

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

**CARACTERIZACIÓN DE TRES ESPECIES BOTANICAS, UTILIZADAS
POPULARMENTE EN GUATEMALA COMO CALAHUALA**

Seminario de investigación

Presentado por

Deivy Alexander Mazariegos Pérez

María de los Ángeles Abarca Nerio

Para optar al título de

QUÍMICOS BIÓLOGOS

Guatemala, noviembre de 2016

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

Al departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala por brindar el equipo, materiales e insumos necesarios para la investigación.

A la facultad de Agronomía y a las personas de dicha facultad por brindarnos equipo, espacio de trabajo y las plantas para poder culminar con nuestra investigación.

A nuestra asesora M.A. María Eugenia Paredes por su apoyo incondicional, paciencia y motivación para seguir adelante en la culminación de este seminario.

A nuestro amigo Rigo Domingo por su apoyo y dedicación al realizar las ilustraciones de las cartillas micrográficas.

Índice

	<u>Página</u>
I. Ámbito de la Investigación	1
II. Resumen	2
III. Antecedentes	4
A. Recursos Fitogénicos	4
B. Etnobotánica en la medicina tradicional	4
C. Plantas medicinales	5
D. Situación del comercio de las plantas medicinales	6
E. Preparaciones herbarias	7
F. Fitofármacos	7
G. Calidad	8
H. Aspectos regulatorios de los productos de plantas medicinales en Guatemala	11
I. Material vegetal en estudio	12
J. Estudios previos sobre plantas medicinales	23
IV. Justificación	29
V. Objetivos	30
VI. Materiales y Métodos	31
A. Universo y muestra	31
B. Recursos	31
C. Equipo	32
D. Utensilios y Cristalería	32
E. Reactivos	33
F. Métodos	33
G. Diseño de la Investigación	45
VII. Resultados	47
A. Recolección de la muestra	47
B. Descripción macroscópica y organoléptica	47
C. Descripción microscópica	55
D. Pruebas histoquímicas	75

E. Caracteres microscópicos del diafanizado en las frondes e índice de estomas	76
F. Parámetros de calidad de la droga seca.	82
G. Cromatografía en capa fina y pruebas fitoquímicas (reacción en tubo)	83
VIII. Discusión de resultados	85
IX. Conclusiones	89
X. Recomendaciones	90
XI. Referencias bibliográficas	91
XII. Anexos	98

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

La diversidad de plantas medicinales nativas de Guatemala, así como su amplia distribución, favorecen su uso popular; constituyendo la recolección silvestre una de las principales prácticas para su obtención ya sea con fines de consumo o comercialización en mercados y tiendas naturistas.

Es un hecho, que muchas familias de plantas comparten características botánicas similares y que muchas familias diferentes comparten un mismo uso popular. De la misma manera se sabe, que no siempre las especies utilizadas por la población, con un mismo fin, comparten las mismas propiedades medicinales e inclusive, en algunos casos especies muy parecidas tienen mayor o menor grado de toxicidad. Por lo que establecer la identidad de dichas plantas, especialmente cuando estas ya se encuentran secas o fragmentadas, constituye una herramienta importante en los estudios etnobotánicos de una región.

La presente investigación se realiza en el marco de la línea de investigación en plantas medicinales que permanentemente se desarrolla en el Departamento de Citohistología, habiéndose seleccionado para el mismo tres especies diferentes de helechos conocidos popularmente como Calahuala, la cual es reconocida internacionalmente por sus propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatoria y diurética entre muchas otras. Con los resultados se espera establecer parámetros micromorfológicos útiles para la elaboración de monografías de calidad de cada una de las especies, especialmente determinar aquellas características importantes, que permitan una clara identificación entre especies.

II. RESUMEN

La Calahuala ha sido una planta muy reconocida en Guatemala por sus usos y aplicaciones en la medicina tradicional, siendo las especies que más se emplean bajo dicho nombre; *Phlebodium decumanum*, *Ph. pseudoaureum* y *Serpocaulon triseriale*. Hasta la fecha no se dispone de mucha información que permita un control de calidad de estas especies, especialmente cuando se encuentran secas y/o fragmentadas o para su recolección. Por lo que el presente estudio se planteó establecer parámetros organolépticos, microanatómicos, histoquímicos, fitoquímicos y otros caracteres para el control de calidad de la droga vegetal de estas tres especies conocidas popularmente como Calahuala.

El estudio se realizó con muestras de fronde y rizoma de las tres especies citadas de calahuala, provenientes de los campos experimentales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Se realizó una caracterización macroscópica de cada especie, de igual forma se hizo una caracterización micromorfológica de las frondes y rizomas, empleando cortes transversales a mano alzada, identificación de metabolitos secundarios, disociado débil, además se determinaron los tipos de estomas e índice de estomas a través del diafanizado de las frondes.

A nivel macroscópico se describen diferencias morfológicas en la forma de las pinnas y en la disposición de sus soros, en la forma y color que presentan las vellosidades en los rizomas, dichas diferencias las distinguen una de otra.

Las características microscópicas de cada especie se presentan a través de fotografías y se describe a detalle cada una de las mismas, destacándose las diferencias en la forma de la nervadura principal, meristelas en fronde y rizoma respectivamente, haces anficribales, fibras, esclereidas y traqueidas, las cuales son de utilidad para un buen control de calidad.

Se realizaron mediciones cuantitativas del porcentaje de humedad y cenizas totales de las muestras analizadas con la finalidad de garantizar la calidad de la materia vegetal en estudio.

Con las pruebas histoquímicas y el tamizaje fitoquímico se evaluó la presencia u ausencia de metabolitos secundarios como: saponinas, taninos, mucílagos, cumarinas, flavonoides, almidones, alcaloides, grasas, y aceites, para comprobar que poseen metabolitos capaces de conferirles los efectos medicinales que se les ha dado en la medicina tradicional.

III. ANTECEDENTES

A. Recursos fitogenéticos

Son los elementos vegetales que, actual o potencialmente, son útiles al hombre como satisfactores de sus necesidades vitales o por que representan nuevas fuentes de producción (Villar, 1998).

B. Etnobotánica en la medicina tradicional

La etnobotánica es la ciencia que estudia el uso popular de la flora silvestre o naturalizada a una región particular. La etnobotánica medicinal puede definirse como el estudio del uso medicinal de la flora de una región, área o ecosistema. Para conocer la relación entre la flora de un lugar y el hombre, es necesario el contacto directo con los habitantes de la región a través de una comunicación fluida que permita obtener información confiable que será reproducida lo más fielmente posible a como fue transferida (Girón, & Cáceres, 1994, p.24).

El uso de plantas como medio curativo, es decir las plantas medicinales constituyen una de tantas expresiones etnobotánicas (Villar, 1998).

Guatemala posee un rico acervo de conocimientos sobre la medicina tradicional, obtenidos de una herencia cultural acumulada a través de su historia. Con respecto a las creencias, prácticas y recursos médicos, se puede decir que cada grupo social o étnico ha seleccionado sus elementos, y los ha jerarquizado de acuerdo con sus necesidades, las cuales han sido condicionadas por el ambiente y su cultura (Villatoro, 1984, p. 40, 41).

Para recolectar datos etnobotánicos se emplean diversos métodos, Kvist y colaboradores (2001) posterior a analizar ocho métodos etnobotánicos recomiendan utilizar combinaciones de esos métodos para recabar la mayor información posible sobre el uso popular de las plantas medicinales en una región, puesto que mediante un solo método no

es posible recabar toda la información deseada y que la combinación ideal de métodos dependerá de los objetivos, del conocimiento de la flora y la cultura local, así como los recursos disponibles (Kvist, Oré, Gonzales, & Llapasca, 2001)

C. Plantas medicinales

En Guatemala se goza de una larga tradición en la producción y utilización de plantas medicinales. El mejor ejemplo es la zarzaparrilla (*Smilax* spp.), que fue exportada a Europa desde el siglo XVI. En diferentes trabajos se han citado hasta 663 plantas de uso medicinal, nativas y exóticas, que muestran que la medicina tradicional encontró un sitio preponderante debido a la cosmovisión de la población indígena acerca de la naturaleza. Cáceres, (1996) hace referencia a las 120 plantas medicinales de más amplio uso, de las cuales aproximadamente el 50 por ciento son nativas. Entre las plantas medicinales más importantes de Guatemala, por su volumen comercializado y valor económico, podemos mencionar la zarzaparrilla (*Smilax* spp.) y la Calahuala (*Polypodium* sp.) (Robles, Oliveria & Villalobos, 2000).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió en 1978 el concepto de planta medicinal como: cualquier planta que en uno o más de sus órganos contienen sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica (Cañigüeral, Dellacassa, & Bandoni, 2003).

Según Rodríguez (1998), planta medicinal es una especie que contiene compuestos químicos que al ser ingeridos o entrar en contacto con el ser humano, son capaces de actuar sobre determinados procesos metabólicos en el organismo, produciendo un efecto terapéutico.

Por otra parte, Amat (1982) indica que, a pesar de que en las comunidades suelen ser utilizadas indistintamente varias especies de plantas de un mismo género, a las cuales se les ha aplicado el mismo nombre vulgar (común) y en la mayoría de los casos, éstas demuestran una concentración y composición química diferente entre una especie y otra,

dando a conocer con ello la suma importancia y relevancia que tiene la correcta identificación de las plantas medicinales para su uso y distribución.

D. Situación del comercio de las plantas medicinales

La producción de plantas medicinales resulta rentable cuando se le da un valor agregado a la producción primaria, es decir, se le comercializa no como drogas vegetales frescas o secas, sino procesadas y transformadas. En ese sentido se pueden obtener extractos, aceites, o elaborar fitofármacos. Pero para esto se debe cumplimentar lo siguiente:

1. Obtener materia prima de buena calidad, lo que implica su cultivo y cosecha en el momento adecuado y si se trata de recolección silvestre, no recoger a orillas de los caminos o cerca de sitios contaminados.
2. Hacer los análisis de calidad correspondientes: los macroscópicos, microscópicos, microbiológicos y los físico-químicos, lo que conlleva a material libre de impurezas, a la detección de la presencia de organismos patógenos al hombre y de los principios activos de la planta.
3. Con relación a la calidad de las materias primas y la comercialización de las Plantas Medicinales, los mercados de Europa, Japón, China, Corea, Estados Unidos, están demandando materias primas naturales o productos terminados pero exigen que sean de calidad certificada, o sea, con los análisis correspondientes que así la validan (Acosta, 2006).

Un alto porcentaje de las materias primas empleadas en las distintas industrias de procesamiento, tiene su origen en poblaciones silvestres de América Latina. Muchas de las plantas medicinales que se comercializan a escala local e internacional son especies nativas. Actualmente se promueven diversas acciones con el fin de mejorar el suministro de materias primas para la industria asegurando la conservación de las mismas. Estas acciones se dirigen al estado de la conservación de plantas medicinales en su ambiente para posterior regulación y promoción de directrices para la domesticación de las plantas medicinales que se comercializan (Ocampo, 2002).

En general la producción de plantas medicinales abastece los mercados de la región centroamericana, principalmente en lo que se refiere a materia prima de especies exóticas, como manzanilla y romero. En Guatemala se ha incentivado el comercio de cuculmeca (*Smilax domingensis*) y el rizoma de calaguala (*Phlebodium spp*) (Ocampo, 2002).

E. Preparaciones herbarias

Las plantas medicinales son utilizada frescas o secas de diversas formas entre las que podemos mencionar extractos acuosos como: decocciones, se lleva a ebullición por unos minutos se emplea para partes duras; las infusiones, se hierve agua hasta ebullición por unos minutos se retira del fuego y se agrega el material; maceraciones, consiste en fragmentar el material se cubre con agua y se deja reservar. Pueden ser aplicados tópicamente cuando se pretenden acciones localmente o bien administrados por vía oral para lograr efectos sistemáticos (Morón & Levy, 2002) (Kuklinski, 2000).

Hay formas farmacéuticas propias de los productos naturales y pueden ser a la vez empleadas como materias primas para la elaboración de preparaciones más complejas de estos. La droga cruda es una planta o una parte desecada y generalmente fragmentada o pulverizada mediante un proceso controlado y con indicadores de calidad que debe cumplir. El extracto fluido es un producto líquido obtenido de una droga, que contiene alcohol, (usualmente del 30 al 80%) como disolvente y preservativo. La tintura también es un producto líquido que contiene alcohol, casi siempre más del 50% en agua, porque los principios se extraen usualmente en la fase etanólica. En su preparación, tienen usualmente no más del 20% de droga, puede ser elaborada a partir de una droga o de un extracto fluido (Morón & Levy, 2002).

F. Fitofármacos

Los fitofármacos son los productos derivados de plantas y/o sus mezclas en forma de extractos, liofilizados, destilados, tinturas, cocimientos o cualquier preparación galénica que tienen: utilidad terapéutica y una forma farmacéutica definida, definición de acuerdo a

la normativa 24- 2001 (Guatemala: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Dirección General de Regulación, Vigilancia y Control de la Salud, DRCPFA, 2001).

Un medicamento herbario, producto natural o fitofármaco es aquel producto medicinal acabado y etiquetado cuyos ingrediente activos están formados por partes de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de estos, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales. Puede contener excipientes, sustancias que no tienen una acción farmacológica, pero que contribuyen a la elaboración de la forma farmacéutica y se utilizan para la prevención, diagnóstico o tratamiento, está caracterizado por el conocimiento de la eficacia y de los riesgos de su uso estos medicamentos tienen que cumplir con los requisitos establecidos (Morón & Levy, 2002, p. 203).

En el Reglamento Técnico Centroamericano para la Verificación de la Calidad de Productos Naturales, RTCA 11.03.56:09, (s.f) se establece el concepto de producto natural, como todo producto procesado, industrializado y etiquetado con propiedades medicinales, que contiene en su formulación ingredientes obtenidos de las plantas, animales minerales o mezcla de éstos. Esta definición están incluidos los fitofármacos, también señala que no deben contener compuestos activos de síntesis química, de lo contrario dejan de ser productos naturales.

G. Calidad

La calidad en términos generales es la naturaleza esencial de un producto y la totalidad de sus atributos y propiedades, las cuales determinan su idoneidad para los propósitos a los cuales se destina. En otras palabras es un conjunto de características de un producto que determina su aptitud para el uso. En un medicamento la calidad está determinada por sus características de identidad, pureza, contenido, potencia, estabilidad, seguridad y presentación (Colombia: Ministerio De Salud, Manual de normas técnicas de calidad, guía técnica de análisis, 2002) (Reglamento Técnico Centroamericano, s.f.).

La dirección de la calidad se desarrolla utilizando tres procesos: planificación, control y mejora. Estos procesos son necesarios para asegurar la identidad, pureza, contenido, potencia, estabilidad, seguridad y presentación (Juran, 1993).

Dentro de los aspectos de calidad en las plantas medicinales debe verificarse y registrarse la identidad botánica; nombre científico (género, especie, subespecie o variedad, autor y familia) de cada una de las plantas medicinales que se cultiven. Se registrarán también los nombres comunes en el idioma local y en inglés, si existen. También se pueden suministrar otros datos de interés, como el nombre del lugar donde se cultivan, el ecotipo, el quimiotipo o el fenotipo (Organización Mundial de la Salud, 2003).

Entre los parámetros que sirven para establecer la identidad botánica están las características organolépticas, las cuales consisten en comprobar las características apreciables con los sentidos, es decir, color, gusto (sabor), olor (aroma) y textura (Kuklinski, 2000, p.21).

Las características macroscópicas y microscópicas son parte importante para establecer la identidad botánica. Las características macroscópicas se aprecian directamente o con ayuda de una lupa, entre estas características podemos nombrar: forma y tamaño, color y aspecto exterior (grosos, pilosidad), fractura de la droga (lisa, fibrosa, granulosa), color interior, etc. Las características microscópicas precisan el uso del microscopio y a menudo es necesario hacer tinciones específicas para comprobar la presencia o ausencia de determinados elementos, se pueden realizar estudios de cortes histológicos. Micrografía del polvo de la droga, este es un método rápido, sencillo y muy útil se buscan elementos estructurales (pelos, estomas etc.), componente químicos (oxalato de calcio, carbonatos, etc.). También estudios químicos mediante tejidos (Kuklinski, 2000, p. 21).

Se utilizan ensayos fitoquímicos para determinar los principios activos de las drogas vegetales para lo cual se utilizan métodos cualitativos y cuantitativos. Los métodos cualitativos tienen como finalidad detectar e identificar las diferentes sustancias que componen la droga. Entre los métodos podemos mencionar: pruebas de solubilidad en

diferentes disolventes, reacciones químicas para detectar grupos funcionales concretos basadas en precipitaciones, aparición de color, desprendimientos gaseosos, etc. Métodos cromatográficos: Cromatografía de gases, cromatografía de capa fina, cromatografía líquida de alta resolución. Métodos espectrofotométricos: de masas, infrarroja, resonancia magnética nuclear, ultravioleta (Kuklinski, 2000, p. 22).

Los métodos cuantitativos su finalidad es determinar en qué proporción se encuentran dichas sustancia en la droga. Para estos métodos es conveniente disponer de drogas patrón y principios activos patrón que sirvan de referencia para comparar la droga investigada. Entre estos podemos mencionar: valoración de la cantidad de principio activo por volumetría, gravimetría, espectrofotometría, métodos cromatográficos. Determinación del contenido de humedad, determinación de cenizas, determinación de índices: acidez, de yodo, de saponificación, etc. (Kuklinski, 2000, p. 22).

Cuando se trata de cultivos comerciales, debe facilitarse el nombre del lugar donde se cultivan y del proveedor. En el caso de las variedades criollas recolectadas, propagadas, diseminadas y cultivadas en una región determinada, deberán registrarse los datos de la línea genética con nombre local, incluido el origen de las semillas, las plantas o los materiales de propagación originales (Organización Mundial de la Salud, 2003).

Los controles y ensayos para asegurar la calidad se llevan a cabo con el fin de Asegurar la identidad de la droga, comprobar su correcto estado de la conservación, determinar la cantidad exacta de principio activo, comprobando que contenga la cantidad necesaria para asegurar la actividad sin llegar a valores que puedan resultar tóxicos, comprobar y asegurar la ausencia de sustancias indeseables que pueden resultar nocivas, detectar posibles adulteraciones y falsificaciones (Kuklinski, 2000, p. 20).

H. Aspectos regulatorios de los productos de plantas medicinales en Guatemala

Los aspectos regulatorios son importantes para establecer los requisitos tanto legales como de calidad que deben cumplirse, con el decreto 78-2005 se establece la creación del Sistema Nacional de Calidad para promover la adopción de prácticas de gestión de calidad fomentando la calidad de los bienes y servicios, definir las actividades y procedimientos de las entidades del Sistema Nacional de la Calidad, establecer las bases para la adopción de reglamentos técnicos. Establecer mecanismos que faciliten la información de sectores productivos y al público en general sobre las normas y procedimientos de acreditación (Ley del Sistema Nacional de la Calidad, 2005).

La normativa 24-2001, se establece para los productos fitoquímicos, donde se definen, se clasifica y describen los requisitos a cumplir. El Departamento de Regulación y Control de Productos Farmacéuticos y Afines (DRCPFA) es el encargado de Garantizar a la población guatemalteca la disponibilidad de productos farmacéuticos y afines de calidad, seguros y eficaces a través de la vigilancia, regulación y control de estos productos y de los establecimientos farmacéuticos privados y de la red nacional (Guatemala: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, DRCPFA, 2001).

Los requisitos que deben cumplir los productos naturales medicinales se establecen en los Reglamentos Técnicos Centroamericanos: Productos Farmacéuticos, Productos Naturales Medicinales, para Uso Humano, Registro Sanitario; el reglamento de Productos Farmacéuticos, Productos Naturales Medicinales para Uso Humano, Requisitos de Etiquetado y Productos Farmacéuticos. Productos Naturales Medicinales Para Uso Humano. Verificación de La Calidad (Productos farmacéuticos. Productos Naturales Medicinales para uso Humano RCTA 11.03.56:09, s.f.).

I. Material vegetal en estudio

Para este estudio se utilizarán tres especies de helechos de la familia Polypodiaceae, conocidas popularmente como Calahuala, estos se caracterizan por carecer de flores y semillas, poseen tejido vascular (tejido para conducir agua y nutrientes), y se reproducen por esporas producidas en el envés de las fronde, en estructuras llamadas esporangios (Jiménez, 2010, p.11).

Los helechos se encuentran entre los vegetales terrestres más antiguos, aparecieron en el devónico (hace 408 millones de años), un poco antes que los anfibios, y fueron dominantes en el período Carbonífero, cuando aparecieron los reptiles (hace 362 millones de años) (Jiménez, 2010, p.11).

Estas plantas están distribuidas en todo el mundo, exceptuando las regiones polares, son principalmente tropicales y subtropicales y se encuentran en variados tipos de hábitat. Existen alrededor de 12,000 especies en el mundo, en Guatemala se han identificado cerca de 680 especies. Estos forman una parte importante de un ecosistema. Algunas especies epifitas (que crecen sobre otras plantas) son importantes por su relación con otras plantas al proveerles de sustrato, el cual también sirve de hábitat a una gran variedad de fauna. Algunos helechos portan nectarios en las hojas, que son estructuras productoras de líquidos azucarados como el néctar de las flores, y sirven de alimento para algunos insectos. Los helechos son sensibles a los cambios de humedad y a la luz directa del sol, por lo que pueden utilizarse como indicadores del cambio ambiental. También se han utilizado algunas especies de helechos como indicadores de lugares con alta riqueza de especies de plantas y animales (Jiménez, 2010, p.11-12).

Los helechos son plantas típicas de los bosques nubosos, que por sus características ecológicas resultan ser muy apropiadas como especies indicadoras del cambio ambiental y de diversidad biológica. Estas cualidades son útiles para el planteamiento de estudios sobre el manejo de los recursos naturales (Jiménez, 2010, p.12).

1. Las partes de un helecho.

Como la mayoría de las plantas, un helecho está dividido en tres tipos de órganos: tallo, raíz y hojas. Las raíces en los helechos son simples, delgadas y están mezcladas con el suelo o sustrato, por lo que generalmente no son evidentes a simple vista. El tallo de los helechos es llamado rizoma, éste puede ser alargado o corto, con crecimiento horizontal o vertical y está cubierto generalmente por escamas (Jiménez, 2010, p.12).

Las hojas de los helechos son la parte más evidente de la planta. Las hojas se dividen en dos partes: pecíolo es la parte inferior de la hoja, que sostiene a la lámina, esta es la parte amplia de la hoja. Además, la lámina en la cara inferior porta estructuras productoras de esporas llamadas esporangios, que se agrupan para formar soros. Los soros pueden tener forma alargada o circular, estar ubicados en el margen de la lámina o más hacia el centro, y estar o no protegidos por un indusio. El indusio es una capa de tejido claro y delgado que cubre a veces el soro, y juntos son las estructuras más útiles para identificar un helecho (Jiménez, 2010, p.12).

2. Familia Polypodiaceae.

Plantas generalmente epífitas, ocasionalmente rupícolas; rizomas generalmente dorsiventrales con dos series de hojas en la superficie dorsal, larga a cortamente rastreros, escamosos, las escamas generalmente peltadas o pseudopeltadas, clatradas o no clatradas; las hojas estériles y fértiles monomorfas o dimorfas, articuladas a folípodios cortos (la articulación no es funcional en *Laxogramme*); lámina generalmente simple, pinnatisecta o 1-pinnada, raramente 1-pinnada pinnatificada a 3-pinnada o subdicotómicamente bifurcada; nervaduras libres o anastomosadas, con o sin nérvulos incluidos; soros generalmente redondeados, ocasionalmente alargados o lineares, sin indusios; esporangio con 2-3 pedículos alineados, los anillos verticales e interrumpidos en el pedículo; esporas reniformes y amarillas o (en *Lexogramme*) tetraédricas y verdes, sin una perispora prominente; x= 25, 34, 35, 36, 37. Aproximadamente 40 géneros y 600 especies. Cosmopolita (Guatemala. Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, 2007).

