos, y químicos de *Senna occidentalis* (*Fabaceae*). Facultad de Ciencias Farmaceuticas. Universidad de San Paulo. Brasil. 2009. 1-2pp.
44. Del águila, J. Estudio integral de la actividad antimicrobiana de *Cassia occidentalis* y *Cassia grandis*, plantas usadas popularmente en el tratamiento de afecciones cutáneas. Trabajo de tesis. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos. Guatemala. 1992. 66-70 pp.
45. Cáceres, A. *et. al.* Actividad Antifúngica de Plantas de uso medicinal en Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos. Dirección General de Investigación –DIGI-. Doc. Tec. Cuaderno de Investigación; 7-92. Guatemala. 1993. 89 pp.
46. Lock, O. Investigación fitoquímica. 2da edición. Fondo Editorial PUCP. Perú. 1994. 250 pp.

47. Real Farmacopea Española. Ministerio de sanidad y consumo. 2da Edición. Madrid. 2002. 1980 pp.
48. Sharapin, N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Convenio Andrés Bello CYTED. Colombia. 2000. 147 pp.
49. Santa Cruz, L. Manual de selección fitoquímica. Guía práctica para los laboratorios de química de productos naturales y fitoquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos. Guatemala. 1986. 53-78 pp.
50. Lapp, M. *et al.* Anatomía foliar de ocho especies venezolanas del género *Oyedaea* DC. (Asteraceae-Heliantheae). Acta Bot. Venez. Venezuela. 2004; 27: 1-16. 10-16 pp.
51. Gattuso, M. *et al.* Manual de procedimientos para el análisis de drogas en polvo. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo - CYTED-. Editorial UNR. Argentina. 1999. 1-23 pp.
52. Moreno, N. Glosario botánico ilustrado. Instituto nacional de investigación sobre recursos bióticos. Compañía Editorial Continental -CECSA-. México. 1984. 20-256 pp.
53. Huaranca, R. Histología vegetal; histología general de las plantas vasculares. Perú. 2010. 27 pp.
54. García, M. *et al.* Anatomía foliar comparada de cinco genotipos del frijol mungo, *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Revista Fac. Agronomía (Luz). Venezuela. 1999; 16: 610-620. 1-4 pp.
55. Curtis, J. Microtecnia vegetal. Editorial Trillas. México. 1986. 100 pp.
56. González, M. *et al.* La anatomía vegetal como método de identificación en etnobotánica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. España. 1996. 5pp.
57. Gonzales, A. Morfología de las plantas vasculares. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. 2008. 1-13 pp.
58. Ávalos, A. *et al.* Metabolismo secundario de las plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. España. 2009; 2 (3): 119-145 pp.
59. Sepulveda, G. *et al.* La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Redalyc. México. 2004; 1: 355-363pp.
60. Lock, O. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. Manual de Fitoterapia. Cap. IV. Fondo Editorial PUCP. Perú. 1994. 41-64 pp.

61. Gonzales, J. Métodos físico-químicos empleados en el estudio farmacognóstico de las flores de Majagua. Cuba. 1990. 1-4 pp.
62. FITOMED. Plantas medicinales II. Editorial ciencias médicas. Cuba. 1993. 19-20 pp.

XIII. ANEXOS

Anexo 1: Certificación de elaboración de herbario



HERBARIO BIGU

Escuela de Biología
Facultad de C.C.Q.Q. y Farmacia

08 de abril de 2010

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este medio se hace constar que las señoritas CARMEN SOFÍA ROJAS SAZO carné 200510621, NELLY CARMINA CRUZ PALENCIA con carné 200418916 y ANDREA ROXANA ROMÁN ESCOBAR con carné 200515057, estudiantes de la carrera de Química Biológica de esta casa de estudios, depositaron en este herbario cuatro especímenes: *Senna occidentalis* Britt. & Rose (FABACEAE), *Phaseolus lunatus* Linn (FABACEAE), *Diphysa robinoides* Benth (FABACEAE), *Hymenaea courbaril* Benth (FABACEAE), los cuales fueron registrados e incorporados a las colecciones con el número **52930, 52929, 52931, 52932**: por lo que a solicitud de las interesadas, se les extiende la presente en el mismo lugar y fecha arriba indicados.

Atentamente


“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Ing. Agr. Mario Véliz


Coordinador-curador




Anexo 2: Fichas de registro para cada ejemplar de herbario de las leguminosas



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



Seminario: "Propuestas de normas de calidad fármaco botánica de cuatro especies de leguminosas con actividad antifúngica comprobada".



