



Órgano de divulgación de la Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala



Vol. XXIII, No. 1



Guatemala
2005

Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Junta Directiva

- Decano:* Dr. Ariel Ortiz López
Secretario: Ing. Agr. Pedro Peláez
Vocal I: Ing. Agr. Alfredo Itzep Manuel
Vocal II: Ing. Agr. Manuel de Jesús Martínez Ovalle
Vocal III: Ing. Agr. Erberto Raúl Alfaro Ortiz
Vocal IV: M.E.P.U. Juvencio Chom Camil
Vocal V: M.E.P.U. Bayron Geovany González Chavajay

Comité Editorial

- Ing. Agr. Juan Hervera D.*
Periodista Dennis Escobar Galicia

Revista  tikal
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala
Ciudad Universitaria, zona 12
Guatemala, Guatemala
Teléfono: (502) 2476-9770
Fax: (502) 2476-9770
Correo electrónico: comited.agro@usac.edu.gt

PRESENTACIÓN

El presente número de Revista TIKALIA contiene cinco artículos relacionados con las plantas medicinales. Fueron elaborados por estudiantes de la primera promoción de la Maestría Multidisciplinaria en Producción de Plantas Medicinales (MUPLAN), proyecto académico organizado por la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y la Facultad de Agronomía, ambas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Por la importancia que tiene el uso de las plantas medicinales en la terapéutica y por la riqueza florística de nuestro país, la FAUSAC ha venido desarrollando un proyecto agronómico que tiende a propiciar el cultivo de las más importantes. Objetivo que se complementa con la participación en el proyecto MUPLAN. Se espera con ello contribuir a mejorar la salud de la población y a que la industria farmacéutica tenga materia prima de calidad para la elaboración de sus productos.

Los artículos contenidos en este número de TIKALIA son los siguientes:

“Determinación de estándares de identidad y pureza de cuatro plantas medicinales comercializadas en Guatemala”, de María E. Paredes S. *Es un estudio que tiene como finalidad aportar información básica para la caracterización y control de calidad de la droga vegetal de cuatro especies medicinales, siendo éstas: el Timboco, la Chalchupa, la Hierba del Toro y el Ixbut.*

“Búsqueda de actividad contra especies de *Campylobacter* en Plantas Nativas de Guatemala”, de Ana M. Paz M. *Investigación que tiene como propósito implementar el bioensayo para la evaluación de actividad anti *Campylobacter* en extractos de diez especies nativas, cinco de las cuales tienen uso popular para tratar diarrea y enteritis y otras cinco plantas fueron seleccionadas por tener actividad contra agentes enteropatógenos.*

“Caracterización botánica y análisis del contenido mineral de *Smilax domingensis* Wild”, de Cecilia I. Cleaves H. Es un estudio que contribuirá a generar información básica para el aprovechamiento sostenible de esta planta nativa, utilizada como medicina pero que también es un suplemento alimenticio.

“Establecimiento del cultivo *in vitro* de Hierba Luisa, *Aloysia Triphylla* (L’Herit) Britt”, de María A. Ordóñez M. Es un estudio que demuestra la posibilidad de iniciar el cultivo *in vitro* de *A. Triphylla* a partir de segmentos foliares, como explantes, como primer paso para su micropropagación.

“Evaluación clínica de la efectividad de *Valeriana Prionophylla* como inductora del sueño”, de Elda C. Cruz. En este estudio se comparó la efectividad en la inducción del sueño de *V. Prionophylla* contra una técnica de relajación.

Patentizamos nuestro agradecimiento a los profesores de la Facultad de Agronomía que participaron como asesores de las tesis y revisores de los artículos aquí incluidos, siendo ellos: Ing. Agr. Vicente Martínez, Ing. Agr. Marino Barrientos, Ing. Agr. Domingo Amador, Ing. Agr. Darvín González y la Licda. Olga Leticia Mena.

Comité Editorial.

CONTENIDO

- 7 *Determinación de estándares de identidad y pureza de cuatro plantas medicinales comercializadas en Guatemala*
María E. Paredes S., Carolino Rosales,
Armando Cáceres, Vicente Martínez.
-
- 33 *Búsqueda de actividad contra especies de Campylobacter en plantas nativas de Guatemala.*
Ana M. Paz M., Armando Cáceres E., Olga R. Torres.
-
- 45 *Caracterización botánica y análisis del contenido mineral de Smilax domingensis Willd.*
Cecilia I. Cleaves H., Rodolfo M. Orozco Ch.
-
- 63 *Establecimiento del cultivo in vitro de hierba Luisa, Aloysia Triphylla (L'Hérit) Britt.*
María A. Ordóñez M., Carolina Rosales, Domingo Amador.
-
- 85 *Evaluación clínica de la efectividad de Valeriana prionophylla como inductora del sueño.*
Elda C. Cruz, Gilda R. Gomar, Marino Barrientos.