Polypodiaceae es una familia grande y diversa que no puede ser definida por la presencia de una sola característica, sin embargo, varias características están relacionadas; por ejemplo, numerosas especies de la familia tienden a presentar rizomas rastreros escamosos, dorsiventrales, con hojas dispuestas en dos series en la superficie dorsal. Las hojas están articuladas a folipodios cortos y caen en la madurez sin dejar rastro (la zona de articulación se evidencia por un cambio brusco de color entre el pecíolo y los folipodios). Los soros son a menudo amplio redondeados con esporas amarillas. Se cree que esta familia está relacionada con las *Grammitidaceae*, ya que ambas presentan soros generalmente redondeados, láminas simples a 1-pinnada (no marcadamente disectadas), hábito principalmente epífita y muchas especies con $n=37$. *Pecluma* y *Losxogramme* parecen ser intermedios (Guatemala. Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, 2007).

3. Calahuala.

La Calahuala (Calaguala) crece en toda la América tropical y semitropical. Aún cuando en los diferentes países o regiones se encuentran diferentes especies, todas son denominadas en común como Calahuales. En general la Calahuala es un helecho epífita u ocasionalmente terrestre; el rizoma es densamente escamoso, de color dorado o cobrizo, linear o linear lanceolado (Cronquist, 1987).

Estos helechos tienen una larga tradición de uso, especialmente en Honduras y Guatemala, donde se cultivan. El nombre Calahuala es del idioma quechua y significa «adorna juvenil» en alusión a un probable uso ornamental por parte de los jóvenes indígenas cuando iban a bailar o danzar ceremonialmente. Una de las primeras descripciones correspondió a *Polypodium decumanum*, la cual fue descrita por Willdenow en 1810 (Cronquist, 1987).

La Calahuala oriunda de Centroamérica, extendiéndose desde México hasta Suramérica (Bolivia y Brasil). Crece silvestre en sitios sombreados y húmedos, sobre troncos de palmeras, árboles de encino, en el suelo o sobre rocas cubiertas de musgo, en una altitud comprendida entre los 1200 - 2200 msnm. En la actualidad existen extensas plantaciones de

calaguala en la región centro-norte de Honduras (Lago de Yojoa) y otras en Guatemala (Cronquist, 1987).

La Calahuala *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger, *Phlebodium decumanum* (Willdenow) J. Sm. y *Serpocaulon triseriale* Swartz se ha empleado en Guatemala como medicina tradicional en el tratamiento de: anemias, artritis, cáncer de estómago, dolores renales, además de poseer propiedades depurativas, antialzheimer y antipsoriasis. Los rizomas de la planta se emplean para preparar una infusión. El 60 por ciento de la producción de Calahuala se destina al mercado internacional, principalmente Estados Unidos y Europa. Las exportaciones se iniciaron hace aproximadamente 20 años; en total, suman alrededor de 30 toneladas anuales, en tanto que el mercado local consume 20 toneladas anuales. El ingreso bruto generado por las exportaciones de Calahuala superan 140.000 \$EE.UU./año, y el consumo en el mercado local genera ingresos por 95.000 \$EE.UU (Robles, Oliveria & Villalobos, 2000).

a) *Phlebodium decumanum* (Willdenow) J. Sm. (*Polypodiaceae*).

i) *Denominación, sinónimos y equivalencias.*

- * Denominación: Fronde y rizoma de *Ph. decumanum*
- * Sinónimos: *Phlebodium aureum* L., John Smith; *Polypodium aureolatum* H&B; *Polypodium aureum* L.; *Polypodium decumanum* Wild.; *Polypodium leucotomos* Poir.; *Polypodium multiseriale* Stolze.
- * Nombres vulgares: Samambia (Brasil); Calahuala (Guatemala); Calaguala (Honduras); Polipodio, calaguala (Perú) (Stolze, 1981).

ii) *Descripción botánica.*

Helecho epífita con un rizoma rastrero y sinuoso, 8-15 mm de grueso, densamente cubierto con una pelusa dorado-café. Frondas separadas, arqueadas o esparcidas; sobre tallos brillantes, cafés, 15-30 cm de largo. Hojas ovado-oblongas, verde brillantes, amarillentas o azul-verdosas, 30-120 cm de largo, 20-40 cm de ancho, divididas en

segmentos puntiagudos oblongos, 10-30 cm de largo, 2-5 cm de ancho, algunas veces traslapadas (Morton, 1981) (Cáceres, 1996, p.105).

iii) Distribución y hábitat.

Nativas de centro América. Se encuentra generalmente en bosques, más frecuentemente en pastizales, prados o claros, crecen silvestres en troncos de palmas, árboles de encino y roca caliza desintegrada, en lugares de gran humedad a la sombra. Se encuentran desde México y centro hasta sud América en alturas de 1,200-2,200 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Suchitepéquez y Zacapa (Cáceres, 1996, p.105) (Stolze, 1981).

iv) Usos etnomédicos o tradicionales.

Las hojas y el rizoma seco están indicados para tratar afecciones gastrointestinales, respiratorias y cardíacas, dolor de huesos, reumatismo, diabetes, gota, hipertensión, purificar la sangre, parásitos, enfermedades venéreas, sífilis y afecciones renales, en el tratamiento de psoriasis, eczemas, dermatosis, vitíligo y estados de disfunción inmune. Tópicamente se usa para el tratamiento de contusiones, reumatismo, úlceras, quebraduras, cáncer, cierto tipo de tumores, psoriasis y eczema. La decocción de las hojas se usa para detener las hemorragias (Cáceres, 1996, p.105-106).

Se le atribuye propiedad analgésica, antihemorrágica, depurativa, diurética, desinflamante, emenagogo, espasmolítico, febrífuga, laxante, pectoral, purgante, sudorífica y tranquilizante (Cáceres, 1996, p.106).

v) Droga vegetal.

- * Denominación: *Phlebodium decumanum* (Willdenow) J. Sm.; Fronde, rizoma
- * Definición: Fronde y rizoma; seco y molido
- * Obtención: recolecta en vivero
- * Descripción macroscópica: no refiere
- * Descripción microscópica: no refiere

vi) Composición química.

Flavonoides en fronde; rutina, hyperósido, quercitrina y ácido clorogénico. Flavonoides en rizoma; rutina (Aldana, 2007).

vii) Monografía de control de calidad fisicoquímico e identificación.

- * Descripción macroscópica: no refiere
- * Descripción microscópica: no refiere
- * Características organolépticas: no refiere
- * Materia extraña <10%
- * Órganos ennegrecidos o deteriorados <10%
- * No debe presentar: partes de otras plantas, insectos, larvas, partículas de tierra.
- * Humedad por método gravimétrico <10%

viii) Ficha técnica de seguridad y eficacia.

- * Datos farmacológicos *in vitro*: presenta actividad inhibitoria muy buena sobre la actividad linfocítica e inhibición sobre ambas vías del sistema de complemento (Álvarez, 2006).
- * Estudios farmacológicos *in vivo*: Posee efectos antipsoriaticos (Portillo & Mendoza, 2002).
- * Estudio de toxicidad aguda: No tóxico para el humano.

b) *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger (*Polypodiáceae*).

i) *Denominación, sinónimos y equivalencias.*

- * Denominación: hoja y rizoma de *Phlebodium pseudoaureum*
- * Sinonimos: *Polypodium pseudoaureum* Cav., *Goniophlebium areolatum* (Humb. Et Bonpl. Ex Willd.) C. Presl., *Phlebodium aureum* auct., en parte (L.) J. Sm, *Polypodium areolatum* Humb. Et Bonpl. Ex Willd., *Polypodium areolatum* var. *Loreum* J. Bommer, *Polypodium aureum* auct., en parte L.

* Nombres vulgares: Calahuala, calaguala (Guatemala, Honduras, Panama.), Helecho azul, calaguala (Costa Rica), Polipodio (Cáceres, 1996, p.105).

ii) *Descripción Botánica.*

Rizoma de 0.7 – 1.5 cm de ancho, generalmente farinoso, escamas 5-8 mm subenteras a moderadamente denticuladas, la farina blanca, las escamas concoloras, generalmente anaranjadas, no clatradas; hojas monomorfas, pinnati-sectas, a menudo glaucas en el envés, articuladas al rizoma; con ápice atenuado, agudo o acuminado; pinnas de 10-33 x 1-3 cm, glabras en el envés, los márgenes engrosados y cartilagosos, enteros o casi enteros; nervaduras areo-ladas, las aréolas con o sin nérvulos incluidos; soros redondeados de color amarillo y se localizan en el envés de las láminas, sin parafisos, dispuestos en el ápice fusionado de 2 nérvulos incluidos, en 1-7 series entre la costa y el margen; esporas hialinas; $x = 37.4$ especies (Jiménez, 2010).

iii) *Distribución y hábitat.*

En Guatemala este helecho se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Suchitepéquez y Zacapa. (Stolze, 1981; CEMAT-FARMAYA, 1992) (Cáceres, 1996, p.105).

Nativas de centro América. Crecen silvestres en troncos de palmas, arboles de encino y roca caliza desintegrada, en lugares de gran humedad a la sombra. Se encuentran desde México y centro hasta sud América en alturas de 1,200-2,200 msnm (Stolze, 1981; Morton, 1981).

Especie epífita, ocasionalmente rupícola o terrestre. Es un helecho perenne, con producción anual de frondas ya que al final de la época lluviosa se secan y caen (Martínez, Bernal & Cáceres, 2000).

iv) *Usos etnomédicos o tradicionales.*

Tradicionalmente se ha empleado las hojas y rizomas secos, a los cuales se le atribuyen propiedades analgésicas, expectorante, febrífuga, tranquilizante, depurativa, diurética, antiinflamatoria y espasmolítica, así como también se emplea para el tratamiento del vitíligo (Navarrete, 2006; Gattuso, Cortadi & Gattuso, 2008).

v) *Droga vegetal.*

- * Denominación: *Phlebodium pseudoaureum*
- * Definición: Hojas secas y frescas, rizoma fresco y seco
- * Obtención: recolecta en vivero, ubicado en la Facultad de Agronomía
- * Descripción macroscópica: no refiere
- * Descripción microscópica: no refiere

vi) *Composición química.*

En las frondes se describen Rutina, Hyperósido, Quercitrina y Ácido Clorogénico y en el rizoma Ácido Clorogénico (flavonoides).

vii) *Monografía de control de calidad fisicoquímico e identificación.*

- * Descripción macroscópica: No refiere
- * Descripción microscópica: No refiere
- * Características Organolépticas: No refiere
- * Materia extraña <10%: No debe contener más
- * Órganos ennegrecidos o deteriorados: no debe contener más del 10%
- * Partes de otras plantas: No debe contener más del 10%
- * Insectos o larvas, partículas de tierra y otros considerados como materia extraña: no debe presentar
- * Humedad por método gravimétrico: < 10%
- * Cenizas totales: < 15%

viii) *Ficha técnica de seguridad y eficacia.*

- * Estudios farmacológicos in vitro: los extractos de frondas y rizomas de *Ph. pseudoaureum* presentan una actividad inhibitoria en la actividad linfoproliferativa, así como también sobre el sistema del complemento (Alvarez, 2006).
- * Estudios in vivo: No refiere
- * Estudios de toxicidad aguda: no toxico para el humano.

c) *Serpocaulon triseriale Swartz (Polypodiáceae).*

- * Denominación, sinónimos y equivalencias
- * Denominación: fronde y rizoma de *Serpocaulon triseriale*.
- * Sinónimos: *Goniophlebium triseriale*, *Polypodium triseriale*, *Polypodium brasiliense*, *Polypodium neriifolium*.
- * Nombres vulgares: Calahuala (Guatemala), Calaguala (Honduras), Polipodio, calaguala (Perú) (Morán, 1995).

i) *Descripción Botánica.*

Helecho terrestre, epipetrica, o más comúnmente epífita; rizoma largo rastrero, 0.4-1.2 cm. Grueso, amplia a densamente escamado, las escamas 3-6 mm. Largo, ovaló – acuminado a linear- atenuado, un poco aplanados en la base, pero extendidos en las puntas, de color marrón oscuro a negruzco o con un estrecho margen marrón claro, diminutamente clatrado, los márgenes subenteros o algo erosos; hojas aproximadamente o ampliamente espaciadas, 35-100 cm. Largas, 21-45 cm. En general, pecioladas, peciolo 12-36 cm. Largo, pajizo a café rojizo, glabro; lámina pinnada, deltoideo u oblongo-deltoideo, apenas o no reducido en la base, Frecuentemente tallos cortos, segmento apical, herbáceo firme a cartáceo, esencialmente glabro, pero el raquis y ocasionalmente con unas pocas costillas disperso, diminuto, oscuro, escamas filiformes abaxiales; pinnas en 4-10 pares, largas de 15 a 28 cm. Largas, 2 -4 cm. En general, ampliamente espaciadas, sésiles, o tallos proximales muy cortos, lanceoladas, obtuso a agudo o atenuada, cuneada en la base, pocos pares subapicales, los márgenes subenteros, ligeramente o no cartilagosos; venación regularmente aureolada, todas las distintas venas comúnmente prominentes los primarios se extiende de la costa a un ángulo de 40-50°, Recto o un poco flexible, las nervaduras

secundarias (conectadas) o oblicua arqueadas y se unen a las nervaduras primarias adyacentes para formar una serie de 3 -6 areolas entre costa y el margen de la pinna, estas son similares en tamaño y forma y cada una contiene únicamente, libre un soro redondo, que nacen en las puntas de las nervaduras libres, comúnmente en series de 2 a 3 entre la costa y el margen, esporangios glabros (Stolze, 1981, p. 423-424).

ii) *Distribución y hábitat.*

En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz; Chiquimula; Izabal; Petén; San Marcos; Santa Rosa, Sololá, Suchitepéquez; Zacapa. Florida; indias occidentales; sur de México a Panamá; de Colombia a Guyanas, en el sur de Brasil y Bolivia (Stolze, 1981, p. 423).

Se encuentra alturas de 500-2,600 msnm. Y también se han descrito en bosques, matorrales, y en barrancos boscosos, en troncos de árboles o en rocas cubiertas de musco o laderas rocosas, 50 – 1600 msnm (Stolze, 1981, p. 423).

Crece silvestre en troncos de palmas, árboles de encino y roca caliza desintegrada, en lugares de gran humedad a la sombra. Las condiciones climáticas bajo las cuales se encuentra la *Serpocaulon triseriale* se caracterizan por un clima templado, por época lluviosa no bien definida, alta nubosidad, estableciéndose las condiciones típicas de un bosque nuboso donde la precipitación horizontal es más frecuente en época seca, esta última condición se da en la posición noreste de las montañas (Stolze, 1981, p. 423).

La humedad relativa promedio requerida por la Calahuala es de al menos el 80%, esta condición ambiental es la que presenta menor variación a lo largo del tiempo, esta característica de variación se relaciona con el hábito y las condiciones de bosque nuboso. Calahuala requiere de condiciones particulares de cobertura de dosel para su establecimiento, crecimiento y desarrollo. (Morán, 1996, p. 356).

iii) *Usos etnomédicos o tradicionales.*

La infusión y decocción del rizoma se usan oralmente para tratar afecciones respiratorias y cardíacas, reumatismo, diabetes, gota, hipertensión, purificar la sangre y afecciones genitourinarias (Cáceres, 1996).

Tópicamente se usa la infusión en emplasto y cataplasma para el tratamiento de contusiones, reumatismo, úlceras, quebraduras, cáncer, cierto tipo de tumores y psoriasis. La decocción de las hojas se usa para detener las hemorragias (Cáceres, 1996).

Se le atribuye propiedad depurativa, diurética, desinflamante, espasmolítica, expectorante, febrífuga, inmunomoduladora, laxante, pectoral, purgante y sudorífica (Cáceres, 1996).

iv) *Droga vegetal.*

- * Denominación: *Serpocaulon triseriale* Swartz (Willdenow) J. Sm.
- * Definición: Fronde y rizoma; seco y molido
- * Obtención: recolecta en vivero
- * Descripción macroscópica: no refiere
- * Descripción microscópica: no refiere

v) *Composición química.*

Flavonoides en fronde; rutina, hyperósido, quercitrina y ácido clorogénico. Flavonoides en rizoma; hyperósido (Aldana, 2007).

ix) *Monografía de control de calidad fisicoquímico e identificación.*

- * Descripción macroscópica: No refiere
- * Descripción microscópica: No refiere
- * Características Organolépticas: No refiere
- * Materia extraña <10%: No debe contener más
- * Órganos ennegrecidos o deteriorados: no debe contener más del 10%
- * Partes de otras plantas: No debe contener más del 10%

- * Insectos o larvas, partículas de tierra y otros considerados como materia extraña: no debe presentar
- * Humedad por método gravimétrico: < 10%
- * Cenizas totales: < 15%

x) *Ficha técnica de seguridad y eficacia.*

Estudios farmacológicos in vitro: los extractos de frondas y rizomas de *Ph. pseudoaureum* presentaron una actividad inhibitoria en la actividad linfoproliferativa, así como también sobre el sistema del complemento (Alvarez, 2006).

- * Estudios in vivo: No refiere

xi) *Datos de seguridad clínica.*

Estudios de toxicidad aguda: no toxico para el humano.

J. Estudios previos sobre plantas medicinales

Entre las principales fuentes, sobre plantas medicinales de Guatemala y Suramérica, podemos mencionar los trabajos de Cáceres (2006), quien ha realizado diversas investigaciones sobre la flora guatemalteca en busca de terapias alternativas y tratamientos a base de extractos y tinturas de plantas medicinales, basando varias de sus investigaciones en el conocimiento tradicional popular de las plantas medicinales. En su publicación “Vademécum Nacional de Plantas Medicinales”, detalla una gama extensa de plantas medicinales de Guatemala, describiendo para cada una de ellas su Hábitat, Obtención, usos, propiedades medicinales, indicaciones terapéuticas, entre otros, que sin lugar a duda representan una rica fuente de información.

1. Estudios sobre usos y aplicaciones de calahuala.

Portillo & Mendoza (2002) estudiaron el efecto benéfico que presenta el extracto purificado de la hoja de *Phlebodium decumanum* contra la psoriasis y un placebo. El

estudio demostró que los efectos antipsoriaticos de la calaguala son significativamente superiores a los del placebo y que no produjo efectos indeseables ni alteraciones en la farmacodinamia cardiorrespiratoria, convirtiéndose por tanto en un medicamento efectivo y seguro en el tratamiento de la psoriasis.

Se ha comprobado que las Calahualas poseen actividad inmunomoduladora comprobada, tal como en el estudio de Alvarez (2006), donde concluye que ambas especies *Ph. pseudoaureum* y *Ph. decumanum* presentan una actividad inhibitoria muy buena sobre la actividad linfocítica *in vitro* e inhibición sobre ambas vías del sistema de complemento.

Matías (2008) realizó la caracterización fitoquímica y cuantificación de los flavonoides totales en extractos de rizoma y fronda de *Serpocaulon triseriale*, estableciendo la composición de flavonoides presente en los extractos obtenidos de sus frondas y rizomas, encontrando que entre los dos órganos estudiados de la planta la mayor concentración de flavonoides está presente en sus frondas.

González y colaboradores (2008) mencionan que el extracto de *Phlebodium decumanum* presenta actividad protectora contra la fatiga muscular en sujetos no entrenados, es decir que tiene un efecto amortiguador, que se evidenciad por niveles inferiores de creatinkinasa posterior a la ingesta de dicho extracto.

Saravia (2008) expone algunas de las plantas medicinales de Guatemala que han sido validadas para su uso farmacológico, entre ellas cita a *Polypodium aureum* de la cuál describe su uso popular como: desinflamante, espasmolítico, tónico, diurético y depurativo, así mismo describe que a esta planta se le han comprobado sus usos a través de las investigaciones como: diurético, antiinflamatorio e inmunomodulador.

2. Estudios sobre anatomía vegetal como herramienta en el control de calidad.

Arce, Buleta, Mayorga & Fernández (2001) describen la utilización de una cámara doméstica digital para la captura de microfotografías, la cual puede satisfacer las funciones para macro y microfotografías, con un gasto mucho menor que otras soluciones, a costa de sacrificar un poco la calidad, se accede a las muchas ventajas de la fotografía digital de una manera rápida, sencilla y barata que puede servir al servicio profesional. Esta técnica puede ser efectiva en la identificación y caracterización de especies vegetales y aportar datos importantes de cada especie en particular.

Varela & Gurni (2003) en el estudio realizado para llevar a cabo el control de calidad en *Ligaria cuneifolia* Tiegh y *Psittacanthus cordatus*, exponen que aun cuando las hojas enteras de *P. cordatus* difieren de las de *L. cuneifolia* pero la identificación se dificulta, pues se expenden muy fragmentadas, por lo que el objetivo de su estudio fue establecer parámetros micrográficos que diferenciaron las especies mediante técnicas sencillas como el disociado suave. Los caracteres anatómicos descritos resultan adecuados cuando se trata de determinar sustituciones de una droga por otra, ya sea en muestras fragmentadas de una sola especie o bien en mezclas, por lo cual proponen emplear estas metodologías para el control de calidad de muestras comerciales.

Meza, Sota & Ferrucci (2006) describen a *Phlebodium aureum* (L.) J. Sm. en Argentina, detallando por medio de ilustraciones sus principales caracteres morfológicos y anatómicos, así como también la relación de esta con: *Phlebodium areolatum* (Willd.) J. Sm. otra especie que crece en ese país. Con las descripciones que presentan puede hacerse una clara diferenciación entre ambos helechos, basándose únicamente en sus estructuras micromorfológicas. Comprobando así, que los caracteres morfoanatómicos son una herramienta clave para determinar la identidad de las plantas.

Cambi y colaboradores (2006) estudiaron la morfoanatomía de hojas, tallo y flores de *Pluchea sagittalis*, comentando que esta planta había sido descrita ya por otros autores, sin embargo ninguno de esos autores resaltó los diferentes tipos de pelos presentes en ella, por

lo que es el primero en describir la estructura de los pelos adoptando la nomenclatura propuesta por Ramayya. Afirmando que las características micromorfológicas observadas en tallo y hojas son útiles para identificar esta planta en muestras fragmentadas o enteras, ya sea frescas, secas o conservadas en formol-acido acético-alcohol etílico 96° (FAA) y que constituyen una herramienta importante para el control de calidad de muestras comerciales.

En Venezuela, Ely, Torres, Roda & León (2007) describieron por primera vez la estructura morfo-anatómica y estrategias hídricas de dos orquídeas de las selvas nubladas andinas de Venezuela, *Maxillaria miniata* y *Pleurothallis cardiantha*, donde utilizando cortes a mano alzada y técnicas micrográficas concluyeron, que ambas especies compensan las limitaciones de agua y nutrientes, particularmente durante los breves períodos de sequía, desarrollando estructuras de almacenamiento de agua y carbohidratos. En *Maxillaria miniata* éstas consisten en pseudobulbos, mientras que en *Pleurothallis cardiantha*, la misma lámina foliar desempeña ambas funciones, mediante el desarrollo de la hipodermis pluriestratificada y el parénquima esponjoso acuífero.

Petenatti y colaboradores (2007) realizaron la caracterización de *Baccharis sagittalis* y *B. triangularis* donde fueron utilizados los métodos micrográficos como control de calidad para la identificación de las dos especies. Dicha identificación se basó en el estudio anatómico y en la micrografía cuantitativa de las dos especies en estudio, comparando los caracteres macro- y micrográficos (Hábito, tallo, Nomofilos u hojas típicas, capítulos/inflorescencias y cipselas/fruto seco), así como los parámetros micrográficos (No. De estomas, Índice de estomas, Índice de empalizada, No. de islotes, No. de terminales de nerviación) de cada especie.