***Diphysa robinoides* Benth.**

FABACEAE


GUATEMALA, Suchitepéquez, Samayac, Cantón Chiguaxte,
Ecoparcela El Kakawatal

Altitud: 539 msnm, 14° 33'56.66" N; 91°27'53.19" O


Hábito: Frecuente en bosques secos o húmedos, con un altura de 5-20 m, las hojas son alternas, las flores pequeñas amariposadas dispuestas en pequeños racimos axilares. Los frutos se presentan en vainas de color café pálido de 4-6 cm de largo por 1-2 cm de grueso. Las vainas contienen entre 5-9 semillas color blanco crema.

Col. Sofía Rojas, Nelly Cruz 21/02/2010


Det. M. Véliz. Febrero de 2010 SR.NC.04



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



Seminario: "Propuestas de normas de calidad fármaco botánica de cuatro especies de leguminosas con actividad antifúngica comprobada".



***Hymenaea courbaril* Lasseigne.**

FABACEAE

GUATEMALA, Guatemala, Villa Canales, Aldea Colmenas,
Finca Las Delicias

Altitud: 1365 msnm, 14° 29'15.09" N; 90°31'24.22" O



Hábito: Árbol grande y robusto de 10 hasta 40 m de altura, hojas alternas asimétricas de 5 a 10 cm de largo incluyendo el pecíolo, flores grandes blanco verdosas de 3.5 cm de diámetro. Los frutos son vainas de 10 cm de largo por 4 cm de ancho y contiene 3 ó 4 semillas.


Col. Sofía Rojas 18/01/2010

Det. M. Véliz. Enero de 2010 SR. 03

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

Seminario: "Propuestas de normas de calidad fármaco botánica de cuatro especies de leguminosas con actividad antifúngica comprobada".



***Phaseolus lunatus* Linn.**

FABACEAE

GUATEMALA, Suchitepéquez, Cuyotenango, Centro uno la Máquina, Plantación Andrés


Altitud: 345 msnm, 14° 32'32.79" N, 90°34'20.89" O
Hábito: Raíces fibrosas y tuberosas, tallos glabros de 0.5-4 m de largo, hojas trifoliadas, inflorescencia axilar o lateral en pseudoracimos cortos o alargados, hasta 25 cm de largo, semillas 2-4 reniformes, comprimidas, de color negro, gris café o moteado.
Col. Sofía Rojas, Nelly Cruz, Andrea Román
14/02/2010
Det. M. Véliz. Febrero de 2010

SR.NC.AR. 02

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

Seminario: "Propuestas de normas de calidad fármaco botánica de cuatro especies de leguminosas con actividad antifúngica comprobada".



***Senna occidentalis* Britt. & Rose.**

FABACEAE

GUATEMALA, Suchitepéquez, Samayac, Cantón Chiguaxte, EcomParcela El Kakawatal

Altitud: 539 msnm, 14° 33'56.66" N, 91°27'53.19" O
Hábito: hierba perenne de 1 m o más de alto, hojas de 10-30 cm de largo, flores con pétalos de 2 cm, amarillos. Fruto en vaina café oscuro, linear, plano, 6-12 cm largo, 6-9 mm de ancho. Semillas ovales, café-olivo de 3-4 mm de largo. Frecuente en bosques secos.
Col. Sofía Rojas, Nelly Cruz
15/08/2009
Det. M. Véliz. Agosto de 2009

SR.NC. 01

Anexo 3

De acuerdo a las características macroscópicas, micromorfológicas, fitoquímicas y de pureza obtenidas del procedimiento experimental; se concluyen las siguientes propuestas de normas de calidad farmacobotánica, presentándolas por cada una de las especies en estudio.

PROPUESTAS DE NORMAS DE CALIDAD FARMACOBOTÁNICA DE 4 ESPECIES DE LEGUMINOSAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA COMPROBADA

Las siguientes son referencias teóricas de propuestas de control de calidad que debe de poseer el material vegetal fresco para que la droga vegetal obtenida sea un material de calidad que pueda ser utilizado como materia prima para la elaboración de fitofármacos en la industria fitofarmacéutica.

A. *Diphysa robinoides* Benth.

1. Características de la droga fresca

a) Debe de presentar las siguientes características macroscópicas para que sea identificada como *D. robinoides* comparada con la Flora de Guatemala: Las hojas alternas con forma oblonga, imparipinadas y caducifoliadas, ápice agudo o redondeado, base aguda, haz verde mate; en la nervadura central la venación es de tipo reticulada, las uniones de las folíolos y el peciólulo son del tipo peciolada. El envés verde claro mate. Las flores, pequeñas, amariposadas, de 1.5 cm de largo por 1 cm de ancho, dispuestas en pequeños racimos axilares. Los frutos se presentan en vainas indehiscentes, oblongas, huecas e infladas de color café pálido de 4-6 cm de largo por 1-2 cm de grueso. Las vainas contienen entre 5-9 semillas color blanco crema.

b) *D. robinoides* debe de presentar las siguientes características micromorfológicas para su correcta identificación microscópica: El tejido vascular del folíolo, peciólulo y pecíolo

en posición central; los haces vasculares en disposición colateral cerrada, el xilema en posición endarco y de tipo helicoidal laxa. Los haces vasculares del pecíolo forman un anillo continuo semejante a una estela del tipo sifonostela-euestela. El colénquima es del tipo anular. El parénquima medular con canales secretores. La lámina foliar bifacial con 3 capas de células de parénquima en empalizada en disposición adaxial y de 8-10 capas de parénquima esponjoso en posición abaxial. Los haces vasculares transcurrentes rodeados de esclerénquima. La nervación del folíolo es abierta y reticulada con el término de venación de tipo anastomosada y margen entero. Los estomas de 3 tipos: anisocíticos, anomocíticos y diacíticos con presencia de cloroplastos en sus células oclusivas. Los diversos tipos de tricomas presentes son: pluricelulares monoliformes, pluricelulares de aspecto glanduloso, unicelulares lineales, multicelulares y tectores simples unicelulares. Los cristales de oxalato de calcio del tipo estiloide y solitario. Los tipos de células del esclerénquima son: braquiesclereidas, macrosclereidas, fibras septadas, xílicas, fibrotraqueidas y traqueidas. Los tubos cribosos, vasos perforados y gránulos de almidón.

c) El índice de estomas debe ser de aproximadamente 16 estomas/100 células.

d) En el tamizaje fitoquímico se deben encontrar los siguientes metabolitos secundarios: Alcaloides, mucílagos, grasas, taninos, saponinas (estándar de saponinas, β -sitosterol y estigmasterol), flavonoides (apigenina) y antranas.

2. Características de la droga seca

a) Para verificar que la materia prima utilizada en la elaboración de la droga vegetal presenta características de pureza, condiciones de almacenamiento y conservación que evitan las reacciones de enmohecimiento y contaminación bacteriana; se debe obtener un porcentaje de humedad de 8.98%.

b) Para verificar que la materia se encuentra pura, es decir sin la adición de material inorgánico o trazas de fertilizantes que adulteran su composición química, debe de poseer 9.50% de cenizas totales.

B. *Hymenaea courbaril* Lasseigne.

1. Características de la droga fresca

a) Debe de presentar las siguientes características macroscópicas para que sea identificada como *H. courbaril* comparada con la Flora de Guatemala: Las hojas son de tipo alternas asimétricas inequilateras, compuestas por un par de folíolos de 5-10 cm de largo incluyendo el pecíolo, ápice cordado; flores grandes blanco verdosas de 3.5 cm de diámetro. Los frutos son vainas de 10 cm de largo por 4 cm de ancho y contienen 3-4 semillas. Los frutos son de tipo legumbre con una cáscara leñosa muy dura, pero entre la cáscara y las semillas tiene un polvo blanco.

b) *H. courbaril* debe de presentar las siguientes características micromorfológicas para su correcta identificación microscópica: El tejido vascular del folíolo, peciólulo y pecíolo en posición central; el haz vascular del folíolo de forma bicolateral, el del pecíolo colateral abierta y el del peciólulo perifloemático. Los haces vasculares del pecíolo forman un anillo continuo semejante a una estela del tipo sifonostela-euestela. El xilema en posición endarco y del tipo doble helicada para el folíolo, peciólulo y pecíolo; además para estos 2 últimos helicada laxa. Se observan placas perforadas simples. El colénquima es del tipo lagunar y con presencia de canales resiníferos, el parénquima medular se observa únicamente en el pecíolo. La lámina foliar bifacial presenta 2-3 capas de parénquima en empalizada en disposición adaxial y el resto del esponjoso integrado por 8-9 capas en disposición abaxial. Los haces vasculares transcurrentes dispuestos en forma vertical rodeados de parénquima. Presenta una venación abierta y reticulada, el término de esta es anastomosada. Se presentan células de la hipodermis o de corcho. Los estomas del tipo diacíticos sin presencia de cloroplastos en sus células oclusivas. Los tipos de tricomas presentes son: tectores simples y glandulares biseriados. Posee cristales de oxalato de calcio del tipo arena y solitario. Los tipos de células del esclerénquima son: braquiesclereidas, macroesclereidas y fibras esclerenquimáticas. Se observaron otros tipos de fibras con incrustaciones de cristales solitarios de oxalato de calcio.