Guevara & Garzó (2008) describieron la morfoanatomía de los órganos vegetativos aéreos de *Desmoncus orthacanthos* con el fin de proporcionar información sobre las adaptaciones estructurales relacionadas a su ámbito, donde detallaron las características morfológicas adaptadas a su ámbito trepador comparándola con especies trepadoras del género *Calamus*. Encontrando que los ejes de *D. orthacanthos* son espinosos y tienen un diámetro promedio de 1,70 cm. Estas características son similares a las reportadas para

Calamus longipinna K. (Tomlinson *et al.* 2001); sin embargo, ésta posee espinas recurvas. *D. orthacanthos* presenta cirro sin espinas, que ayuda a la función trepadora junto a los acantofilos..

Sosa (2008) compara y describe la estructura anatómica de la hoja y el tallo de *Stemodia hassleriana* con la de otras especies del mismo género: *S. verticillata*; *S. erisifolia*; *S. palustris*; *S. lanceolata*; *S. hyptoides* y *S. stricta*. Evidenciando que la complementación de los caracteres morfológicos con los caracteres anatómicos de las hojas y tallos son de valor taxonómico para la diferenciación estas especies, en donde las características que identificaron a *Stemodia hassleriana* de las demás fueron que esta presenta tallo con seis costillas bien marcadas y cordones de colénquima subepidérmico en las mismas.

Bucciarelli, Hansen & Cambi (2009) realizaron observaciones de ejemplares de herbario, material disociado y secciones transversales seriadas de material restaurado de *Pluchea microcephala*, donde basándose en los caracteres microanatómicos de esta planta, concluyen que estos caracteres resultan ser una herramienta importante para el control de calidad en la identificación de esta especie con cualquier otra planta similar.

Según Turano & Cambi (2009) quienes citando a la Organización Mundial de la Salud (OMS), refieren que el 80% de la población mundial utiliza plantas medicinales como principal recurso para el cuidado de la salud. Por lo que dichos autores enfocan su investigación a los escasos controles de calidad que existen sobre la comercialización de hierbas medicinales en Argentina, decidiendo evaluar la información consignada en los rótulos y la identificación taxonómica de los componentes vegetales presentes en las mezclas adelgazantes de farmacias y principales herboristerías de la ciudad. Los controles los llevaron a cabo por medio de estudios micrográficos de cada muestra comercial, utilizando las siguientes técnicas: disociaciones débiles y/o fuertes y pruebas histoquímicas, también se realizaron diafanizados para el cálculo del índice de estomas, cortes a mano alzada y tinciones. Confeccionaron patrones comparativos y se registraron los caracteres diagnósticos mediante fotomicrografías con cámara digital. En varias de las muestras analizadas fueron encontrados contaminantes de diverso origen, elementos vegetales no

consignados en la etiqueta, así como de infracciones en lo que refiere al etiquetado (rótulo), lo que dio a conocer la carencia de control de calidad en estos productos.

IV. JUSTIFICACIÓN

La medicina tradicional ha sido utilizada desde tiempos antiguos por diversas culturas a nivel mundial, actualmente existe un creciente interés por retomar estos recursos naturales como alternativa terapéutica en las enfermedades, pero empleando los mismos estándares de calidad con los que se producen los medicamentos de síntesis química.

La población guatemalteca en general, utiliza una amplia variedad de plantas medicinales en el tratamiento de enfermedades, algunas especies por su similitud, son agrupadas bajo un mismo nombre vernáculo, como es el caso del helecho conocido popularmente como Calahuala, nombre que agrupa a varias especies. La importancia de establecer correctamente la identidad de cada especie radica en que, aunque sean especies muy similares no siempre contienen los mismos principios activos y por ende su acción farmacológica puede ser diferente.

Otro aspecto importante es conocer que parte de la planta contiene la droga vegetal o principio activo deseado, ya que no todos los principios activos están distribuidos uniformemente en las plantas, por lo que su localización optimiza la eficacia de los productos naturales.

Este estudio se ha enfocado en determinar las características macro y micromorfológicas de tres especies de este helecho: *Phlebodium decumanum*, *Phlebodium pseudoaureum* y *Serpocaulon triseriale* y además establece su perfil fitoquímico. La importancia de realizar la caracterización de estas tres especies botánicas, es que con los resultados se podrán establecer normas de referencia para el control de calidad de su material vegetal fresco y seco, es decir, garantizar la identificación correcta de cada una de las especies popularmente denominadas como Calahualas tanto para su uso medicinal como para su comercialización.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo general

- * Caracterizar tres especies botánicas de helechos, utilizados popularmente como Calahuala en Guatemala.

B. Objetivos específicos

- * Elaborar una descripción botánica diagnóstica de cada una de las tres especies de Calahuala utilizadas en el estudio para su correcta identificación en el campo.
- * Identificar los metabolitos secundarios de las plantas en estudio, utilizando métodos histoquímicos y por cromatografía en capa fina, que faciliten el control de calidad y la diferenciación entre especies.
- * Preparar muestras patrón de la droga vegetal seca (fronde y rizoma) y del material fresco (ejemplares de herbario) de las tres especies de Calahuala en estudio que garanticen el uso correcto de cada especie en futuros estudios.
- * Establecer parámetros microscópicos diagnósticos de fronde y rizoma, útiles para el control de calidad y elaboración de cartillas micrográficas de las drogas secas de las tres especies en estudio.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo y muestra

1. Universo.

Helechos de la familia Polypodiaceae que se utilizan en la medicina popular guatemalteca como Calahuala.

2. Muestra.

Material vegetal de *Phlebodium decumanum*, *Phlebodium pseudoaureum*, y *Serpocaulon triseriale*, hoja y rizoma, fresco y seco respectivamente (secado a la sombra).

B. Recursos

1. Humanos.

* Seminaristas:

Br. Deivy Alexander Mazariegos Pérez

Br. María de los Ángeles Abarca Nerio

* Asesora: M.A. Q.B. María Eugenia Paredes Sánchez

* Co-asesor: Dr. José Vicente Martínez Arévalo

* Revisor: M.A. Q.B. Isabel Cristina Gaitán Fernández

2. Institucionales.

* Herbario BIGU de la escuela de Biología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

* Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

* Laboratorio de investigación de productos naturales (LIPRONAT).

* Laboratorio de Ecología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

C. Equipo

- * Balanza Analítica
- * Balanza de humedad
- * Cámara fotográfica
- * Contador mecánico
- * Cromatógrafo de capa fina
- * Desecadora
- * Estereoscopio
- * Estufa
- * Horno
- * Microscopio óptico
- * Mufla
- * Percolador
- * Refrigerador
- * Rotavapor

D. Utensilios y cristalería

- * Agujas de disección
- * Algodón
- * Beaker
- * Bolsas con cierre hermético
- * Bulbo de hule
- * Caja de petrí
- * Cinta adhesiva
- * Cromatoplaca
- * Cubreobjetos
- * Cuchilla corta papel
- * Erlenmeyer
- * Esmalte de uñas
- * Espátulas
- * Goteros
- * Hojas de afeitar (Gillette)
- * Lápices y lapiceros
- * Marcador indeleble
- * Papel aluminio
- * Papel filtro
- * Papel limpia-lentes
- * Papel mayordomo
- * Papel periódico
- * Pinzas de crisol
- * Pinzas de metal
- * Pipetas pasteur
- * Portaobjetos
- * Prensa de madera
- * Probetas graduadas
- * Tijeras
- * Varilla de agitación
- * Vidrio de reloj

E. Reactivos

- * Ácido sulfúrico concentrado
- * Agua destilada
- * Alcohol etílico al 95%
- * Azul de cresil brillante al 1%
- * Dragendorff
- * Gelatina - glicerina
- * Hidrato de cloral
- * Hidróxido de sodio
- * Hipoclorito de sodio (comercial)
- * Reactivo de lugol
- * Safranina - Fast Green
- * Safranina al 1%
- * Sudan IV saturado
- * Sulfato férrico

F. MÉTODOS

1. Recolección de muestra.

Como primera fase, se procedió al riego diario de las plantas para inducir el crecimiento de las frondes en las tres especies botánicas estudiadas, hasta obtener frondes con soros.

Las colectas se efectuaron a intervalos de tiempo diferentes, según se fueron analizando, se tomó en cada colecta una sola especie; con el fin de obtener el material vegetal fresco para la realización del análisis microscópico e histoquímico, los cuales se realizaron en el laboratorio de fisiología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Para la conservación de la materia vegetal se procedió a colocar las muestras en cámara húmeda en recipientes herméticos, mientras se realizaba la caracterización en fresco de los helechos.

Las partes colectadas de las plantas fueron; las frondes (hojas de los helechos) y los rizomas, en cantidad suficiente para efectuar la caracterización de las mismas, elaboración de extractos y para depositar la materia vegetal herborizada en el herbario BIGU.

Una porción de la muestra de *S. triseriale* fue puesta a desecar a la sombra para obtener los extractos etanólicos de las frondes y el rizoma de esta especie. Los extractos de *Ph. decumanum* y *Ph. pseudoaureum* fueron obtenidos de la colección del Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, Facultad de CC QQ y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

2. Descripción de las características organolépticas.

Se describieron las características organolépticas como el color, olor y aspecto macromorfológico, tomando nota de todos aquellos caracteres que se consideraron de utilidad para la correcta identificación del material vegetal en fresco y en seco.

3. Descripción de las características micromorfológicas e histológicas.

a) *Corte a mano alzada.*

Se utilizó la técnica de corte a mano alzada en frondes y rizomas frescos, para el estudio microscópico, que sirvió para observar la disposición de los tejidos que la conforman y revelar las características botánicas diagnósticas de cada especie, además esta técnica se utilizó para identificar los metabolitos secundarios que presentan. Los cortes se realizaron de forma transversal a las frondes y rizomas, estos fueron procesados de la siguiente manera:

- * Se colocó un trozo de fronde en medio de dos trozos de duroport, para los rizomas no se empleó duroport.
- * Sosteniendo fuertemente con una mano el material a cortar, ya acondicionado en el duroport y con la otra mano se deslizó de manera perpendicular con una hoja de afeitar nueva marca Gillette en buenas condiciones.
- * Se empleó un vidrio de reloj con agua para la colecta de los cortes que se iban realizando.
- * Los cortes más delgados y parejos se recolectaron con la ayuda de una aguja de disección, colocándolos en láminas portaobjetos.

- * Luego fueron teñidos con safranina y/o fast Green; estos cortes se emplearon también para las reacciones histoquímicas empleando reactivos para identificar metabolitos secundarios.
- * Se observaron al microscopio para identificar las características botánicas diagnósticas y para determinar la presencia o ausencia de metabolitos secundarios (Castillo & Pérez, 2011, POE No. 1).

b) *Disociado débil.*

El disociado débil es utilizado principalmente para hojas, tallos herbáceos y cortezas comerciales. La finalidad es disgregar o separar los tejidos de un órgano vegetal específico y así poder observar por separado las células y estructuras que lo conforman en conjunto con otras técnicas microscópicas especializadas brinda un medio valioso que asegura la calidad de la droga.

Para la realización del disociado se utilizaron muestras secas de frondes y rizomas de cada especie, siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- * Los rizomas y frondes fueron desecados en horno a 45°C por 72 hrs.
- * El material vegetal se pulverizó hasta obtener trozos muy pequeños del material.
- * Se colocó en un cristalizador que contenía solución de hidróxido de sodio al 5% y se hirvió durante 15 minutos.
- * Con agua destilada se lavó hasta que el líquido quedó limpio.
- * Se procedió a teñir según técnica de coloración; safranina y/o fast green.
- * Una pequeña cantidad del material se trasladó a un portaobjetos.
- * Se agregó dos a tres gotas gelatina-glicerina y se cubrió suavemente con un cubreobjetos procurando no originar burbujas.
- * Los extremos del cubreobjetos se sellaron utilizando esmalte para uñas (Castillo & Pérez, 2011, POE No.4).

Las láminas preparadas se observaron en microscopio óptico donde se buscaron estructuras diagnósticas de cada especie, a los hallazgos encontrados se les tomaron microfotografías para dejar constancia de los resultados obtenidos.

4. Coloración con safranina y fast green.

El procedimiento que se empleó para teñir los tejidos y lograr una correcta identificación de las estructuras micromorfológicas, fue el siguiente:

- * Selección de los cortes más finos del material vegetal.
- * Se sumergió el material en un vidrio de reloj conteniendo safranina al 1% y/o Fast Green durante aproximadamente 3 minutos.
- * Con la ayuda de una aguja de disección se retiró el material vegetal que fue coloreado y se trasladado a un portaobjetos.
- * Se agregó una a dos gotas de gelatina-glicerina y se cubrió suavemente con un cubreobjetos procurando no originar burbujas.
- * Los extremos del cubreobjetos fueron sellados utilizando esmalte para uñas. Las mejores láminas obtenidas, se guardaron en la colección del Laboratorio de Bioensayo de la Facultad de CC QQ y Farmacia (Castillo & Pérez, 2011, POE No.3).

Estas tinciones se utilizaron para la observación de cortes histológicos, disociado y diafanizado del material vegetal, donde se tomó nota de las estructuras de utilidad para la identificación de cada una de las especies, además se tomaron microfotografías con cámara digital que se colocaron como constancia de los resultados obtenidos.

5. Elaboración de cartillas de identificación.

Se realizaron cartillas micrográficas con base en las microfotografías tomadas a los cortes transversales que se hicieron tanto de fronde como rizoma. Estas cartillas brindan información necesaria para la identificación de características botánicas diagnósticas.

6. Pruebas histoquímicas.

Se seleccionaron los cortes transversales más finos de fronde y rizoma, colocando dichos cortes sobre un portaobjetos, para luego proceder a investigar la presencia de los compuestos químicos de interés: grasas y aceites (Sudán IV), Mucílagos (azul de cresil

brillante), almidones (lugol), saponinas (ácido sulfúrico), Taninos (sulfato férrico) y alcaloides (dragendorff), como se detalla a continuación:

a) *Grasas y aceites.*

- * Se agregó una gota de reactivo sudan IV y se dejó actuar por 10 minutos.
- * Lavamos, transfiriendo a un vidrio de reloj que contenía alcohol al 70°.
- * Se colocó el corte en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos.
- * Este se llevó al microscopio para observar la presencia o ausencia de reacción.
- * Una coloración roja o rosada se consideró como positivo (Castillo & Pérez, 2011, POE No.6).

b) *Mucílagos.*

- * A los cortes se les agregó una gota de azul de cresil al 1% y se transfirió a otro portaobjetos con una gota de agua destilada.
- * Luego se observó al microscopio la presencia o ausencia de reacción.
- * Una coloración azul Francia fue considerada como positivo (Castillo & Pérez, 2011, POE No.6).

c) *Almidón.*

- * A los cortes se les agregó una gota de lugol y se colocó un cubreobjetos.
- * Se observó al microscopio la presencia o ausencia de reacción.
- * La presencia de gránulos color azul- violáceo en el citoplasma de las células se consideró como positivo (Castillo & Pérez, 2011, POE No.6).

d) *Saponinas.*

- * A los cortes se les agregó una gota de ácido sulfúrico concentrado y se colocó un cubreobjetos.
- * Se observó al microscopio la presencia o ausencia de reacción.
- * La aparición de una coloración amarilla inmediatamente, que a los 30 minutos cambia a rojo y finalmente a azul verdoso o lila fue considerada como positivo (Castillo & Pérez, 2011, POE No.6).

e) *Taninos.*

- * A los cortes se les agregó una gota de sulfato férrico.
- * Se dejó actuar por 3 a 5 minutos y se le colocó un cubreobjetos.
- * Se observó al microscopio la presencia o ausencia de reacción.
- * Una coloración azul- verdosa fue considerada como positivo (Castillo & Pérez, 2011, POE No.6).

f) *Alcaloides.*

- * A los cortes se les agregó una gota del reactivo de dragendorff, dejándolo actuar por 5 minutos y se les colocó un cubreobjetos.
- * Se observó al microscopio la presencia o ausencia de reacción.
- * La presencia de un precipitado rojo ladrillo fue considerado como positivo (Castillo & Pérez, 2011, POE No.6).

7. Técnica de diafanizado.

El diafanizado es el resultado de la aclaración o eliminación completa de cualquier tipo de plastidio, para poder observar de manera más clara las estructura epidérmicas que presentan las hojas, tal como células normales, estomas, tricomas, entre otros elementos propios y característicos que permiten la identificación de las especies vegetales. El procedimiento que se realizó es el siguiente:

- * Se colocó al menos cuatro cortes de 3x5cm aproximadamente de la fronde a estudiar, en un cristalizador con alcohol al 96°.
- * Este se llevó a ebullición durante 3 horas aproximadamente, hasta que ya no se observó coloración verde en las frondes.
- * Las frondes se transfirieron a una solución de partes iguales de alcohol al 96° e hidróxido de sodio al 5% y se llevaron a ebullición por 20 minutos.
- * El material se lavó con agua destilada tibia varias veces hasta que el agua quedó totalmente limpia.
- * Se pasaron las frondes a una caja de petri que con una solución de hipoclorito de sodio al 50% hasta que las frondes quedaron transparentes.

- * Las frondes fueron lavadas con agua destilada varias veces hasta eliminar el hipoclorito de sodio.
- * Se procedió a colorear con las técnicas de coloración de safranina y/o fast green.
- * Cada trozo de fronde se trasladó a un portaobjetos, dejando algunas preparaciones hacia la cara abaxial y otras hacia la cara adaxial.
- * Se agregó de dos a tres gotas de gelatina-glicerina y se cubrieron suavemente con un cubreobjetos procurando no originar burbujas.
- * Los extremos de los cubreobjetos se sellaron utilizando esmalte para uñas (Castillo & Pérez, 2011, POE No.6).

Se incluyeron láminas fijas de las muestras trabajadas a la colección del departamento de citohistología de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la universidad de San Carlos de Guatemala.

8. Índice de estomas.

El cálculo del índice de estomas se llevó a cabo en las frondes de: *Ph. decumanum*, *Ph. pseudoaureum* y *S. triseriale* aportando datos para la diferenciación entre especies. El material vegetal diafanizado se trasladó al microscopio con objetivo de 40X, cuidando que la epidermis inferior estuviera orientada hacia arriba, luego por cada 100 células observadas se contaron los estomas presentes; para facilitar el conteo se escribió en una hoja en blanco una cruz y un círculo por cada célula epidérmica y estoma observado respectivamente. Para cada muestra se realizaron 15 determinaciones diferentes y se calculó la media aritmética. El resultado se calculó de la siguiente manera:

$$I = \frac{S \times 100}{E + S}$$

I: el índice de estomas.

S: el número de estomas en una superficie determinada de la hoja.

E: el número total de células epidérmicas en la misma área (Gattuso & Gattuso, 1999).

9. Parámetros de calidad de la droga seca.

Con la finalidad de comprobar la calidad de la droga seca, que garantizó la confiabilidad de los resultados obtenidos, previo a la obtención de extractos, se determinó si ésta reunía los criterios establecidos por la OMS, ya que éstos resultados podrán servir de base para futuras investigaciones. Los parámetros analizados fueron; el porcentaje de humedad y cenizas totales.

a) *Humedad.*

La humedad de una muestra no es sólo el contenido de agua. Por humedad del material se entiende toda materia volátil, que se elimina por calentamiento, conduciendo a la pérdida de peso de la muestra, entre dichas sustancias tenemos: agua, grasas, aceites, alcoholes, disolventes, materias aromáticas, componentes volátiles, productos de descomposición (Cruz, 2005. POE No. 4).

El exceso de agua en drogas vegetales es el responsable de la hidrólisis de sus constituyentes y del crecimiento de microorganismos. Con pocas excepciones, el contenido de agua en estas drogas debe variar entre 8 y 12% (Cruz, 2005. POE No. 4).

i) *Preparación de muestras.*

Se seleccionó una parte representativa de la cantidad total como muestra. Se intentó evitar toda influencia de calor al moler la muestra: el calor produce pérdida de humedad.

Se utilizaron sólo platillos de muestra desechables, distribuyendo la muestra en el platillo creando una capa fina y homogénea (5 a 15gramos) (Cruz, 2005. POE No. 4).

ii) *Determinación de humedad.*

- * Para esto se procedió a encender la balanza de humedad.
- * Se colocó el platillo con la muestra.

- * Se tapó el platillo de muestra y se taró.
- * La pesada inicial se anotó en un cuadernillo.
- * Luego se procedió a dar inicio a la balanza de humedad y se anotó el peso final de la muestra y la humedad de la misma (Cruz, 2005. POE No. 4).

b) *Cenizas totales.*

Esta prueba se realizó sobre el material pulverizado, el contenido de cenizas proporciona una idea sobre el contenido total de minerales en la muestra. El método empleado se detalla a continuación:

- * Después de corroborar que el porcentaje de humedad de las muestras estaba entre 8 y 12%, las muestras se pesaron en una balanza analítica, para obtener un aproximado de 1.0000grs de material secado al aire, en un plato de evaporación, el cuál se taró previamente.
- * Las muestras se incineraron, suavemente al inicio y gradualmente se incrementó la temperatura a $625\pm 25^{\circ}\text{C}$, hasta estar libre de carbón y se determinó el peso de las cenizas.
- * Luego, las muestras se enfriaron en un desecador, se pesó la ceniza, y se calculó el porcentaje de ceniza total a partir del peso utilizado de la droga (Gattuso & Gattuso, 1999).

10. Obtención de extractos.

a) *Percolación.*

Para la obtención de los extractos se realizó como primer paso la percolación, esta consiste en hacer pasar el disolvente (alcohol 95%) a través de la droga vegetal hasta su extracción completa. La percolación simple comprende la extracción exhaustiva de la droga con el disolvente siempre renovado. En pequeña escala, la percolación se realiza en aparatos denominados percoladores, de cuerpo cilíndrico o cónico, provistos de un grifo en la parte inferior, para regular el flujo de solvente. El procedimiento que se empleó fue el siguiente:

- * En un percolador previamente limpio y seco, se colocó un poco de algodón en la parte inferior y papel filtro cortado de acuerdo al diámetro del percolador.
- * Se pesó la cantidad de materia vegetal empleado para la extracción, utilizando un vaso de precipitar.
- * El material vegetal se humedeció con el disolvente adecuado para la extracción, utilizando un vaso de precipitar.
- * Luego el material vegetal se transfirió al percolador y se agregó disolvente hasta cubrir el material vegetal por completo, tapándolo bien en la parte superior del percolador.
- * Las muestras se dejaron reposar en el percolador durante 2-3 días antes de llevar a cabo la extracción.
- * Se abrió la llave de la parte inferior y se dejó gotear el líquido a una velocidad adecuada, recogiéndolo en un Erlenmeyer y se añadió suficiente disolvente extra, hasta que se obtuvo el volumen de disolvente agregado al inicio.
- * El material sólido que quedó, se presionó fuertemente y el líquido obtenido se añadió al percolado obtenido anteriormente (Cruz, S., 2005. POE No. 1).

b) *Concentración usando rotavapor.*

La concentración representa la etapa siguiente al proceso de percolación. Con el proceso de concentración se busca aumentar el contenido de sólidos totales en el extracto. El procedimiento que se empleó fue el siguiente:

- * Se colocó el balón colector y se fijó con la llave respectiva.
- * El nivel de agua del baño de calentamiento se revisó que fuera correcto.
- * La temperatura en el baño de calentamiento se mantuvo entre 50-60°C.
- * Se colocó el balón con la muestra y se sujetó al vástago con la llave correspondiente.
- * El rotavapor se encendió y se puso a girar el balón que contenía la muestra a una revolución adecuada.
- * Se revisó que el sistema de enfriamiento funcionara correctamente y se encendió la bomba de vacío durante el tiempo necesario para concluir con la destilación.
- * La bomba de vacío se encendió y apagó las veces necesarias hasta que se agotó el disolvente del balón de evaporación o ya no destilaba ningún líquido.

- * Se recomienda aplicar vaselina al vástago rotatorio, a todas las llaves y juntas esmeriladas (Cruz, 2005. POE No. 1).

Al terminar el proceso, se trasvasó el extracto del balón a un cristizador, colocándolo en un desecador, donde se quedó entre 7 y 8 semanas aproximadamente hasta que tuvo una consistencia pegajosa, luego se trasladó a un frasco ámbar pequeño donde se conservó en refrigeración.

11. Tamizaje Fitoquímico.

Se realizó cromatografía en capa fina para los siguientes metabolitos: alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, mucilagos, utilizando los extractos previamente obtenidos de *S. triseriale* y los obtenidos de la colección del Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, Facultad de CC QQ y Farmacia de la USAC. Utilizando los siguientes procedimientos para las pruebas cromatográficas:

a) *Investigación de Alcaloides.*

Se disolvió una pizca de extracto en 1mL de metanol y luego se aplicó 20 µL en una placa de sílica gel 60 F₂₅₄, utilizando como estándar una fase móvil: tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10); acetato de etilo-metanol-agua (100:13:5:10), cloroformo-dietilamina (90:10); acetona-agua-amonio concentrado (90:7:3)

Detección: Sin tratamiento químico se utilizó UV 254 nm en busca de fluorescencia, con UV 365 nm algunos fluorescen azul o amarillo.

Reactivo de Drangendorff: zonas cafés o naranjas en vis, los colores no son estables.

b) *Investigación de Cumarinas.*

Una pizca del extracto se disolvió en 1ml de metanol. Luego se aplicó 20 µL en una cromatoplaqueta de sílica gel 60 F₂₅₄. Utilizando como estándar canela en metanol al 1%, umbeliferona, ácido procumárico, cumarina.

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7).

Detección: Sin tratamiento químico UV a 254 nm fluorescencia. UV 365 nm todas las

cumarinas deben mostrar una intensa fluorescencia azul o verde-azul.

Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10%. UV-365 nm fluorescencia azul o verde.

c) *Investigación de Flavonoides.*

Se disolvió una pizca del extracto en 1ml de metanol y se aplicó 20 µL sobre las cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄. Como estándar se empleó solución de flavonoides al 0.05% en metanol (10 microlitros) (Quercetina, rutina, ácido clorogénico, hiperósido).

Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido glacial-agua (100:11:11:27), N-butanol-ácido acético-agua (40:7:3:30:10).

Detección: Sin tratamiento químico: UV 254 nm se observa fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV 365 nm, dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde.

Al agregarle el reactivo de productos Naturales (NP/PEG). Fluorescencia intensa en UV-365 nm.

Solución 1: solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina (NP)

Solución 2: solución etanólica al 5% de polietilenglicol 4000 (PEG)

Se aplicó a la placa vapores de amoníaco para intensificar el color de las manchas

d) *Investigación de Saponinas.*

Se disolvió una pizca del extracto en 1ml de metanol, se procedió a aplicar 20 microlitros en una cromatoplasma de sílica gel 60 F₂₅₄. Como estándar se utilizó saponinas al 0.1 por ciento en metanol (10 microlitros).

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (64:50:10), n-butanol-ácido acético (50:10:40)

Detección: Con el reactivo de sangre, se buscaron zonas hemolíticas blancas en fondo rojo

Con estos extractos también se realizaron pruebas fitoquímicas en tubo, realizando tres repeticiones por prueba, empleando para ello el espacio físico, aparatos e instrumentos del LIPRONAT. El procedimiento para las pruebas fitoquímicas en tubo se realizó de la siguiente manera:

e) *Investigación de cumarinas en tubo.*

Se mezcló una pizca del extracto vegetal etanólico con 1ml de agua destilada hirviendo. Con un capilar se aplicaron dos gotas de la mezcla sobre un papel filtro dejando dos manchas sobre el mismo. A una mancha se le agregó 1 gota de hidróxido de potasio 0.5 N y la otra se dejó como control negativo, luego se observaron bajo luz UV de 365nm (fluorescencia azul o verde: positivo).

f) *Investigación de taninos en tubo.*

Se extrajo 1g del extracto de material vegetal y se disolvió en 25ml de agua caliente agitando con varilla y se dejó enfriar. Se agregó 1 ml de solución de cloruro de sodio al 10% y se filtró, luego se adicionó 3 ml del filtrado en 4 tubos de ensayo:

Tubo 1: testigo

Tubo 2: Se agregó de 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1% (p/v)

Tubo 3: Se agregó de 4 a 5 gotas de gelatina-sal (1% de gelatina y cloruro de sodio al 10%)

Tubo 4: Se agregó de 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10% (p/v)

Para la lectura de los resultados se observó la formación de precipitado y/o cambio de coloración. En los tubos con cloruro férrico un cambio de color a grisáceo-negro significa que hay presencia de catecol; y negro-azulado: pirogalol.

G. Diseño de la investigación

1. Tipo de investigación.

Se realizó un estudio transversal, descriptivo, observacional.

2. Muestra.

Las especies estudiadas fueron recolectadas de la colección existente en los campos experimentales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, donde se empleó un muestreo por conveniencia, utilizando aproximadamente 500g de la droga vegetal por especie, incluyendo frondes y rizomas.

3. Análisis de resultados.

a) *Cualitativos.*

Se describieron las características macroscópicas y microscópicas observadas, también se indicó la presencia o ausencia de metabolitos secundarios de acuerdo a los análisis químicos realizados al material vegetal, realizando por conveniencia cinco réplicas en las pruebas histoquímicas, tres réplicas para las pruebas fitoquímicas y una para el análisis cromatográfico, describiendo los hallazgos de los metabolitos secundarios presentes en cada especie.

b) *Cuantitativos.*

Para las variables cuantitativas de humedad y cenizas se realizaron cinco réplicas, y para la variable del índice de estomas se realizaron quince réplicas. Estableciendo medidas de tendencia central, media, mediana, desviación estándar y rango.

Se analizaron los resultados de forma descriptiva para cada especie, reportándose en textos, tablas, fotografías y dibujos con las características anatomorfológicas y químicas halladas según se consideró conveniente.

VII. RESULTADOS

A. Recolección de la muestra

Los ejemplares fueron recolectados de la colección de Calahualas que se encuentra en el vivero de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (FAUSAC), ubicado a 1550 metros sobre el nivel del mar (msnm). Los ejemplares se llevaron al Herbario de Biología de Guatemala (BIGU), donde fueron identificadas las especies según la flora de Guatemala. Además se herborizaron y se depositaron dos muestras por especie, siendo ingresadas al libro de inventario como sigue; *Ph. decumanum* (Willd.) J. Sm. Familia polypodiaceae adjudicándole el número de Boucher 61737, *Ph. pseudoaureum* (cav) Lellinger familia polypodiaceae a la que se le adjudicó el número de Boucher 64555 y *S. triseriale* (Sw.) A.R. Sm. Familia polypodiaceae adjudicándole el número de Boucher 64557.

B. Descripción macroscópica y organoléptica

1. *Phlebodium decumanum*.

Helecho epifito con rizoma superficial, rastrero, carnoso, densamente cubierto de vellosidades de color café rojizo brillante, el rizoma posee un olor fragante y terroso. Sus frondes frescas son color verde musgo, tienen olor fragante y sabor picante, nacen del rizoma horizontal, las cuales poseen textura cartácea, tienen una pinna laciniada. El tipo de venación primaria es pinnada reticulada y venación secundaria pinnada semicraspedódroma. El foliolo es pinnatisecto con pinas anchas y gruesas, el margen del foliolo es ondulado. Tipo de inflorescencia: soros desnudos (sin indusio), presenta de 3 a 7 series de soros a cada lado del raquis.

Las frondes secas se tornan de un color verde olivo y quebradizas con un olor herbal característico, su rizoma al secarse adquiere un color café claro con una textura elástica y un olor suave a madera ligeramente dulce.



Figura 1: Fronde de *Phlebodium decumanum*



Figura 2: Rizoma de *Phlebodium decumanum*



Figura 3: Fronde seco de *Ph. decumanum*.



Figura 4: Rizoma seco de *Ph. decumanum*

2. *Phlebodium pseudoaureum*.

Helecho epifito con rizoma superficial, terrestre, carnoso, cubierto por vellosidades pegadas a él de color café-rojizo con olor ligeramente fragante. Las frondes frescas tienen un olor a pasto recién cortado y un sabor ligeramente amargo y picante, estas nacen del rizoma horizontal con un desarrollo acrópeto, posee una hoja compuesta pinna pinnatífida, la nerviación es pinnada reticulada, el ápice del foliolo es obtuso. Tipo de inflorescencia: soros desnudos, presenta 1 serie de soros a cada lado del raquis.

Las frondes secas se tornan color café y verde olivo en sus caras adaxial y abaxial respectivamente, son quebradizas y poseen un ligero aroma dulce, el rizoma seco tiene un color café-madera y una textura elástica semi-quebradiza.



Figura 5: Fronde de *Ph. pseudoaureum*



Figura 6: Rizoma de *Ph. pseudoaureum* con un báculo circinado.



Figura 7: Fronde seco de *Ph. pseudoaureum*



Figura 8: Rizoma seco de *Ph. pseudoaureum*

3. *Serpocaulon triseriale*.

Helecho epifito con rizoma superficial, terrestre, carnoso, con escasas vellosidades o sin ellas, las cuales son color marrón oscuro, posee olor herbal agradable. La fronde tiene aspecto cartáceo, glabro, olor fragante, sabor picante, sus pinnas están separadas una de otra (pinna pinnatisecta), venación primaria pinnada reticulada, venación secundaria semicraspedódroma, su ápice es acuminado, el margen del foliolo es sinuoso (con ondulaciones). Tipo de inflorescencia que presenta; soros desnudos, presenta de 2 a 3 series de soros a cada lado del raquis.

Las frondes secas se tornan de color verde olivo y se vuelven quebradizas, con un olor ligeramente dulce, su rizoma al secarse adquiere un color café-rojizo bastante vivo y quebradizo con un aroma ligeramente dulce.



Figura 9: Fronde de *S. triseriale*



Figura 10: Rizoma de *S. triseriale*



Figura 11: Fronde seco de *S. triseriale*



Figura 12: Rizoma seco de *S. triseriale*

C. Descripción microscópica

1. Descripción de las características micromorfológicas de los cortes a mano alzada y disociado en frondes y rizoma.

a) *Fronde de Phlebodium decumanum.*

En el corte transversal (CT), la nervadura principal de *Ph. decumanum* presenta una forma elíptica vertical respecto al foliolo, las células de la epidermis son monoestratificadas irregulares, más altas en la cara adaxial con paredes anticlinales rectas y periclinales curvas, cubierta por una cutícula muy delgada en la cara adaxial, toda la lámina está formada por parénquima esponjoso de tipo clorenquimático, donde se pueden encontrar haces anficribales de las nervaduras secundarias (figura 13); en ambas caras de la nervadura principal se encuentra colénquima laminar de 4-6 capas de células y un parénquima lagunoso. En la parte central de la nervadura principal se encuentra una meristela o haz anficribal donde se observó el xilema con forma de X, rodeado por el floema, seguido de un periciclo de 1 o 2 estratos de células que delimitan al floema, rodeando a este se encuentra una endodermis monoestratificada que a su vez está rodeada por una vaina de células engrosadas en forma de U, estas últimas se observan de color pardo-café (figura 14).

Los soros se localizan en la cara abaxial del foliolo, no presentan indusio y los esporangios maduros están unidos por el pedicelo, el anillo de dehiscencia recubre la cápsula que contiene las esporas (figura 15).

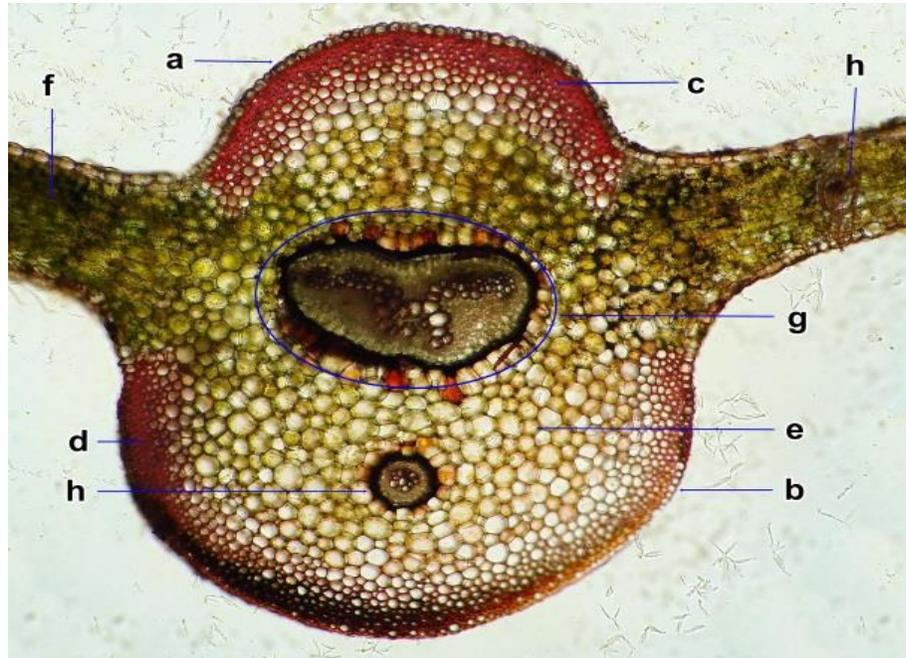


Figura 13: CT nervadura principal de *Ph. decumanum*; **a.** epidermis adaxial con cutícula **b.** epidermis abaxial **c.** colénquima laminar adaxial **d.** colénquima laminar abaxial **e.** Parénquima lagunoso **f.** Parénquima esponjoso de tipo clorénquimático (mesófilo) **g.** haz anficribal primario **h.** haz anficribal de nervadura secundaria. Tinción: safranina. 100 X.

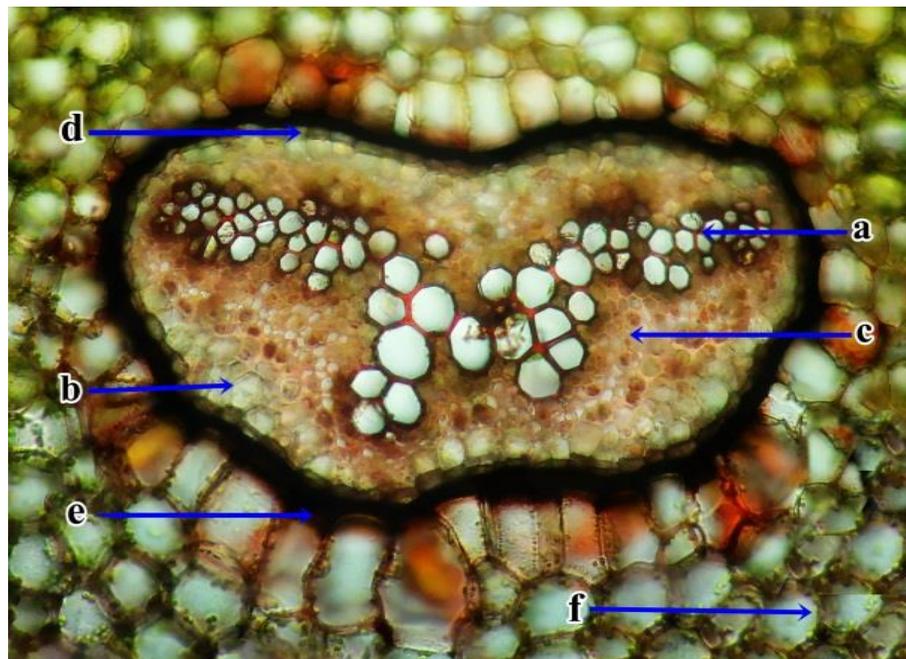


Figura 14: CT del haz anficribal primario en la nervadura principal *Ph. decumanum*; **a.** xilema con forma de "x" **b.** periciclo **c.** floema **d.** endodermis **e.** células con engrosamiento en U **f.** parénquima lagunoso. Tinción: safranina. 400 X.

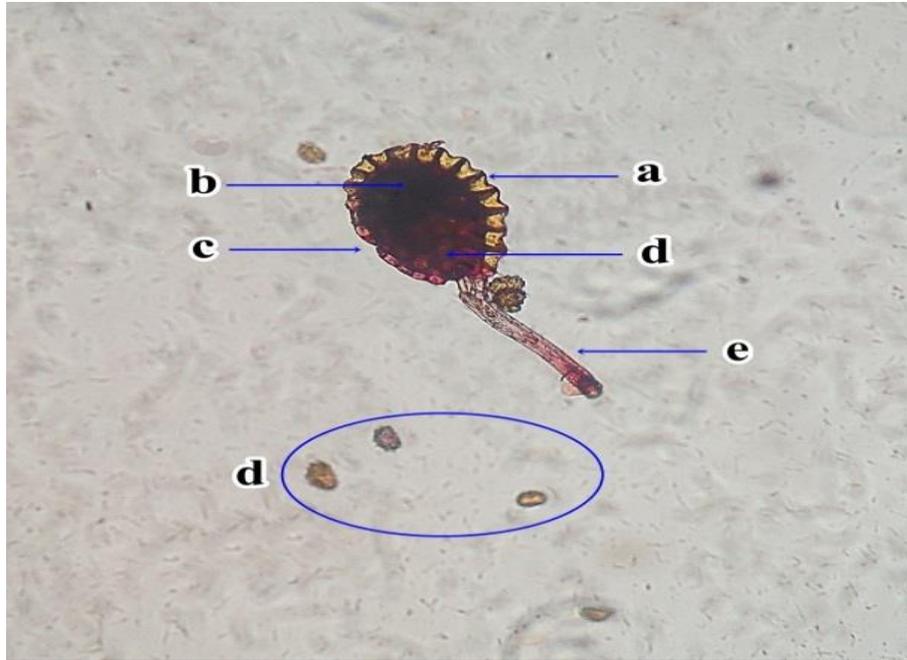


Figura 15: Esporangio de *Ph. decumanum*; **a.** anillo de dehiscencia **b.** cápsula **c.** Células abaciales **d.** esporas **e.** pedicelo. Tinción: safranina. 400 X.

En el disociado de fronde seca, se pueden apreciar células del esclerénquima, parénquima, osteoesclereidas, macrosclereidas en gran cantidad, placas perforadas, fibras xilémicas, fibras libriformes (figuras 16, 17 y 18). Como observación especial; no se observaron tricomas en sus frondes.



Figura 16: Disociado *Ph. decumanum*. Se observan fibras xilemáticas, fibras libriformes, células parenquimáticas y macro esclereidas. Tinción safranina 100X.

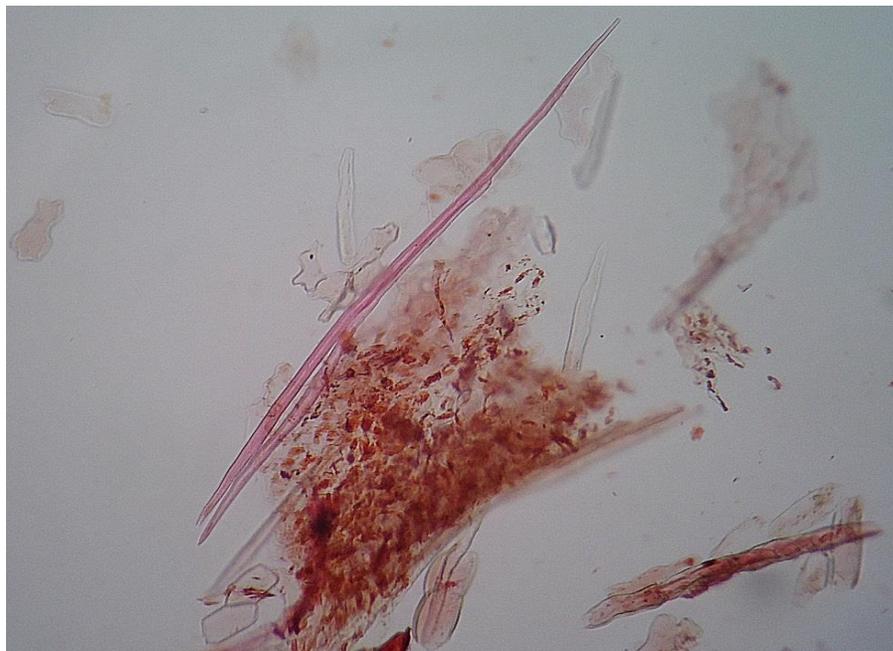


Figura 17: Disociado *Ph. decumanum*. Se observan fibras libriformes, macrosclereidas, células parenquimáticas. Tinción safranina 100X.

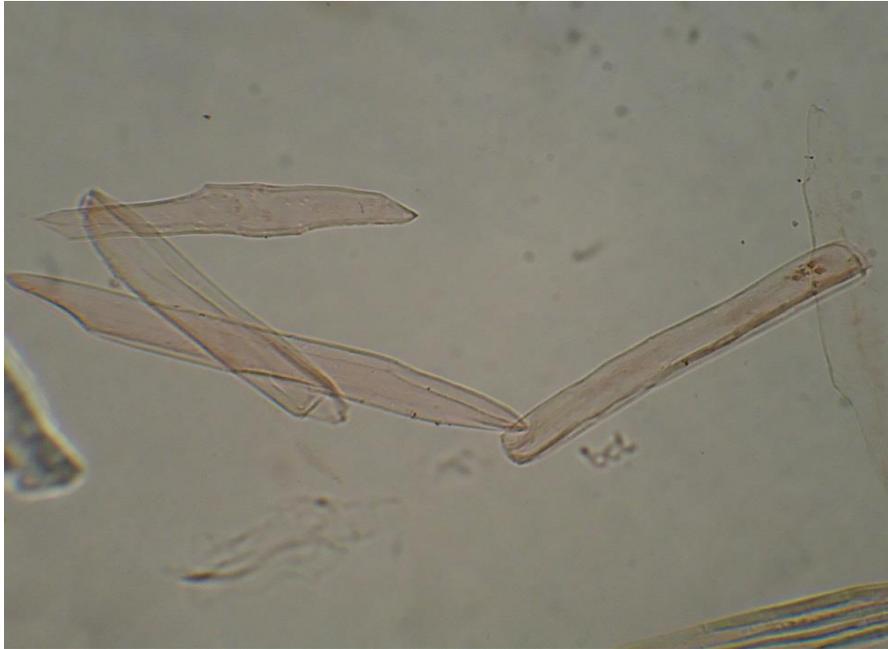


Figura 18: Disociado *Ph. decumanum*. Se observan macroesclereidas y osteoesclerida con placa perforada. Tinción safranina 400X

b) *Rizoma de Phlebodium decumanum.*

En el CT del rizoma de *Ph. decumanum*, se observa una delgada cutícula, epidermis monoestratificada compuesta por células rectangulares las cuales forman invaginaciones de donde salen las raíces adventicias, seguida de parénquima de almacenamiento (figura 19).

El sistema vascular constituye una dictiostela, donde se encuentra el xilema que se dispone en dos ramas divergentes (figura 20).



Figura 19: CT de rizoma *Ph. decumanum*; a. parénquima de almacenamiento b. cutícula c. epidermis con una serie de células cuadrangulares d. raíces adventicias. Tinción: safranina. 100 X.

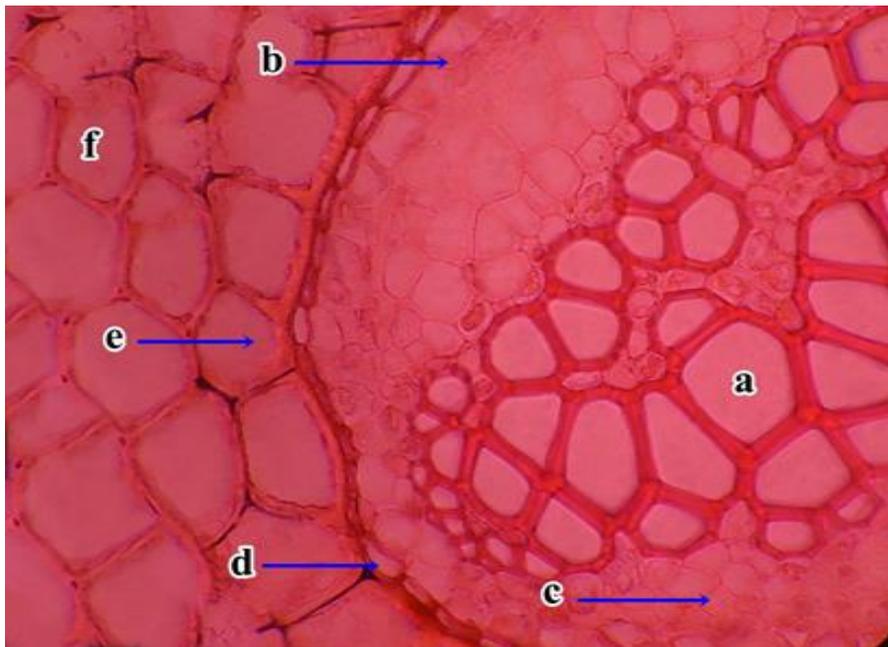


Figura 20: CT de rizoma *Ph. decumanum*; a. xilema b. periciclo c. floema d. endodermis e. Células con engrosamiento en U f. parénquima lagunoso. Tinción safranina. 400X.