- c) El índice de estomas que presenta es de 25 estomas/100 células con un rango entre (19.00 – 31.00).
- d) Por cada célula epidérmica hay 5.00 células del clorénquima en empalizada con un rango de (4.5 – 5.5).
- e) El tamizaje fitoquímico que debe de mostrar para contribuir a su acción antifúngica es la siguiente: Mucílagos, alcaloides, grasas, aceites volátiles (cariofileno), taninos, saponinas (estándar de saponinas, β -sitosterol y estigmasterol), flavonoides (apigenina y ácido clorogénico) y antranas.

2. Características de la droga seca

- a) Para verificar que la materia prima utilizada en la elaboración de la droga vegetal presenta características de pureza, condiciones de almacenamiento y conservación que evitan las reacciones de enmohecimiento y contaminación bacteriana; se debe obtener un porcentaje de humedad de 6.88%.
- b) Para verificar que la materia se encuentra pura, es decir sin la adición de material inorgánico o trazas de fertilizantes que adulteran su composición química, debe de poseer 3.62% de cenizas totales.

C. *Phaseolus lunatus* Linn.

1. Características de la droga seca

- a) Debe de presentar las siguientes características macroscópicas para que sea identificada como *P. lunatus* comparada con la Flora de Guatemala: Las hojas trifoliadas, folíolos ovados con ápice deltoide, base redondeada glabros o esparcidamente pubescentes, con margen entero, estípulas pequeñas lanceoladas, inflorescencia axilar o lateral en pseudoracimos cortos o alargados hasta 25 cm de largo; flores con estandarte verde, alas y quillas blancas, lilas o púrpuras, de 1.5 cm de largo, cáliz campanulado 2-3 mm de largo,

estándar ancho y plano, semillas 2-4 reniforme, comprimida, de color negro, gris café o moteado. Las raíces fibrosas y tuberosas, tallos glabros de 0.5-4 m de largo.

b) *P. lunatus* debe de presentar las siguientes características micromorfológicas para su correcta identificación: El tejido vascular del folíolo, peciólulo y pecíolo en posición central; el haz vascular es del tipo colateral cerrado para el folíolo y perifloemático para el peciólulo y pecíolo. Los haces vasculares del pecíolo forman un anillo continuo semejante a una estela del tipo sifonostela-euestela. El xilema en posición endarco y del tipo helicoidal laxa para folíolo, peciólulo y pecíolo, para el primero también doble helicada mientras que en el peciólulo y pecíolo helicoidal anular; además se observan los vasos del xilema perforados con puntuaciones escalariformes y las placas perforadas simples. Se evidencian vasos del floema. El colénquima es del tipo anular, el parénquima medular se observa únicamente en el pecíolo en abundante cantidad. La lámina foliar presenta una hoja bifacial, con 1-2 capas de parénquima en empalizada dirigidas hacia la epidermis adaxial y de 3-4 capas de parénquima esponjoso con espacios intercelulares en disposición abaxial. En la nervadura central del folíolo hay una protuberancia formada por colénquima desplazada hacia la epidermis adaxial. Presenta una venación abierta y reticulada, el término de esta es anastomosada. Se presentan células de la hipodermis o de corcho. Los estomas son paracíticos sin presencia de cloroplastos en sus células oclusivas. Los tipos de tricomas presentes son: glandulares brevifurcados con bases de 10 células en disposición radial, uncinados de revestimiento, glandulares secretores, unicelulares lineales con bases de 6-7 células y protectores. Posee cristales de oxalato de calcio del tipo: solitarios, estiloides y arenas. Los tipos de células del esclerénquima son: braquiesclereidas, macroesclereidas, fibroesclereidas y fibrotraqueidas. Se observan otros tipos de fibras alargadas con extremos ahusados. Se encuentran cromoplastos del tipo globuloso en el folíolo y solamente en la semilla amiloplastos ovalados.

c) El índice de estomas es de 22 estomas/100 células con un rango entre (19.00 – 32.00).

d) Por cada célula epidérmica hay 10 células del clorénquima en empalizada, con un rango entre (8-12.5).

e) El tamizaje fitoquímico que debe de mostrar para contribuir a su acción antifúngica es el siguiente: Alcaloides, mucílagos, grasas, taninos, saponinas (estándar de saponinas, β -sitosterol y estigmasterol), flavonoides (apigenina) y antraquinonas.