En el disociado del rizoma se pueden encontrar traqueidas con engrosamiento helicoidal, células del parénquima con almidón y macrosclereidas (figura 21 y 22).

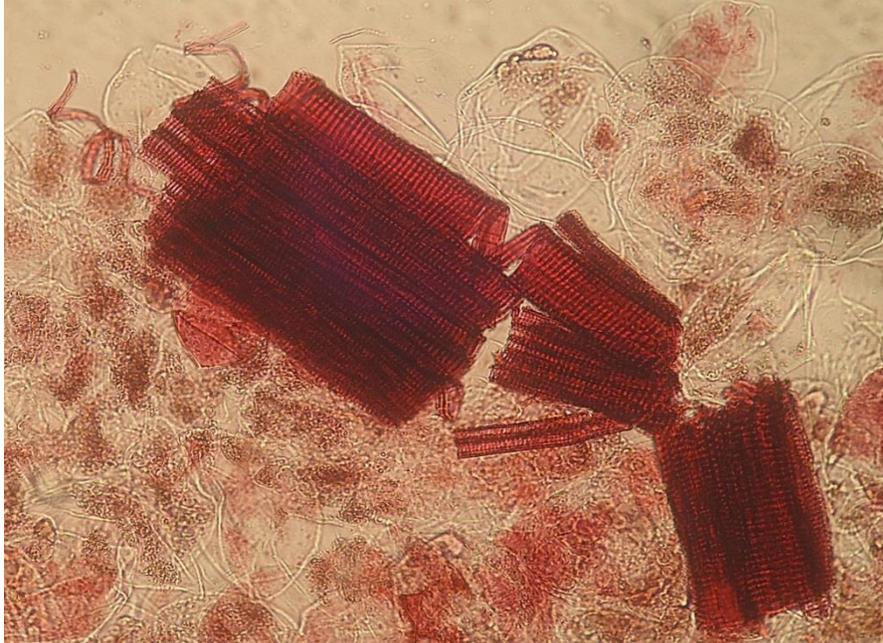


Figura 21: Disociado de rizoma *Ph. decumanum*. Se observan traqueidas con engrosamiento helicoidal, células del parénquima con almidón. Tinción safranina 100X.

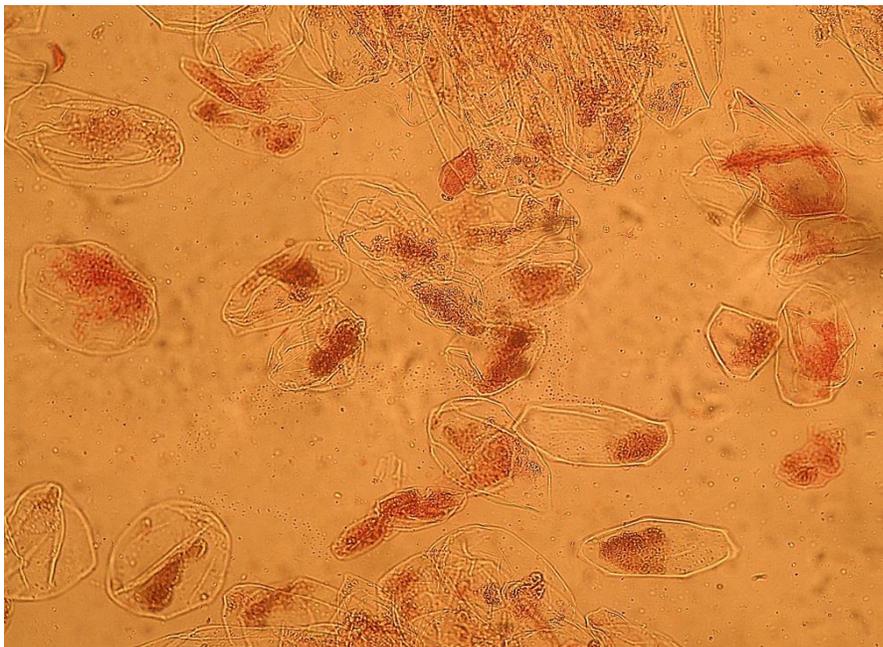


Figura 22: Disociado de rizoma *Ph. decumanum*. Se observan células parenquimáticas y macrosclereidas. Tinción safranina 100X.

c) *Fronde de Phlebodium pseudoaureum.*

El CT del foliolo de *Ph. pseudoaureum* a nivel del nervio medio posee una forma elíptica, más prominente en su cara abaxial, la epidermis adaxial y abaxial son monoestratificadas irregulares, más altas en la cara adaxial con paredes anticlinales rectas y periclinales curvas, presenta una cutícula muy delgada en su cara adaxial, toda la lámina está formada por parénquima esponjoso de tipo clorenquimático, presenta haces anficribales que atraviesan el mesófilo, rodeados por colénquima y una a dos capas de esclerenquima hacia la cara abaxial (Figura 24). Ambas epidermis en la nervadura principal, están seguidas por colénquima laminar de 5-7 capas de células y un parénquima lagunoso (figura 23). En el centro de la nervadura principal se encuentra un haz anficribal, conformado por xilema en forma de T y rodeado por el floema, seguido de un periciclo de 1 o 2 estratos de células, rodeando al haz anficribal se encuentra una endodermis, esta a su vez está rodeada por una vaina de células engrosadas en forma de U que presentan un color pardo-café (figura 25).

A nivel de la lámina foliar en la cara abaxial se observan los soros desnudos, que presentan esporangios maduros unidos por el pedicelo, el anillo de dehiscencia recubre la cápsula que contiene las esporas (figura 26).

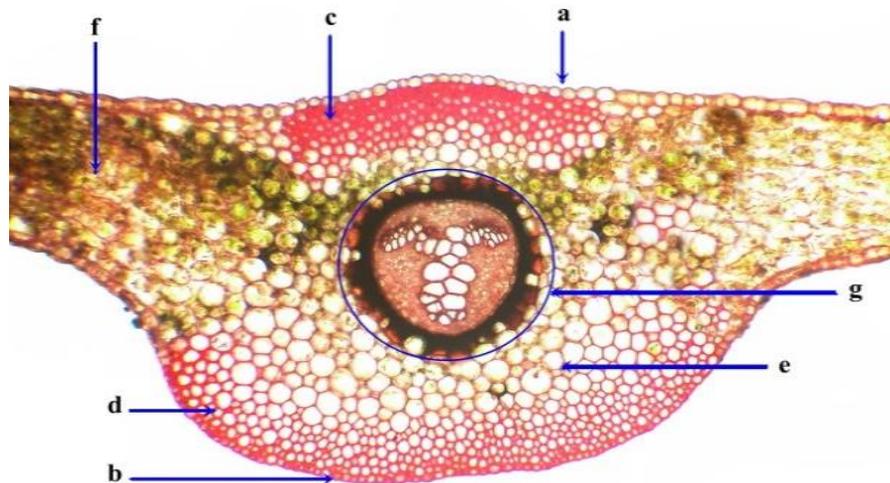


Figura 23: Corte transversal nervadura principal de *Ph. pseudoaureum*; **a.** epidermis adaxial con un fina cutícula **b.** epidermis abaxial **c.** colénquima laminar adaxial **d.** colénquima laminar abaxial **e.** Parénquima lagunoso **f.** clorénquima **g.** haz anficribal. Tinción: safranina. 100X.

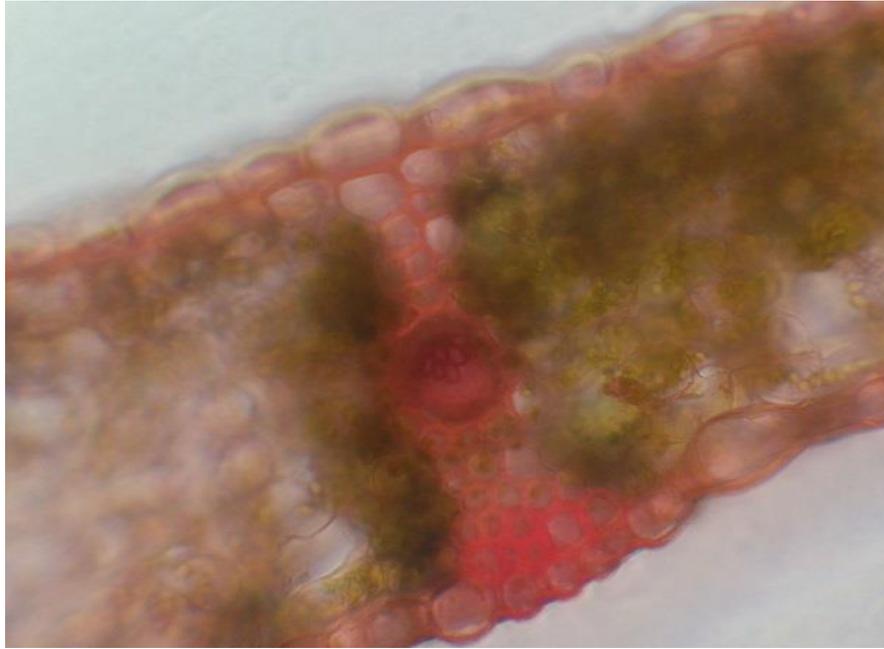


Figura 24: Corte transversal foliolo de *Ph. pseudoaureum*; se aprecia un haz anficribal en el mesófilo compuesto de clorénquima esponjoso. Tinción safranina 400X.

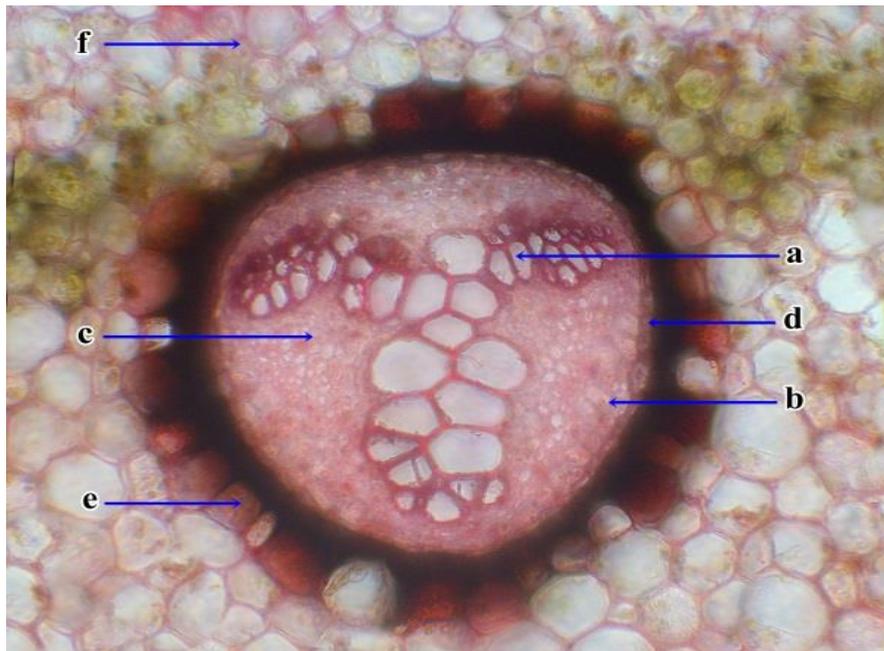


Figura 25: CT del haz anficribal en la nervadura principal de *Ph. pseudoaureum*; a. xilema en forma de "T" b. periciclo c. floema d. endodermis e. células con engrosamiento en U f. parénquima lagunoso. Tinción: safranina. 400 X.

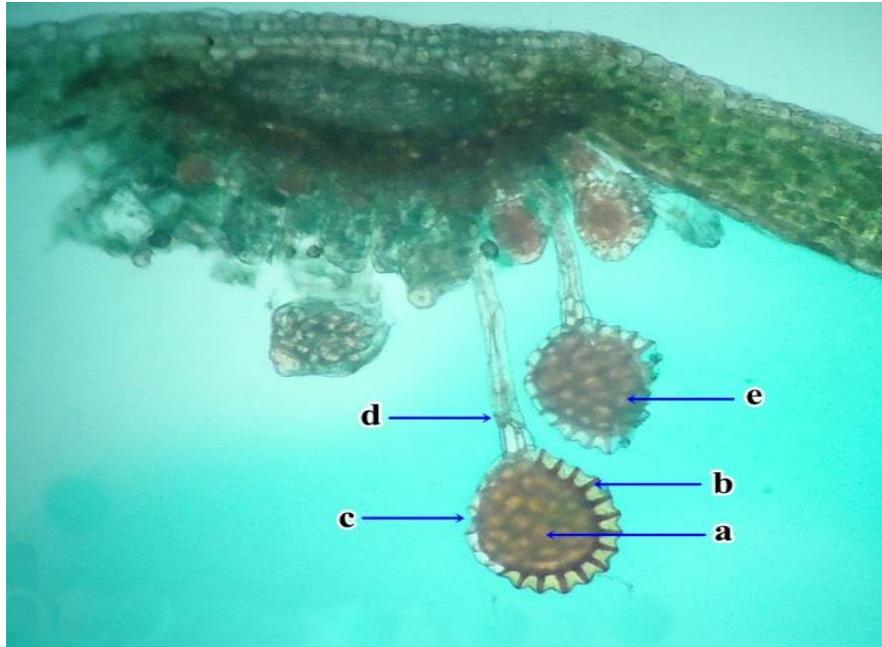


Figura 26: CT de fronde de *Ph. pseudoaureum*, soro, esporangio; a. cápsula b. anillo de dehiscencia c. Células abiales d. pedicelo e. esporas. Tinción: Fast Green. 400 X.

En el disociado de la fronde se pueden observar células epidérmicas solas o en láminas, estomas, fibras septadas y dentadas, fibras gelatinosas, osteoesclereidas, macroesclereidas, placa perforada, células del mesófilo y traqueidas helicoidales (figuras 27 y 28).



Figura 27: Disociado fronde *Ph. pseudoaureum*. Se observan: Fibras gelatinosa, fibra septada y dentada, células del mesófilo, osteoesclereida y macroesclereidas, soro. Tinción safranina 100X.



Figura 28: Disociado fronde *Ph. pseudoaureum*. Se observan; células del mesófilo, traqueidas helicoidales, fibras gelatinosas, placas perforadas, macroesclereidas. Tinción: safranina. 100X.

d) *Rizoma de Phlebodium pseudoaureum*.

En el CT del rizoma de *Ph. pseudoaureum*, se observa una cutícula precedida por una epidermis monoestratificada compuesta por células rectangulares que forman invaginaciones para dar origen a las raíces adventicias, seguida de células del parénquima el cual presenta cristales de oxalato de calcio (figura 29).

El sistema vascular está constituido por una dictiostela donde cada meristela está delimitada por una vaina de células esclerosadas en U muy desarrollado. Internamente en las meristelas se observa una endodermis primaria, un periciclo de 1 o 2 estratos de células que delimitan al floema, en el centro de la meristela se encuentra el xilema conformado por un haz anficribal con forma elíptica rodeado por el floema (figura 30).



Figura 29: CT de rizoma *Ph. pseudoaureum*; **a.** cutícula **b.** epidermis con células rectangulares **c.** raíz adventicia **d.** parénquima. Tinción Fast Green. 400 X.

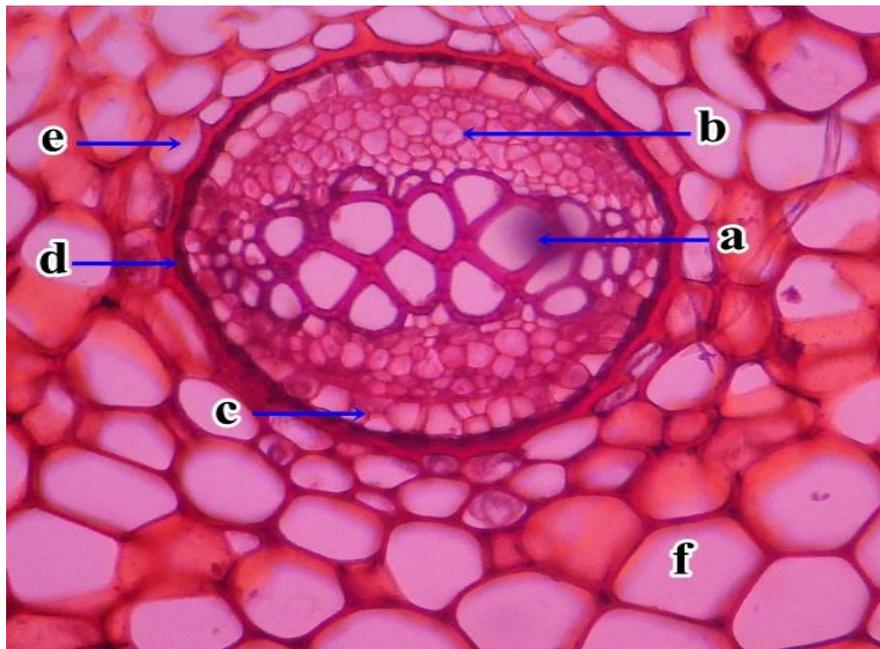


Figura 30: CT de rizoma *Ph. pseudoaureum*; **a.** xilema **b.** floema **c.** periciclo **d.** endodermis **e.** vaina de células engrosadas en U **f.** parénquima. Tinción: safranina. 400 X.

En el disociado del rizoma de *Ph. pseudoaureum* se observaron; células del parénquima, macroesclereidas y traqueidas con engrosamiento reticulado (figuras 31 y 32).

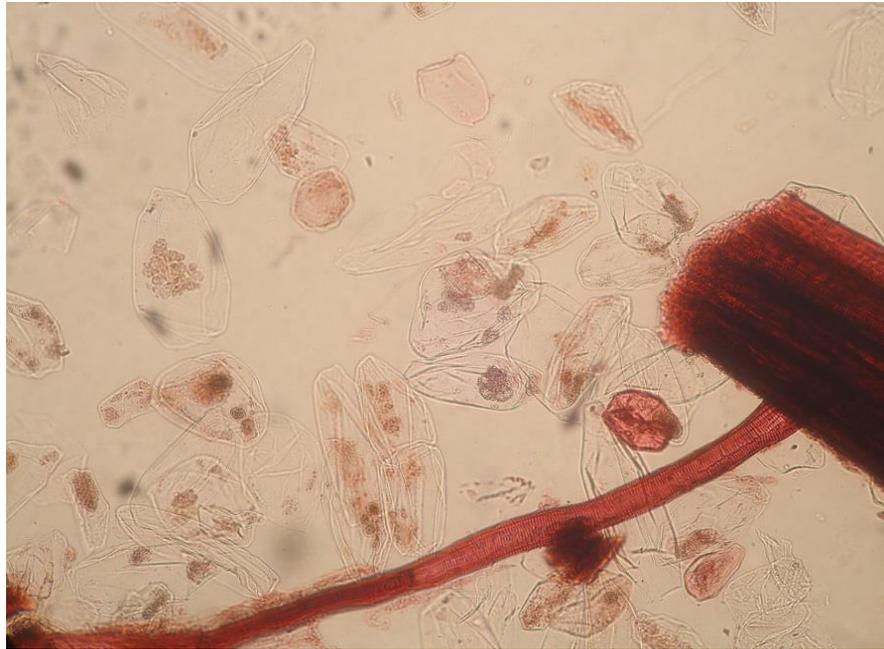


Figura 31: Disociado de rizoma de *Ph. pseudoaureum*. Células parenquimáticas, macroesclereidas y traqueidas. Tinción: safranina. 100X.

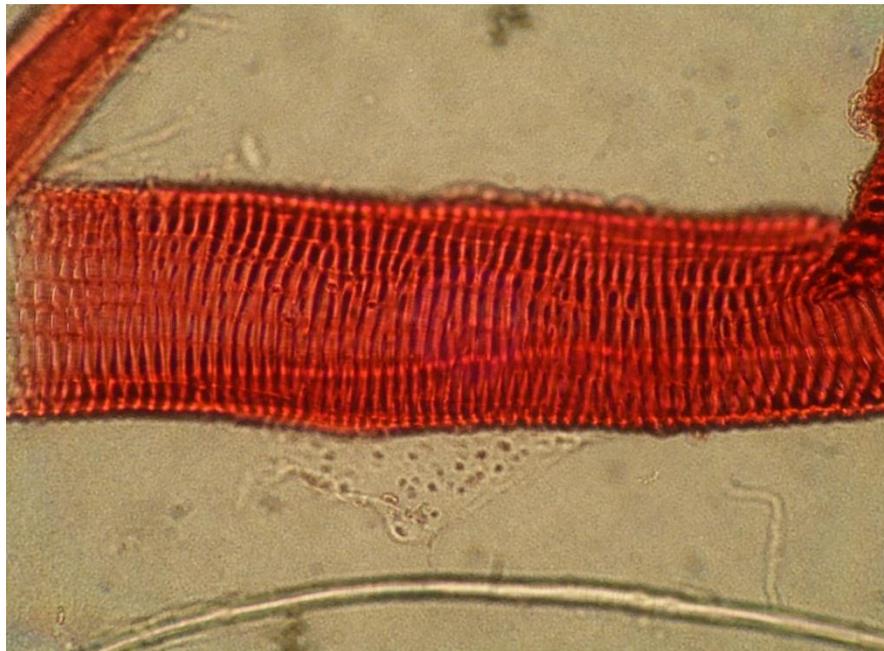


Figura 32: Traqueida con engrosamiento reticulado. Tinción: safranina. 400X.

e) *Fronde de Serpocaulon triseriale*.

El CT del nervio medio en *S. triseriale* tiene una forma de pera con ambas epidermis pronunciadas hacia ambos lados, siendo la cara abaxial la más prominente, las células de su epidermis son monoestratificadas irregulares, más altas en la cara adaxial con paredes anticlinales rectas y periclinales curvas, cubierta por una cutícula muy delgada en la cara adaxial, seguida por colénquima laminar de 6-9 capas de células a ambos lados y un parénquima lagunosos; en el mesófilo se encuentran clorénquima así como haces anficribales en las nervaduras secundarias (figura 34). En el centro de la la nervadura principal se encuentra una meristela o haz anficribal, donde se observó el xilema en forma de T más gruesa en su base, rodeado por el floema que a su vez se encuentra rodeado por un periciclo de 1 a 2 células y una endodermis alrededor del haz anficribal, junto a esta endodermis se encuentra también una capa de células engrosadas en forma de U con un color pardo-café (figura 33 y 34).

Los soros se localizan en la cara abaxial del foliolo, no presentan indusio y los esporangios maduros están unidos por el pedicelo, donde el anillo de dehiscencia recubre la cápsula que contiene las esporas (figura 35).

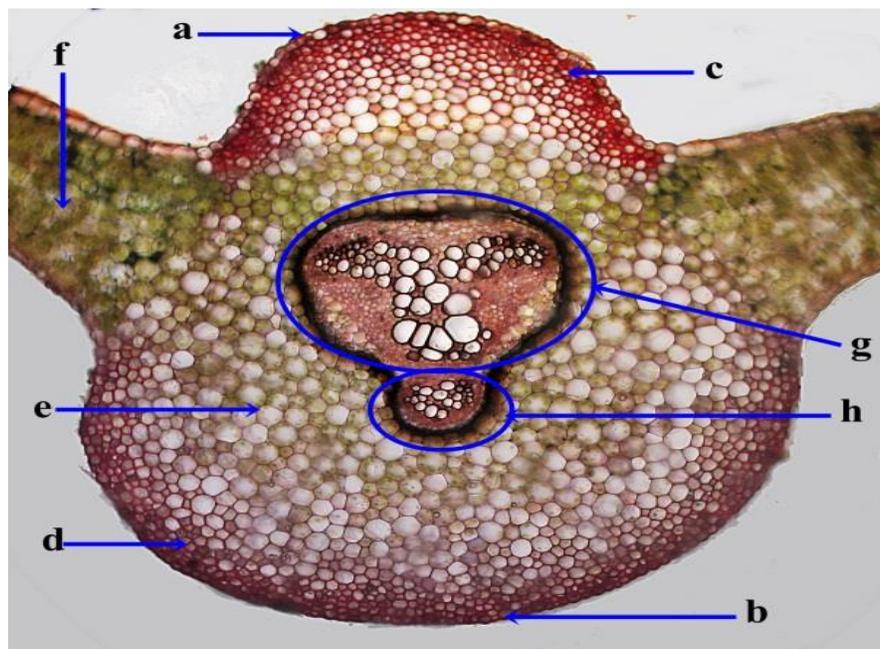


Figura 33: CT de la nervadura principal de *S. triseriale*; **a.** epidermis adaxial **b.** epidermis abaxial **c.** colénquima laminar adaxial **d.** colénquima laminar abaxial **e.** Parénquima **f.** clorénquima (mesófilo) **g.** haz anficribal **h.** haz anficribal de nervadura secundaria. Tinción: safranina. 100 X.

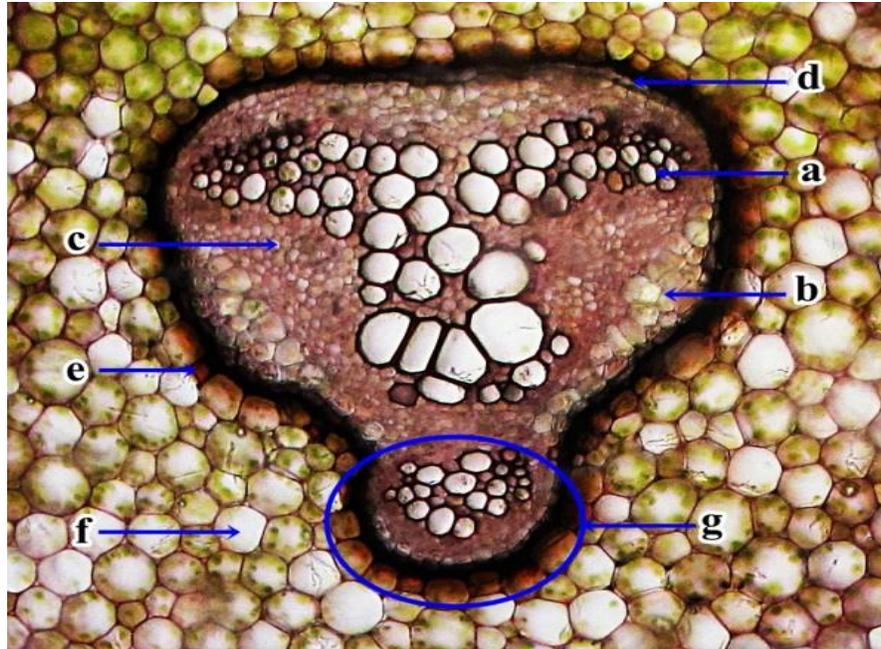


Figura 34: CT del haz anficribal en la nervadura principal de *S. triseriale*; **a.** xilema en forma de T con engrosamiento en su base **b.** floema **c.** parénquima **d.** periciclo **e.** células con engrosamiento en U con pared café oscuro **f.** parénquima **g.** Haz anficribal de nervadura secundaria. Tinción safranina. 400 X.

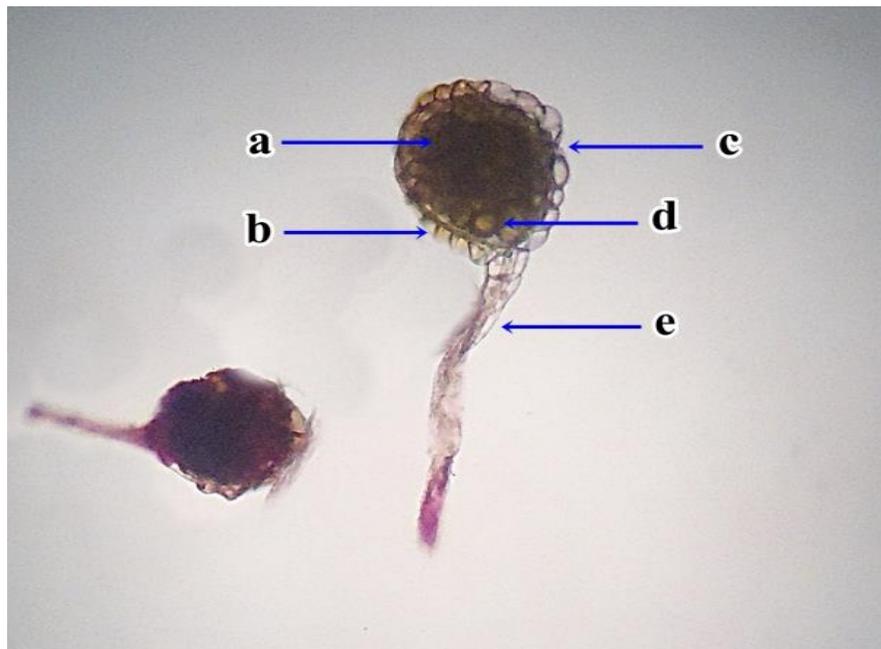


Figura 35: Esporangio de *S. triseriale*; **a.** cápsula **b.** anillo de dehiscencia **c.** Células abiales **d.** esporas **e.** pedicelo. Tinción safranina. 400 X.

En el disociado de la fronde de *S. triseriale*, se observaron; fibras gelatinosas, fibrotraqueidas dentadas, macroesclereidas, células de mesófilo, traqueidas helicoidales (figura 36).



Figura 36: Disociado fronde de *S. triseriale*. Fibras gelatinosas, fibrotraqueidas dentadas, macroesclereidas, células de mesófilo y traqueidas helicoidales. Tinción safranina. 100X.

f) *Rizoma de Serpocaulon triseriale*.

En el CT del rizoma de *S. triseriale*, se observa una delgada cutícula, epidermis monoestratificada compuesta por células rectangulares las cuales forman invaginaciones para dar origen a las raíces adventicias, seguida de parénquima de almacenamiento el cual tiene cristales de oxalato (figuras 37 y 38).

El sistema vascular constituye una dictiostela donde cada meristela está delimitada por una vaina de células esclerosadas en forma de U. Internamente se observa una endodermis primaria que rodea las meristelas, seguida de esta se encuentra un periciclo de 1 o 2 estratos de células y luego se observa el floema rodeando por completo al xilema, dicho xilema en su totalidad se asemeja a un rectángulo con bordes irregulares con un engrosamiento máximo de cuatro a cinco conductos de xilema (figura 39).

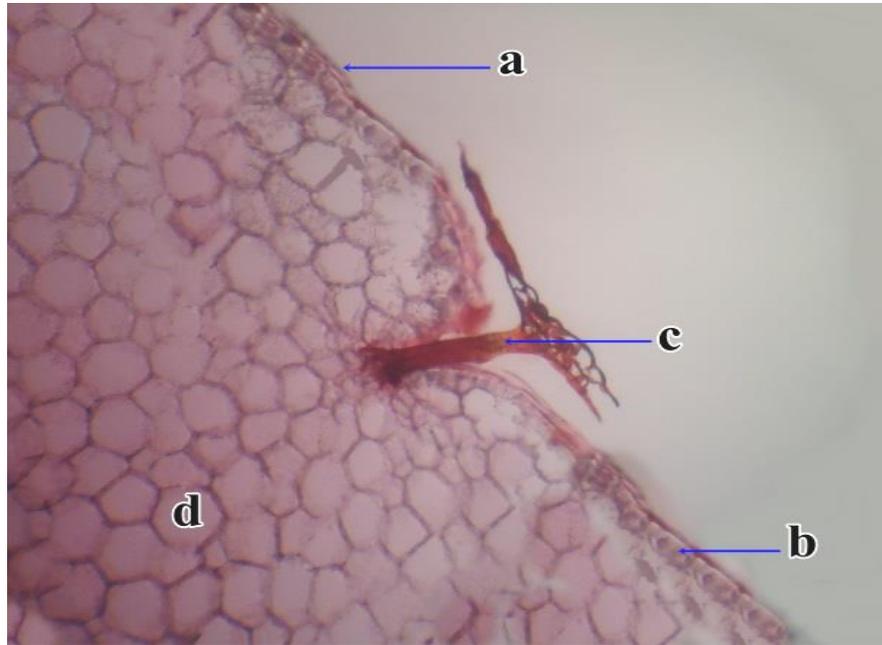


Figura 37: CT del rizoma *Ph. triseriale*; **a.** cutícula **b.** epidermis con células rectangulares **c.** raíz adventicia **d.** parénquima. Tinción: Safranina. 400 X.

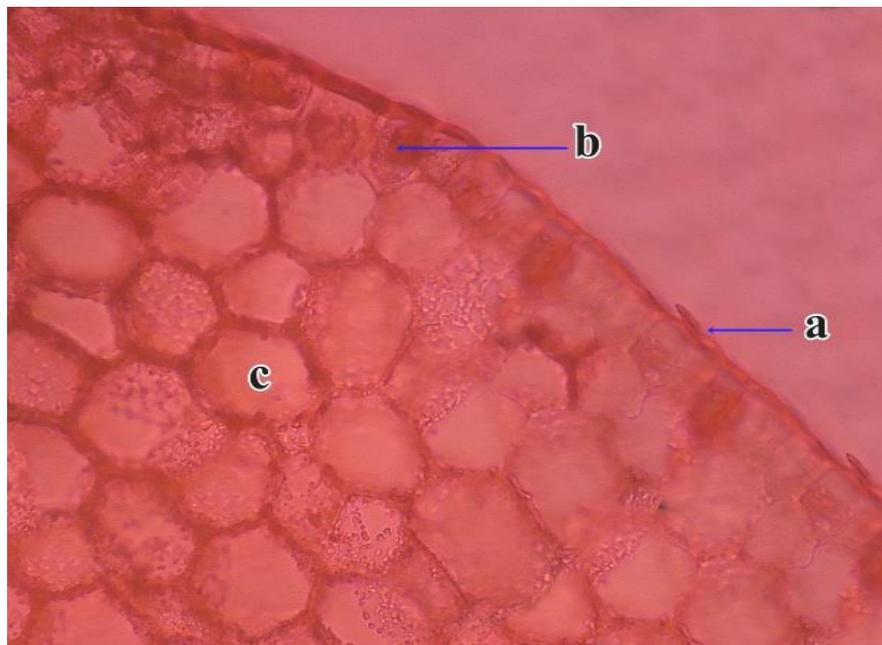


Figura 38: CT del rizoma *Ph. triseriale*; **a.** cutícula **b.** epidermis con células rectangulares **c.** parénquima. Tinción: Safranina. 400 X.

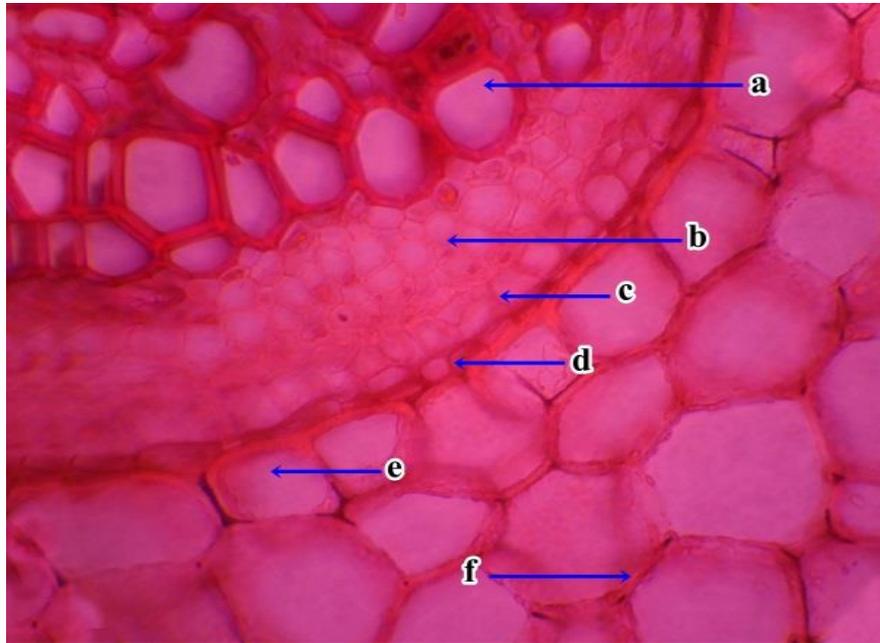


Figura 39: CT del rizoma *S. triseriale*; **a.** xilema **b.** floema **c.** periciclo **d.** endodermis **e.** vaina de células engrosadas en U **f.** parénquima. Tinción: safranina. 400 X.

En el disociado del rizoma de *S. triseriale* se puede apreciar células del parénquima, macroesclereidas y traqueidas con engrosamiento escalariforme (figura 40 y 41).



Figura 40: Disociado de rizoma de *S. triseriale*. Células parenquimáticas y macroesclereidas. Tinción safranina. 400X.

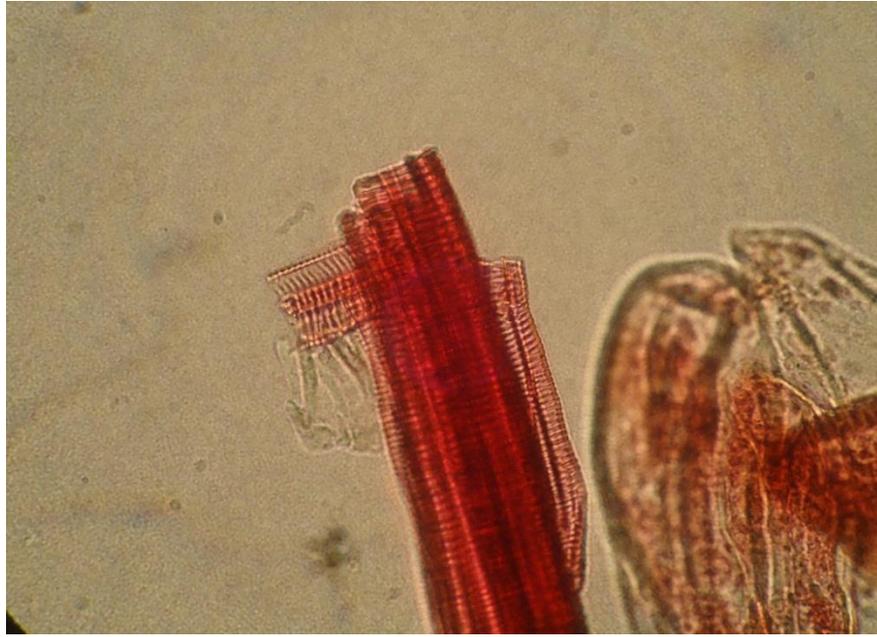


Figura 41: Disociado de rizoma de *S. triseriale*. Engrosamiento escalariforme de traqueidas. Tinción: safranina. 100X.

2. Comparativa de las estructuras microscópicas más relevantes.

Los resultados obtenidos según las estructuras micromorfológicas encontradas en cada una de las tres plantas en estudio se resumen en la tabla 1, donde se presentan tanto las estructuras características de cada especie, como las compartidas entre ellas, estas fueron tomadas con base en los cortes transversales y disociados realizados en las frondes y rizomas.

Cuadro 1: Comparativa de estructuras microanatómicas más destacables de las tres especies de calahuala en estudio.

	<i>Ph. decumanum</i>	<i>Ph. pseudoaureum</i>	<i>S. triseriale</i>
Corte transversal fronde	<ul style="list-style-type: none"> • Nervadura principal con forma elíptica vertical, respecto al folio. • Haz anficribal rodeado por células esclerosadas en U. • Vascularización del xilema en forma de X. 	<ul style="list-style-type: none"> • Nervadura principal elíptica horizontal respecto al foliolo, prominente hacia su cara abaxial. • Haz anficribal rodeado por células esclerosadas en U. • Vascularización del xilema en forma de T. 	<ul style="list-style-type: none"> • Nervadura principal con forma de pera con ambas epidermis pronunciadas hacia ambos lados, más prominente hacia su cara abaxial. • Haz anficribal rodeado por células esclerosadas en U. • Vascularización del xilema presenta una forma de T engrosada en su base.
Corte transversal rizoma	<ul style="list-style-type: none"> • Presenta parénquima de almacenamiento. • Sistema vascular constituye una dictiostela • Meristelas rodeadas por células esclerosadas en U. • Xilema rodeado por el floema. • El xilema diverge en dos ramas en el haz anficribal. 	<ul style="list-style-type: none"> • Presenta parénquima de almacenamiento. • Sistema vascular constituye una dictiostela. • Meristelas rodeadas por células esclerosadas en U. • Xilema rodeado por el floema. • Xilema con forma elíptica en el haz anficribal. 	<ul style="list-style-type: none"> • Presenta parénquima de almacenamiento. • Sistema vascular constituye una dictiostela. • Meristelas rodeadas por células esclerosadas en U. • Xilema rodeado por el floema. • Xilema forma un rectángulo irregular en el haz anficribal.
Disociado fronde	<ul style="list-style-type: none"> • Fibras libriformes • Placas perforadas • Macroesclereidas en gran abundancia. • Osteoesclereidas 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibras septadas y dentadas • Fibras gelatinosas • Macroesclereidas • Osteoesclereidas • Placas perforadas • Traqueidas helicoidal 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibrotraqueidas dentadas • Fibras gelatinosas • Macroesclereidas • Traqueidas helicoidales
Disociado rizoma	<ul style="list-style-type: none"> • Traqueidas con engrosamiento helicoidal • Macroesclereidas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Traqueidas con engrosamiento reticulado • Macroesclereidas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Traqueidas con engrosamiento escalariforme • Macroesclereidas.

Fuente: datos experimentales

D. Pruebas histoquímicas

- * La reacción para almidón dio positivo en el parénquima de la nervadura principal del fronde en las tres plantas, en los rizomas la reacción fue positiva para el parénquima de las tres especies, *S. triseriale* presentó también reacción positiva en el floema.
- * La reacción para mucílagos fue positiva en frondes y rizomas de las tres plantas.
- * En la reacción de alcaloides las tres plantas presentaron reacción positiva en el xilema y parénquima de la nervadura principal de la fronde. En el rizoma las tres plantas presentaron reacción positiva en el parénquima, solo *S. triseriale* lo presentó en el xilema.
- * La reacción para saponinas fue positiva en fronde y rizoma en las tres plantas.
- * La reacción para los taninos dio positivo en todas excepto en el rizoma de *Ph. pseudoaureum*.
- * La reacción para grasas y aceites fue negativa en las frondes de *Ph. decumanum* y *Ph. pseudoaureum*; En el rizoma la reacción fue positiva en el parénquima para las tres plantas.
- * Estas reacciones se corroboraron al microscopio observando cambios en la coloración de los cortes, el resumen de los resultados se muestra en la tabla 2.

Cuadro 2: Resumen de características histoquímicas de *Ph. decumanum*, *Ph. pseudoaureum* y *S. Triseriale*.

Reacciones histoquímicas	Fronde			Rizoma		
	<i>Ph.</i> <i>decumanum</i>	<i>Ph.</i> <i>pseudoaureum</i>	<i>S.</i> <i>triseriale</i>	<i>Ph.</i> <i>decumanum</i>	<i>Ph.</i> <i>pseudoaureum</i>	<i>S.</i> <i>triseriale</i>
Almidón	++	+	+	+++	-	+++
Mucílagos	+	+	++	+	+	+
Alcaloides	++	+++	+++	+++	-	+++
Saponinas	+	+	++	+	+	+
Taninos	+	+	+	++	-	+++
Grasas y aceites	-	-	+	++	+	+++

Nota: - Negativo; + levemente positivo; ++ positivo; +++ fuertemente positivo

Fuente: datos experimentales.

E. Caracteres microscópicos del diafanizado en las frondes e índice de estomas

Los tipos de estomas encontrados según la especie se detallan en la tabla 3. Entre los parámetros que se estudiaron en las tres plantas están; tipo de estomas y el índice de estomas que se tomó según se indica en la metodología, obteniendo el resultado de una media de 15 repeticiones realizadas para cada planta, para *Ph. decumanum* la media del índice de estomas fue de 16.04, para *Ph. pseudoaureum* fue de 16.39 y finalmente para *S. triseriale* fue de 17.51 (tabla 4).

Cuadro 3: Clasificación de los tipos de estomas

Tipos de estomas	<i>Ph. decumanum</i>	<i>Ph. pseudoaureum</i>	<i>S. triseriale</i>
Anomocítico	si	si	si
Diacítico	NO	si	NO
Polocítico	si	NO	si
Copolocítico	si	si	si
Anisocítico	si	si	NO

Fuente: datos experimentales

1. Fronde de *Ph. decumanum*.

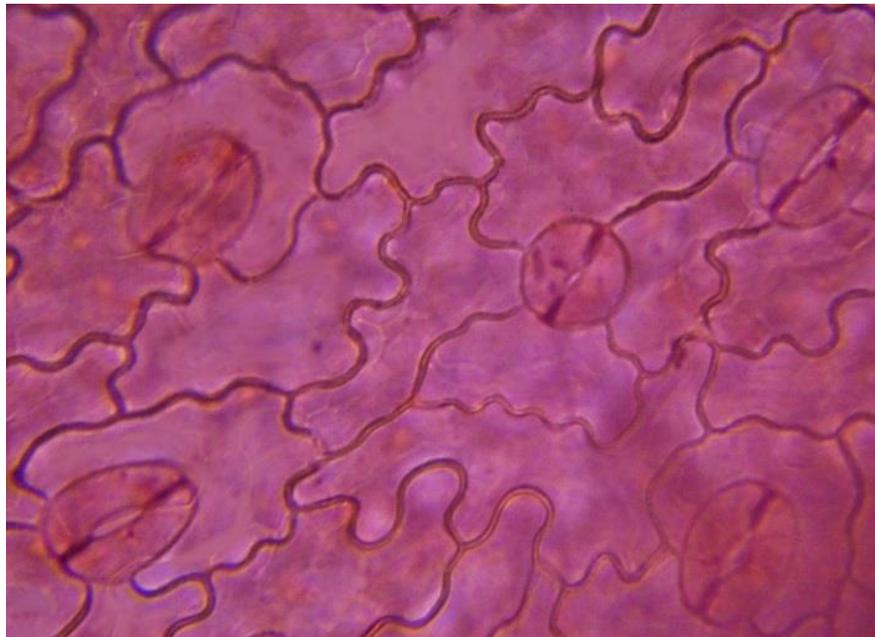


Figura 42: Diafanizado de *Ph. decumanum*. Estomas anomocíticos, anisocítico y polocítico. Tinción: safranina. 400X.



Figura 43: Diafanizado de *Ph. decumanum*. Estomas anomocíticos y copolocítico. Tinción: Fast Green. 400X.