2. Características de la droga seca

a) Para verificar que la materia prima utilizada en la elaboración de la droga vegetal presenta características de pureza, condiciones de almacenamiento y conservación que evitan las reacciones de enmohecimiento y contaminación bacteriana; se debe obtener un porcentaje de humedad de 9.92%.

b) Para verificar que la materia se encuentra pura, es decir sin la adición de material inorgánico o trazas de fertilizantes que adulteran su composición química, debe de poseer 10.90% de cenizas totales.

D. *Senna occidentalis* Britt. & Rose.

1. Características de la droga fresca

a) Debe de presentar las siguientes características macroscópicas para que sea identificada como *S. occidentalis* comparada con la Flora de Guatemala: Las hojas poseen un tamaño de 10-30 cm de largo en racimos axilares, sépalos de 6-9 mm; flores con pétalos amarillos de 2 cm, fruto en vaina café oscuro, linear, plano, de 6-12 cm de largo por 6-9 mm de ancho. Las semillas ovales café-olivo de 3-4 mm de largo. Los folíolos de 4-6 pares ovalados, lanceolados, agudos o acuminados de 3-7 cm; hojas de 10-30 cm de largo, con margen dentado; racimos axilares y sépalos de 6-9 mm.

b) *S. occidentalis* debe de presentar las siguientes características micromorfológicas para su correcta identificación: El tejido vascular del folíolo, peciólulo y pecíolo en posición central; el haz vascular es del tipo colateral cerrado para el folíolo y pecíolo mientras que para el peciólulo perifloemático. Los haces vasculares del pecíolo forman un anillo continuo semejante a una estela del tipo sifonostela-euestela. El xilema en posición endarco

y del tipo helicoidal laxa y doble helicada para el folíolo a diferencia del peciólulo y pecíolo en donde es helicoidal laxa y anular. El colénquima anular es abundante en el folíolo y peciólulo, además en el folíolo se observan pigmentos antociánicos fucsia en el colénquima, parénquima en empalizada, esponjoso y en su terminación. El parénquima medular se observa únicamente en el pecíolo en gran cantidad. La lámina foliar presenta una hoja bifacial, con solo una capa de parénquima en empalizada dirigida hacia la epidermis adaxial y con 4 capas de parénquima esponjoso separadas por espacios intercelulares en disposición abaxial; se visualizan haces vasculares transcurrentes en forma vertical rodeados de parénquima. Presenta una venación abierta y reticulada, el término de esta es anastomosada. Los estomas son diacíticos sin presencia de cloroplastos en sus células oclusivas, además se observan glándulas capitadas. Los tipos de tricomas presentes son: glandulares multicelulares, glandulares unicelulares, de aspecto glanduloso, uncinados de revestimiento, estrigosos en el borde, unicelulares lineales y tectores de cobertura. Posee cristales de oxalato de calcio en forma de arenas, drusas y solitarios. Los tipos de células del esclerénquima son: braquiesclereidas, macrosclereidas, fibroesclereidas. Se observan otros tipos de fibras alargadas con extremos ahusados.

c) El índice de estomas de 24 estomas/100 células con un rango entre (21.00 – 27.00).

d) Por cada célula epidérmica hay 7 células del clorénquima en empalizada, con un rango entre (6-7.25).

e) El tamizaje fitoquímico que debe de mostrar para contribuir a su acción antifúngica es la siguiente: Mucílagos, grasas, aceites volátiles (nerol), taninos, saponinas (estándar de saponinas, β -sitosterol, estigmasterol), flavonoides (apigenina y ácido clorogénico), antraquinonas y antronas.

2. Características de la droga seca

a) Para verificar que la materia prima utilizada en la elaboración de la droga vegetal presenta características de pureza, condiciones de almacenamiento y conservación que

evitan las reacciones de enmohecimiento y contaminación bacteriana; se debe obtener un porcentaje de humedad de 6.56%.

b) Para verificar que la materia se encuentra pura, es decir sin la adición de material inorgánico o trazas de fertilizantes que adulteran su composición química, debe de poseer 0.19% de cenizas totales.