2. Fronde de *Ph. pseudoaureum*.

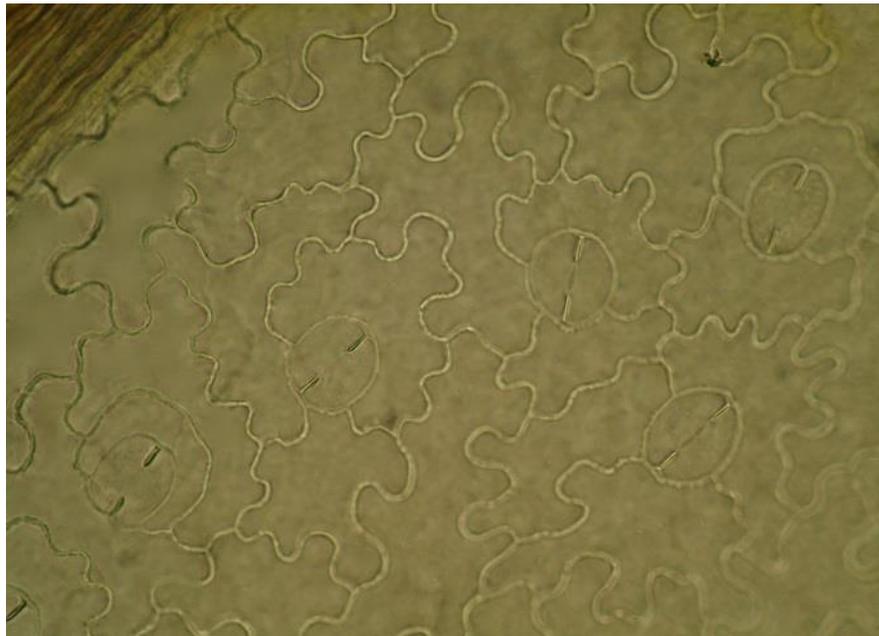


Figura 44: Diafanizado de *Ph. pseudoaureum*. Estomas anomocíticos, copolocítico y diacítico. Tinción: Fast Green. 400X.

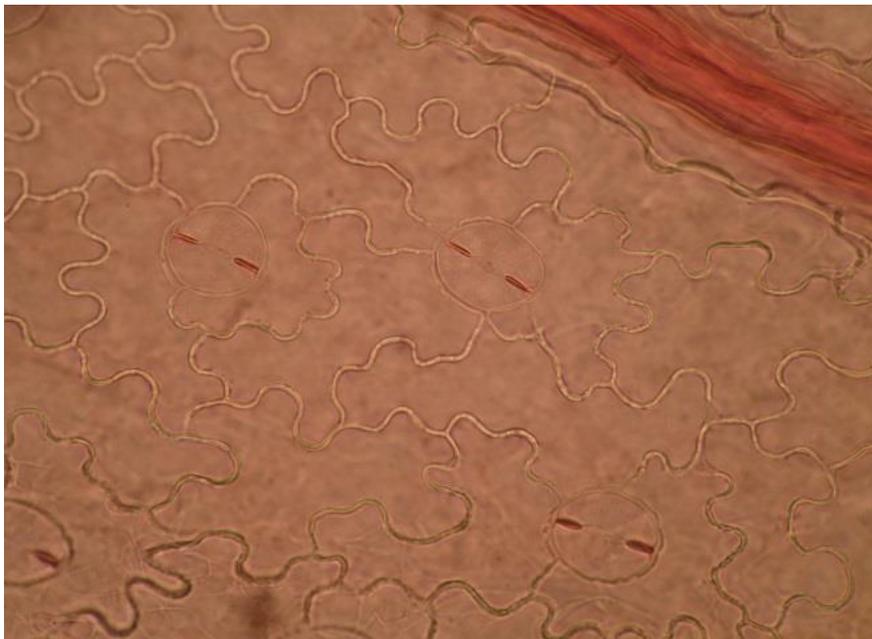


Figura 45: Diafanizado de *Ph. pseudoaureum* estomas anomocíticos y anisocítico. Tinción: safranina. 400X.

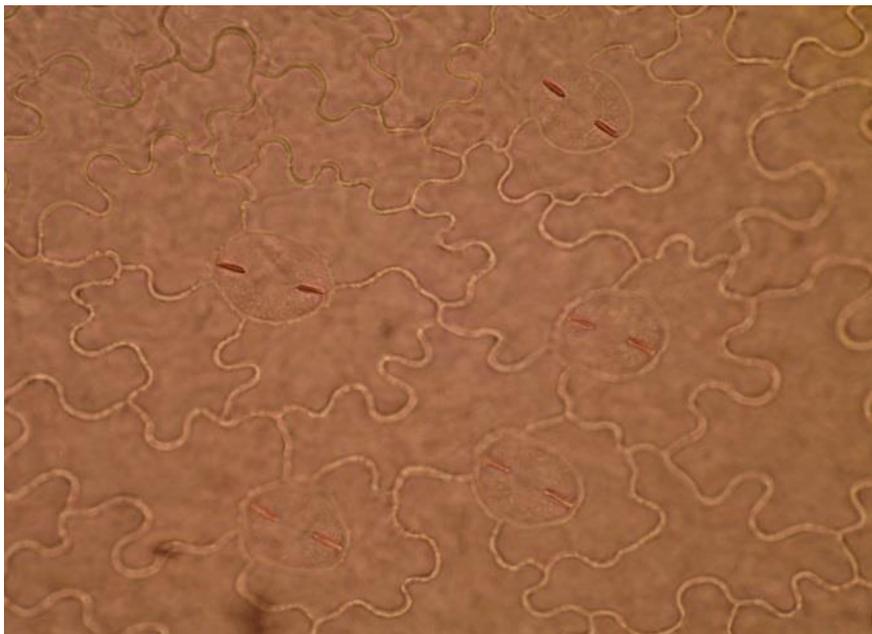


Figura 46: Diafanizado de *Ph. pseudoaureum*, estomas anomocíticos, diacítico y anisocítico. Tinción: safranina. 400X.

3. Fronde de *S. triseriale*.

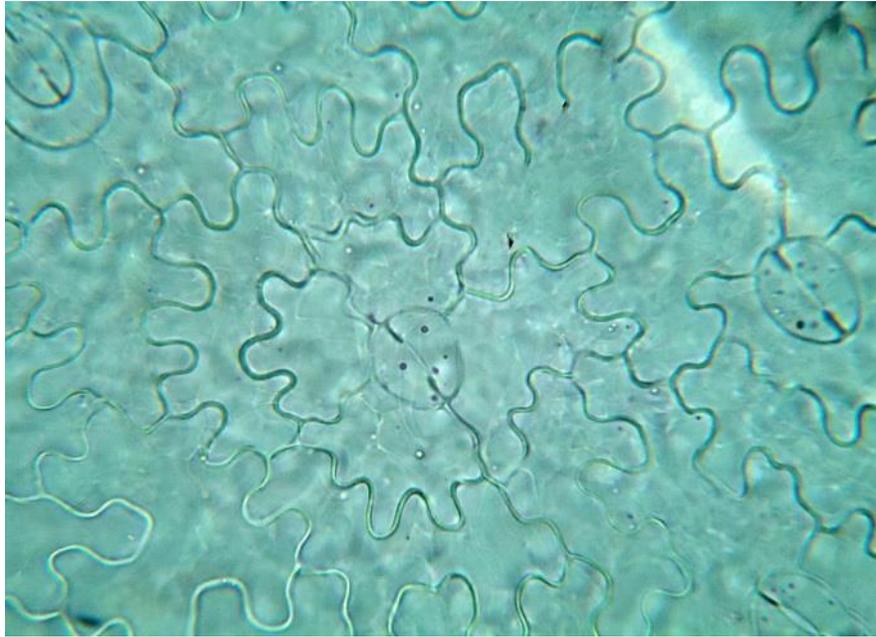


Figura 47: Diafanizado de *S. triseriale*. Estoma polocítico y anomocítico. Tinción: Fast Green. 400X.

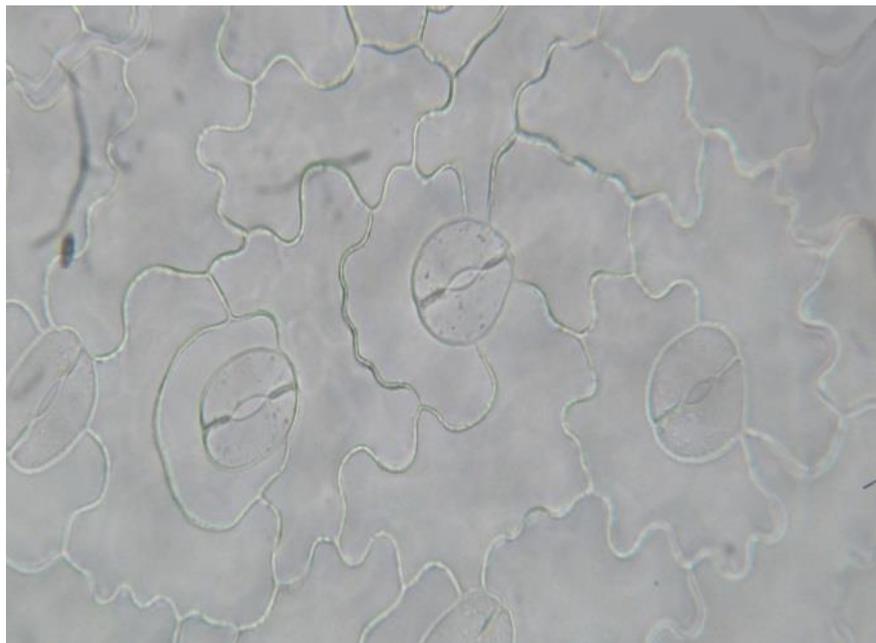


Figura 48: Diafanizado de *S. triseriale*. Estomas anomocíticos, copolocítico. Tinción: Fast Green. 400X.

Cuadro 4: Índice de estomas

No. Repetición	<i>Ph. decumanum</i>	<i>Ph. pseudoaureum</i>	<i>S. triseriale</i>
1	17.39	13.51	17.90
2	19.44	16.66	16.21
3	14.63	14.89	19.35
4	16.21	14.28	14.81
5	16.27	18.75	19.35
6	17.95	18.75	18.42
7	16.66	19.04	19.44
8	12.12	19.90	18.18
9	16.66	17.24	19.35
10	13.51	14.89	14.28
11	13.88	14.89	15.78
12	17.95	16.13	18.75
13	13.15	16.67	15.15
14	15.79	15.38	20.00
15	18.95	14.89	15.62
Media	16.04	16.39	17.51
Mediana	16.27	16.13	18.18
desviación estándar	2.184897731	1.96740898	1.974765085
rango inferior	13.85	14.42	15.53
rango superior	18.22	18.36	19.48

* Fuente: datos experimentales.

F. Parámetros de calidad de la droga seca

1. Humedad y porcentaje de cenizas.

Para verificar la calidad de la droga con la que se trabajó el estudio, se calculó el porcentaje de humedad y de cenizas que poseía la droga seca de cada planta, considerándose de buena calidad en este tipo de plantas, si el porcentaje de cenizas totales y humedad no superan el 10%.

Los resultados que se obtuvieron tanto en el porcentaje de humedad como en el de cenizas fueron buenos, estos se indican en la tabla 5 que se presenta a continuación.

Cuadro 5: Humedad y porcentaje de Cenizas Totales.

No. de repetición	Fronde <i>Ph. decumanum</i>	Fronde <i>Ph. pseudoaureum</i>	Fronde <i>S. triseriale</i>	Rizoma <i>Ph. decumanum</i>	Rizoma <i>Ph. pseudoaureum</i>	Rizoma <i>S. triseriale</i>
1	7.14	9.03	7.99	7.78	9.16	3.03
2	6.82	8.54	8.16	7.88	8.50	3.11
3	6.45	8.94	8.00	7.69	8.95	3.16
4	7.00	8.65	7.94	7.58	8.55	2.91
5	6.87	8.88	8.04	7.68	8.86	2.84
media	6.79	8.75	8.03	7.72	8.80	3.01
% ceniza						
Mediana	6.85	8.77	8.00	7.69	8.71	3.07
Desviación	0.26	0.20	0.08	0.11	0.27	0.13
rango inferior	6.53	8.55	7.94	7.61	8.53	2.88
rango superior	7.04	8.96	8.11	7.84	9.08	3.15
Humedad	4.35	6.05	7.86	6.90	5.81	6.67

Fuente: datos experimentales.

G. Cromatografía en capa fina y pruebas fitoquímicas (reacción en tubo)

En la cromatografía en capa fina, los alcaloides se encontraron en fronde y rizoma de *Ph. decumanum* y *Ph. pseudoaureum* (Atropina, papaverina); las cumarinas estuvieron presentes en las tres plantas tanto en fronde como en rizoma (cumarina, ác. Cumárico); se determinó la presencia de flavonoides en las frondes de las tres plantas y en el rizoma de *Ph. decumanum* (Rutina, ácido clorogénico, quercetina, ác. Cafeico) sin embargo las saponinas no fueron detectadas con el estándar utilizado, el resumen de los resultados se muestran en la tabla 6.

También se realizaron pruebas fitoquímicas en tubo empleando los distintos extractos de las plantas para complementar las pruebas realizadas, los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 6: Resultados cromatografía en capa fina.

	FRONDE			RIZOMA		
	<i>Ph. decumanum</i>	<i>Ph. pseudoaureum</i>	<i>S. triseriale</i>	<i>Ph. decumanum</i>	<i>Ph. pseudoaureum</i>	<i>S. triseriale</i>
Alcaloides (Atropina, papaverina)	+	+	-	+	+	-
Cumarinas (cumarina, <u>ác. Cumárico</u>)	+	+	+	-	+	+
Flavonoides	Rutina	+	+	+	-	-
	ácido clorogénico	+	+	+	+	+
	Quercetina	+	+	+	-	-
	ácido cafeico	+	+	+	-	-
Saponinas	-	-	-	-	-	-

Fuente: datos experimentales.

Tabla 7: Resultados fitoquímicos de pruebas en tubo

	Taninos			Cumarinas
	Gelatina 1%	Gelatina-sal	FeCl³	
<i>Ph. decumanum</i> (fronde)	Precipitado	Precipitado	Catecol	Positivo
<i>Ph. decumanum</i> (rizoma)	Precipitado	Precipitado	NR*	NR
<i>Ph. pseudoaureum</i> (fronde)	Precipitado	Precipitado	Catecol	Positivo
<i>Ph. pseudoaureum</i> (rizoma)	Precipitado	Leve precipitado	NR	Positivo
<i>S. triseriale</i> (fronde)	Precipitado	Precipitado	NR	Positivo
<i>S. triseriale</i> (rizoma)	Precipitado	Precipitado	Catecol	Positivo

Fuente: datos experimentales.

*NR: no hubo reacción

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con la finalidad de establecer las características de identidad y procedimientos útiles para el control de calidad en plantas de interés medicinal, conocidas popularmente como calahuala, como parte de los proyectos realizados en el departamento de citohistología, se planteó el presente estudio, para ampliar la información recabada sobre Calahuala, que es un helecho de interés medicinal. Por lo que se evaluaron; caracteres macromorfológicos, micromorfológicos, metabolitos secundarios y parámetros de control de calidad, empleando muestras en fresco y secas de rizoma y fronde, ya que de acuerdo a Gonzales (1996), la anatomía vegetal puede utilizarse como técnica auxiliar de la etnobotánica y es imprescindible en determinados trabajos cuando sólo se dispone de material fragmentario, siendo el estudio anatómico un valioso instrumento taxonómico. Pudiéndose aplicar también para el control de calidad y adulteraciones en fitofármacos.

Las características macroscópicas de las especies seleccionadas para la descripción diagnóstica de esta investigación pueden ser fácilmente identificadas y diferenciadas, según el tipo distintivo en la ubicación de los soros a lo largo de la nervadura principal en su etapa reproductiva y en la forma de sus pinnas, dado que; *Ph. decumanum* presenta de 3 a 7 líneas de soros a ambos lados de la nervadura principal de sus foliolos, la cual posee una pinna lacinada, *Ph. pseudoaureum* tiene una sola fila de soros a ambos lados de la nervadura principal de sus foliolos y posee una pinna pinatífida, *S. triseriale* tiene de 2 a 3 filas de soros a ambos lados de su nervadura principal en los foliolos y una pinna pinnatisecta. También pueden ser diferenciadas con base en la forma de los rizomas, de sus vellosidades y el color de los mismos; *Ph. decumanum* puede diferenciarse de las otras dos por su apariencia gruesa, ya que presenta abundantes vellosidades de aspecto esponjoso de color café-rojizo-brillante, *Ph. pseudoaureum* tiene vellosidades café-rojizas adheridas al rizoma, en cuanto al rizoma de *S. triseriale*, este es mucho más tortuoso con zonas angostas y gruesas a lo largo del mismo, casi no presenta escamas solo en algunas zonas de crecimiento donde puede presentar escamas color marrón oscuro; Dichas características coinciden con las descritas por Cáceres (2006). Aunque se requiere de mucho conocimiento para identificar estas características entre especies de forma macroscópica, no es una tarea

imposible para un experto, sin embargo, cuando se trata de material fragmentado y/o seco, es prácticamente imposible su identificación a ojo humano.

Los caracteres morfoanatómicos que comparten microscópicamente entre ellas son: una fina cutícula en la cara adaxial de las frondes, epidermis con células rectangulares-cuadradas, parénquima lagunoso en la nervadura principal de las frondes y células esponjosas en su mesófilo, en el rizoma se encuentra parénquima de almacenamiento, además, se evidencia la presencia de una vaina de células engrosadas en U que adquieren un color café-rojizo por la presencia de taninos, dichas células rodean a los haces anficribales en las frondes y meristelas en el rizoma, así mismo en el rizoma se encuentra una endodermis precedida de un periciclo de 1-2 células de grosor y finalmente floema rodeando los conductos del xilema en las tres especies, dichos caracteres coinciden con los descritos por Gattuso (2008). Además se encontraron macroesclereidas en las tres especies, las cuales no se encontraron reportadas en la literatura, hallándose una gran cantidad de ellas en sus frondes, estas se encuentran generalmente en hojas y tallos, para brindarle firmeza y soporte a las mismas según lo describen Martín y Saco (2012).

Algunas de las características morfoanatómicas que pueden emplearse para hacer una descripción diagnóstica entre estas especies y que no se encontró en la literatura son; la forma que presentan las nervaduras principales en los cortes transversales de las frondes que puede ser elíptica vertical perpendicular respecto al folio con epidermis prominente en ambas caras adaxial y abaxial en *Ph. decumanum*, elíptica horizontal con respecto al folio con epidermis prominente hacia la cara y abaxial en *Ph. pseudoaureum* y en forma de pera con la epidermis prominente hacia ambas caras del folio en *S. triseriale*. La disposición en que se encuentra el xilema en los haces anficribales, tanto en los cortes transversales de fronde como rizoma, puede emplearse también para identificarlas, por la marcada diferencia morfológica que presentan entre ellas. Respecto al disociado, este puede emplearse para discriminar estructuras características de cada una de las tres especies, pues tienen al menos un tipo diferente de fibra entre ellas y las osteoesclereidas que están presentes en dos de ellas menos en *S. triseriale*, además pueden diferenciarse por el tipo de engrosamiento que presentan las traqueidas. Tal como Lapp, Jáuregui y Ruiz (2004)

dicen, que los caracteres anatómicos más importantes para la separación de las especies son: ubicación de los estomas, tipo de tricoma, tipo y disposición de los haces vasculares, presencia de cavidades secretoras en el haz vascular y la nervadura principal.

Aplicando técnicas de diafanizado y coloración a las frondes fue posible estudiar los diferentes tipos de estomas que presentan, los cuales ayudan a realizar una diferenciación entre las especies estudiadas, como lo describen Luján, Morero y Barboza (2011) en los estudios que realizaron con helechos y licófitas, donde describen que el indumento y los tipos de estomas fueron los caracteres más significativos para diferenciar taxones a nivel específico e inespecífico.

Sin embargo, el índice de estomas no resultó significativo, porque según Gonzáles & Casares (1996) este puede ser fácilmente modificable según las condiciones ambientales en las que se encuentren; y teniendo en cuenta que las plantas empleadas para esta investigación crecieron todas en el mismo lugar bajo las mismas condiciones, pudo ser el motivo por el cual todas presentaron un índice de estomas similar.

Por otra parte, la presencia de algunos metabolitos secundarios puede proporcionar una explicación presuntiva para algunas de las atribuciones medicinales que se le han conferido a la calahuala contra gastritis, úlceras, artritis, entre otras afecciones inflamatorias, que podrían estar relacionadas con la presencia de saponinas y mucílagos que tienen propiedades antiinflamatorias (Cáceres, 1996; Cáceres, 2006).

La atropina y la papaverina se encontraron presentes en frondes y rizomas de *Ph. decumanum* y *Ph. pseudoaureum*, lo que puede conferirles a dichas plantas el efecto antiespasmódico y analgésico al aplicarse en la medicina tradicional, ya que según el *vidal vademécum spain* (2010), estos dos metabolitos en asociación tienen un efecto espasmolítico y analgésico, indicado para dolores espasmo-musculares gastrointestinales, vías biliares y aparato genitourinario.

Se evidenció a través de métodos cromatográficos la presencia de rutina, ácido clorogénico, quercetina, ácido caféico en las frondes de las tres especies, aunque estos solo se detectaron en el rizoma de *ph. decumanum*, coincidiendo con lo reportado por Aldana (2007). Los resultados de cumarinas coincidieron en las pruebas en tubo y las de cromatografía de capa fina, dando negativo únicamente en el rizoma de *Ph. decumanum*. El tanino del rizoma de *S. triseriale* y la fronde de *Ph. pseudoaurem* que se encontró fue el catecol; que según Kuskoski y otros (2005), puede conferir propiedades astringentes útiles en casos de estados diarreicos.

Para la determinación de los parámetros de calidad de la droga, además del disociado, se empleó la determinación de cenizas totales y humedad. Indicando con este parámetro la calidad en el secado de las muestras estudiadas, y de acuerdo a la especificación de calidad para materia prima establecida internacionalmente por la OMS debe ser menor al 10 % para evitar contaminación, lo que nos dio a conocer que las muestras empleadas poseían una calidad óptima ya que el porcentaje de humedad máximo que se obtuvo fue en el fronde de *S. triseriale* con 7.86% y la mínima de 4.35% de humedad en el fronde de *Ph. decumanum* (OMS, 1998).

El porcentaje de cenizas totales es un parámetro fisicoquímico del contenido de minerales y material orgánico presente en la droga vegetal, este no debe superar el 10% según la OMS, para lo que en las muestras empleadas para este estudio se obtuvo una media mínima de 3.01% para el rizoma de *S. triseriale* y una máxima de 8.80% para el rizoma de *Ph. pseudoaureum*, obteniendo con ello valores aceptables de calidad para las plantas estudiadas (OMS, 1998).

IX. CONCLUSIONES

- * Se pudo caracterizar las tres especies botánicas de helechos, utilizados como Calahuala.
- * La descripción botánica diagnóstica se realizó a partir de características anatómicas de los conductos vasculares y esclereidas para las tres especies de Calahuala.
- * Elaboró muestra patrón de fronde y rizoma de *Serpocaulon triseriale*.
- * Los metabolitos secundarios encontrados; saponinas mucílagos catecol, atropina y papaverina tienen relación directa con algunas de las propiedades que se le han atribuido al helecho Calahuala en la medicina tradicional.
- * Se estableció que la forma y estructura microscópica de la nervadura principal de cada especie estudiada es un parámetro microscópico diagnóstico para el control de calidad y elaboración de cartillas micrográficas.
- * De las tres especies de Calahuala estudiadas se establecieron parámetros útiles para el control de calidad de fronde y rizoma.
- * Con la información recabada en el estudio se evidenciaron las características de identidad y calidad para las tres diferentes especies de Calahuala analizadas.

X. RECOMENDACIONES

- * Emplear el método de corte a mano alzada para la identificación microscópica de plantas, por ser una técnica fácil de realizar, económica y con una curva de aprendizaje relativamente corta.
- * Continuar con el estudio y la investigación del helecho Calahuala en sus aplicaciones como planta medicinal, ya que esta cuenta con un amplio uso en la medicina tradicional.

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, L. (2006). Plantas Medicinales – Oportunidades y Perspectivas de mercado. La Habana, Cuba. Recuperado de: <http://www.herbotecnia.com.ar/c-public-012.html>.
- Aldana, F. D. (2007). Detección y cuantificación de flavonoides en *Polypodium triseriale* Swartz, *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. y *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger; Tres especies de calahuala nativas de Guatemala. (Tesis de maestría) Facultad de CCQQ y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Álvarez, E. (2006) Actividad inmunomoduladora de rizomas y frondas de *Phlebodium pseudoaureum* y *Phlebodium decumanum*. (Tesis) Facultad de CCQQ y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Amat, A.G. (1982). Interés farmacobotánico de las “Manzanillas”: principios activos, sustituyentes y estado taxonómico. [Versión electrónica] Acta farmacéutica Bonaerense 1 (1), 49-52.
- Arce, F., Buleta, L., Mayorga, M. & Fernández, F. (junio, 2001) Microfotografía barata y sencilla; IV Congreso Virtual Hispano Americano De Anatomía Patológica, Recuperado de: <http://conganat.uninet.edu/IVCVHAP/PDF/P054.pdf>
- Bucciarelli, A, Hansen, P. & Cambi, V. (2009). Estudio morfoanatómico y micrográfico de *Pluchea microcephala* R.K. Godfrey (Asteraceae) empleada en medicina tradicional en Argentina. Argentina: [Versión electrónica] FYTON, 78(2), 135-140.
- Cáceres, A. (1996). Plantas de uso medicinal en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria.

- Cáceres, A. (2006). *Vademécum nacional de plantas medicinales*. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Cáceres, A., Saravia, A. & Jauregui, E. (1993). Actividad antiinflamatoria de plantas medicinales de uso popular en Guatemala. Guatemala: Editorial Vile.
- Cambi, V., Bucciarelli, A., Flemmer, A. & Hansen, P. (2006). Morfoanatomía de *Pluchea sagittalis* (Asteraceae) especie nativa de interés medicinal. [Versión electrónica] Acta Farm. Bonaerense, 25(1), 43-49.
- Cañigual, S., Dellacassa, E. & Bandoni, A. L. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?. Lat. Am. J. Pharm. 22 (3): 265-278.
- Castillo, M. & Pérez, M. (2011). Técnicas de caracterización micromorfológica de plantas medicinales: Procedimientos operativos estándares (POE) No. 1-4, 6. Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Citohistología, Facultad de C.C.Q.Q. y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Centroamérica: Productos Farmacéuticos. Medicamentos de Uso Humano. Buenas Prácticas de Manufactura para la Industria Farmacéutica. Reglamento Técnico Centroamericano. RTCA 11.03.42:07
- Centroamérica: Productos Farmacéuticos. Productos Naturales Medicinales para Uso Humano. Verificación de la Calidad. Reglamento Técnico Centroamericano. RTCA 11.03.56:09
- Cronquist, A. (1987). Introducción a la Botánica. México: editorial Continental.
- Cruz, S. (2005). Manual de operaciones: Procedimientos operativos estándares (POE) No. 1, 3 y 4. Laboratorio de investigaciones de productos naturales (LIPRONAT).

Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ely, F., Torres, F., Roda, F. & León, Y. (2007) Estudio morfo-anatómico de dos orquídeas de una selva nublada tropical. [Versión electrónica] *interciencia*, 32(6), 39-44.

García, CL. (2005) Estudio de las condiciones ambientales de la Calahuala (*Phlebodium* spp.) en la Sierra Caral, municipio de Morales, departamento de Izabal, Guatemala. (Tesis de Maestría) Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Gattuso, MA., Cortadi, A. & Gattuso, S. J. (2008). Caracteres morfoanatómicos de especies de *Phlebodium*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y Aromáticas*: Santiago, Chile, 7(1), 10-17.

Gattuso, MA. & Gattuso, SJ. (1999). Manual de procedimientos para el análisis de drogas en polvo. Argentina: editorial de la universidad nacional de rosario.

Girón, L. & Cáceres, A. (1994). Técnicas Básicas para el cultivo y procesamiento de plantas medicinales. Guatemala: Centro Americano de Estudios sobre Tecnología Apropriada (CEMAT).

Gonzáles, J.A., Guisado, R., Molina, E. & de Teresa, C. (2008). Efecto protector de *Phlebodium decumanum* sobre la fatiga muscular inducida por el ejercicio en sujetos no entrenados. *Murcia*, 3(1), 101-106.

Gonzáles, M. & Casares, M. (1996). La anatomía vegetal como método de identificación en etnobotánica. *Monograf. Jard. Bot. Córdoba* 3:33-37

Guatemala: Congreso de la República. (2006). Ley del Sistema Nacional de la Calidad, decreto No. 78-2005 (2a ed.). Guatemala: s.n. (p. 3-4)

Guatemala: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT), Secretaría Nacional de

Ciencia y Tecnología (SENACYT), Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONAYT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC), (2010) Selección de materiales de Calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) con fines de mejoramiento genéticos para la producción de metabolitos secundarios.

Guatemala: Dirección General de Regulación, Vigilancia y Control de la Salud (DGRVCS), Departamento de Regulación y Control de Productos Farmacéuticos y Afines (DRCPFA). (2001). Normativa 24- 2001. (p. 2).

Guevara, L. & Ganzón, P. (2008) Morfoanatomía de órganos vegetativos aéreos en *Desmoncus orthacanthos* Mart. (Arecaceae). Venezuela: [Versión electrónica] ERNSTIA, 18(1), 71-88.

Jímenez, J. B. (2010). Los helechos del bosque Nuboso de baja Verapaz, Guatemala. Costa Rica: Instituto Nacional de biodiversidad, INBIO.

Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia, estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. España: Ediciones omega, S.A.

Kuskoski, E., Roseane, F., García, A. & Troncoso G. (2005) propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). Vitae, Colombia. ISSN 0121-4004.

Kvist, L.P., Oré, I., Gonzales, A. & Llapasca, C. (2001). Estudio de plantas medicinales en la amazonia peruana: Una evaluación de ocho métodos etnobotánicos. [Versión electrónica] Folia Amazónica Vol., 12 (1-2), 53-73.

Lapp, M., Jáuregui, D., & Ruiz, T. (2004). Anatomía foliar de ocho especies venezolanas del género *Oyedaea* DC. (Asteraceae- Heliantheae). Acta Botánica Venezuelica, 27(1), 1-16.

- Looser, G. & Rodríguez, R. (2004). Los helechos medicinales de Chile y sus nombres vulgares. [Versión electrónica] Chile: Gayana bot, 61(1), 1-5.
- Luján, M., Morero, R. & Barboza, G. (2011). Estudios epidérmicos en helechos y licófitas medicinales de la Provincia de Córdoba, Argentina. [Versión electrónica] Hoehnea 38(4), 609-659.
- Martin, S. & Saco, D. (2012). Estudio de los tejidos para la caracterización de las plantas. Madrid: REDUCA. 4(5):1-26.
- Martínez, J.V., Bernal, H. & Cáceres, A. (2000). Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia: Convenio Andrés Bello y el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Ministerio de Educación y Cultura de España.
- Matias, E. (2008). Caracterización fitoquímica y cuantificación por espectrofotometría UV de flavinoides totales en extractos de rizomas y frondas de *Polypodium triseriales*. (Tesis); Facultad de CCQQ y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Meza, E., Sota, E. & Ferrucci, M. (2006). *Phlebodium aureum* (Polypodeaceae, Pteridiophita): Su presencia en Argentina. [Versión electrónica] Bol. Soc. Argent. Bot., 41(1-2), 71-76.
- Morán, R. (1996). Polypodiaceae. En: Davidse, G; Sousa, M& Chater, A. (Eds) Flora Mesoamericana (Vol. 5). México. Universidad Nacional Autónoma de México, Missouri Botanical Garden y The Natural History Museum.
- Morón, F. & Levy, M. (2002). Farmacología General. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.

- Muñoz, F. (2002) Plantas medicinales y aromáticas. Estudio cultivo y procesado. Madrid: Editorial Aedos S.A. 343p.
- Navarrete, H., León, B., Gonzales, J., Aviles, D., Lecaro, J., Mellado, F., Alban, J., et al. (2006). Helechos. *Botanica Económica de los Andes Centrales*. s.n., 385-411.
- Ocampo, R., Martínez, J. & Cáceres, A. (2007). Manual de Agrotecnología de plantas medicinales nativas. San José, Costa Rica: Ediciones Sanabria.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (1998). *Quality control methods for medicinal plant materials*. Ginebra: Autor. Recuperado de: <http://www.who.org>
- Petenatti, E., Petenatti, M., Cifuentes, D., Gianello, J., Giordano O., Tonn, C. & Del Vitto, L. (2007) Medicamentos Herbarios en el Centro-Oeste Argentino. VI. Caracterización y control de calidad de dos especies de “Carquejas” *Baccharis sagittalis* y *B. triangularis* (Asteraceae). [Versión electrónica] *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(2), 201-208.
- Portillo, P. & Mendoza, M. (2002) Extracto purificado de Calaguala en el tratamiento de la psoriasis en comparación con placebo, en un ensayo clínico controlado a doble ciego. [Versión electrónica] *Revista médica Hondureña*, 40(7), 235-239.
- Raymundo, M., Escala, M. & Xena, N. (2005). morfoanatomía foliar como herramienta para la delimitación de especies del género *Hymenocallis salisb.* (AMARYLLIDACEAE) presentes en Venezuela. [Versión electrónica] *Acta Bot. Venezuela*, 28(2), 155-164.
- Robles, G., Oliveria, K. & Villalobos, R. (2000). Evaluación De Los Recursos Forestales Mundiales 2000: Evaluación de los productos forestales no madereros en América Central. FAO. Recuperado de: www.fucema.org.ar/old/bosques/fao_situacion/parte2_b.pdf

- Rodriguez, M. (1998). *Introducción a la Fitoterapia y la Medicina Tradicional*. México: Editorial Herbal.
- Saravia, A. (2008) *Validación farmacológica de plantas medicinales de uso popular en Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Sosa, M. (2008) *Anatomía foliar y caulinar de Stemodia Hassleriana (Scrophulariaceae), una especie endémica de Paraguay*. [Versión electrónica] *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 43(3-4), 255 - 259.
- Stolze, R.G. (1981). *Ferns and Fern Allies of Guatemala: Part II Polypodiaceae (Serie 6)*. The United States of America: Field Museum of Natural History.
- Turano, F. & Cambi, V. (2009) *Control de calidad de mezclas de hierbas medicinales que se comercializan como adelgazantes y/o reductoras en Bahía Blanca*. [Versión electrónica] *Universidad Nacional de la Plata; Argentina*, 28(1), 10-18.
- Varela, B. & Gurni, A. (2003) *Análisis micrográfico de dos hemiparasitas Argentinas usadas en medicina popular y su aplicación en el control de calidad*. [Versión electrónica] *Acta Farm. Bonaerense*, 22(1), 45-52.
- Vidal vademécum spain. (2010) *Vidal group, drug information system*. Recuperado de: www.vademecum.es
- Villar, L. (1998). *La Flora Silvestre de Guatemala (Vol. 6)*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala: Editorial Universitaria.
- Villatoro, E. M. (1984). *Etnomedicina en Guatemala*. Centro de estudios folklóricos; Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria.

XII. ANEXOS

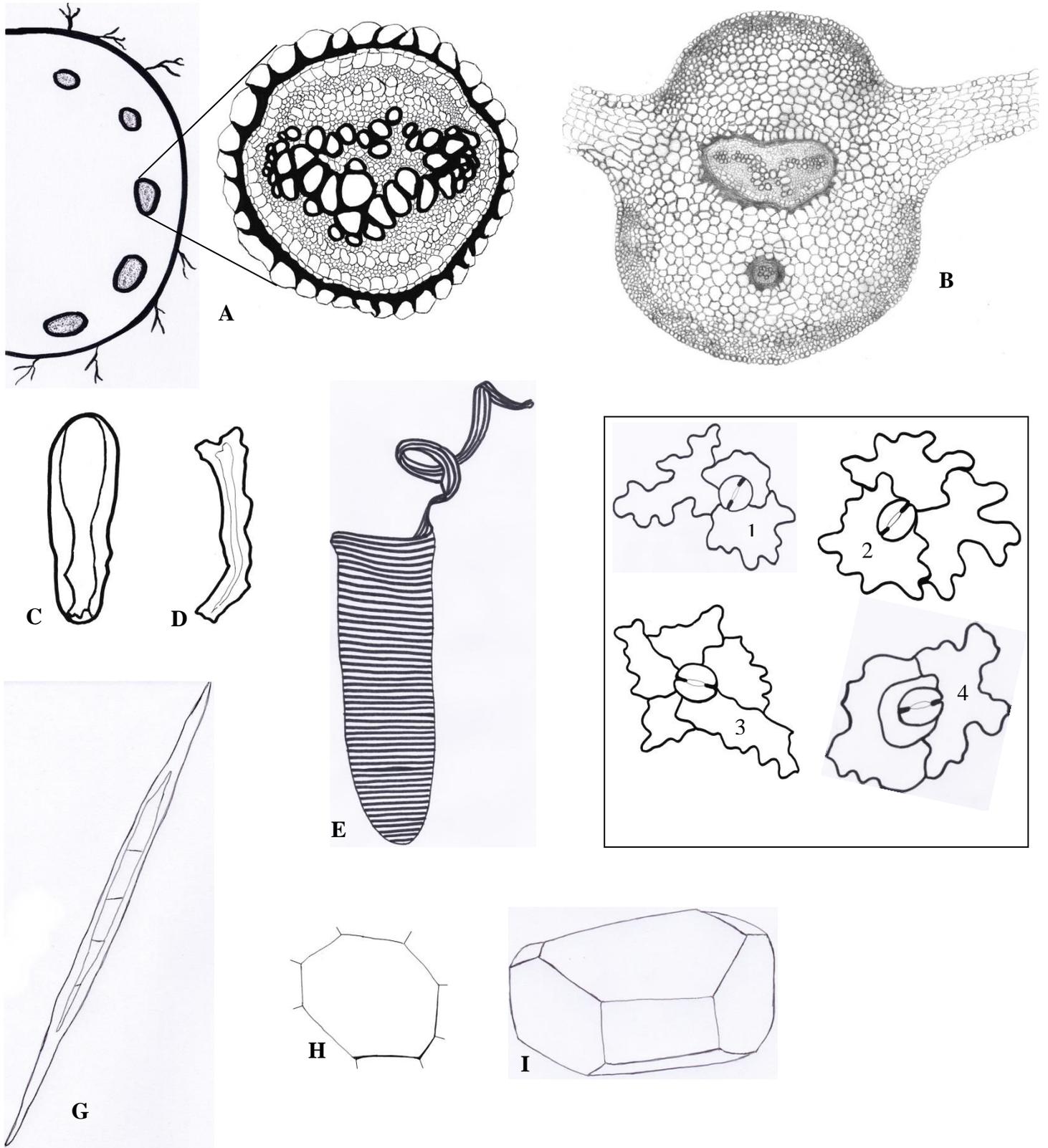


Figura 49: Cartilla micrográfica *Ph. decumanum*; A. ampliación de una meristela en el corte transversal de rizoma. B. corte transversal de nervadura central de fronde. C. macroesclereida D. osteoesclereida E. traqueida con engrosamiento helicoidal. F. tipos de estomas (1. anisocítico 2. polocítico 3. anomocítico 4. copolocítico). G fibra libriforme. H. célula parenquimática. I. célula isodiamétrica.

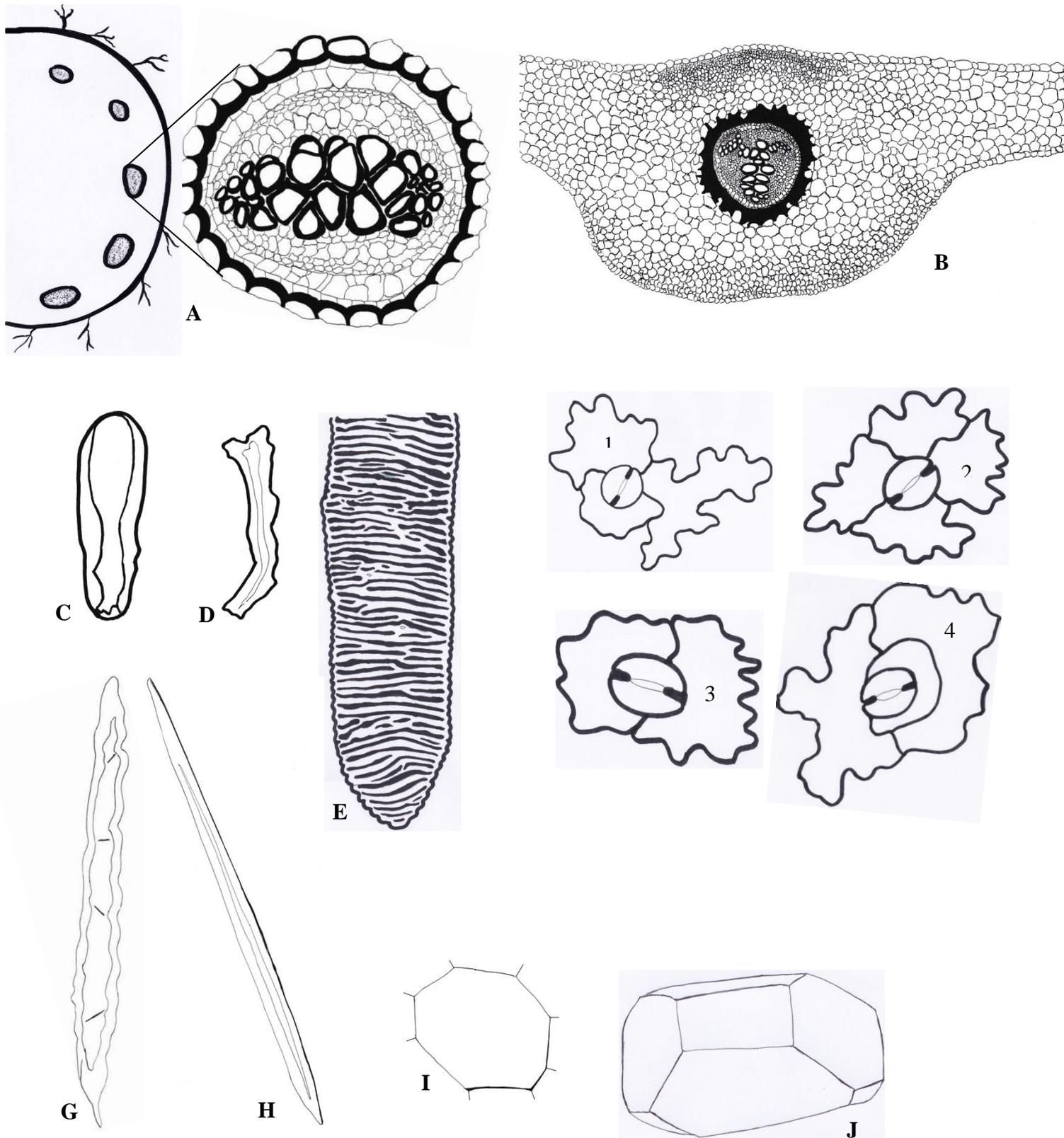


Figura 50: Cartilla micrográfica de *Ph. pseudoaureum*; A. ampliación de una meristela en el corte transversal de rizoma. **B.** corte transversal de nervadura central de fronde. **C.** macrosclereida **D.** osteosclereida **E.** traqueida con engrosamiento reticular. **F.** tipos de estomas (1. anisocítico 2. anomocítico 3. diacítico 4.copolocítico). **G** fibra dentada y septada. **H.** fibra gelatinosa. **I.** célula parenquimática. **J.** célula isodiamétrica.

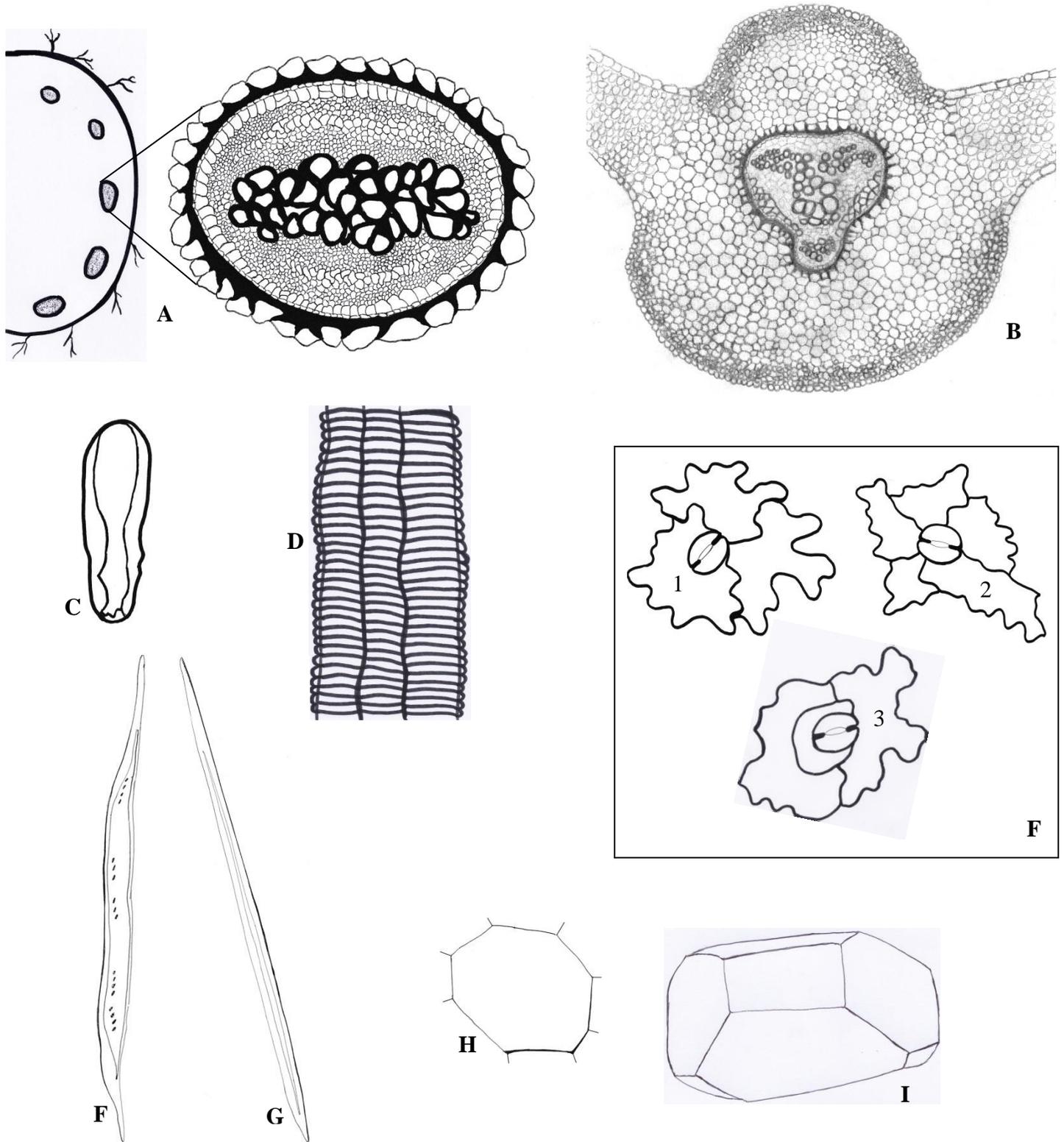


Figura 51 : Cartilla micrográfica de *S. triseriale*; A. ampliación de una meristela en el corte transversal de rizoma. **B.** corte transversal de nervadura central de fronde. **C.** macroesclerida **D.** traqueida con engrosamiento escalariforme. **E.** tipos de estomas (1. polocítico 2. anomocítico 3. copolocítico). **F.** fibroesclerida dentada. **G.** fibra gelatinosa. **H.** célula parenquimática. **I.** célula isodiamétrica.