DETERMINACIÓN DE ESTÁNDARES DE IDENTIDAD Y PUREZA DE CUATRO PLANTAS MEDICINALES COMERCIALIZADAS EN GUATEMALA

María E. Paredes S.*
Carolina Rosales*
Armando Cáceres*
Vicente Martínez**



RESUMEN

Este estudio se desarrolló con la finalidad principal de aportar información básica para la caracterización y control de calidad de la droga vegetal de cuatro especies medicinales, basándose en algunos aspectos farmacobotánicos y de pureza. La información descrita facilitará la posterior elaboración de monografías farmacopéicas y manuales de control de calidad de materias primas y productos fitofarmacéuticos comercializados en Guatemala. Para ello se colectaron especímenes de cada una de las especies en estudio: el Timboco, *Tecoma stans* (L.) HBK (hoja y corteza); la Chalchupa, *Rauwolfia tetraphylla* L. (raíz) la Hierba del toro, *Tridax procumbens* L. (hierba) y el Ixbut, *Euphorbia lancifolia* Schlect. (hoja). De cada especie se prepararon ejemplares de herbario y muestras de droga seca, a partir de las cuales se establecieron estándares farmacobotánicos y de pureza. La información recabada de las drogas consistió en la descripción macroscópica y propie-

* Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

** Facultad de Agronomía.

dades organolépticas de las mismas, análisis anatómo-histológico y un tamizaje fitoquímico que permitió demostrar la presencia de los compuestos químicos característicos de cada especie, así como establecer aspectos histológicos particulares.

Palabras clave: droga vegetal, materia prima, control de calidad, farmacobotánico, organoléptico, anatómo-histológico, fitoquímico.

ABSTRACT

The current work was performed mainly to propose the basic information for the characterization and quality control of the herbal drugs of four medicinal species, based on pharmacobotanical and purity features. The described information will make easier the making of pharmacopeic monographies and manuals of quality control for raw materials and phytopharmaceuticals that are commercialized in Guatemala. For that purpose, specimens of each plant were collected: Timboco, *Tecoma stans* (L.) HBK (leaf and bark); Chalchupa, *Rauwolfia tetraphylla* L. (root); Hierba del Toro, *Tri-dax procumbens* L. (herb) and Ixbut, *Euphorbia lancifolia* Schlect (leaf). Herbarium and dried drug samples were prepared from each plant, and pharmacobotanical and purity standards were established. All the information collected from those drugs consisted on macroscopic description, organoleptic properties, anatomical and histological features, in addition to phytochemical screening tests, thus permitting the demonstration of chemical compounds characteristic to every species, and establishing particular histological features as well.

Key words: herbal drug, raw materials, quality control, pharmacobotanical, organoleptic, anatomical and histological, phytochemical.

INTRODUCCIÓN

En el mundo se ha evidenciado una creciente demanda por la utilización, producción y comercialización de materias vegetales y productos fitofarmacéuticos, sin embargo, aún cuando en nuestro país existe cultura y tradición en el uso de plantas medicinales, no se cuenta hasta la fecha con un marco legal para el desarrollo comercial de estos productos.

La contribución de este estudio consistió en establecer información que sirva de base, para la elaboración de normas de identidad y pureza de cinco drogas vegetales, procedentes de cuatro plantas medicinales, de las cuales ya existen en el mercado algunos productos comerciales. Las plantas se encuentran bajo cultivo controlado en el vivero de plantas medicinales del Centro Experimental Docente de Agronomía (CEDA) y además se cuenta con la droga seca de la misma procedencia en los laboratorios FARMAYA. Las drogas seleccionadas fueron: hoja y corteza de Timboco, raíz de Chalchupa, partes aéreas de Hierba del toro y hoja de Ixbut.

La información se obtuvo mediante la descripción de las características macroscópicas mínimas para la correcta identificación botánica de las plantas estudiadas, se realizó además el análisis micromorfológico e histológico del material vegetal fresco y seco, las pruebas microquímicas para identificar los compuestos característicos de las plantas en estudio y la determinación de cenizas totales y humedad de las muestras utilizadas en el estudio.

Generalmente el control de calidad de la materia prima se realiza sobre muestras de droga seca y en muchos casos fragmentada o pulverizada, lo cual no permite una clasificación botánica de la misma, por lo que se hace necesario contar con estándares de identidad como información organoléptica, microscópica e histoquímica que nos garantice que nos encontramos ante la materia

vegetal correcta, así como poder identificar posibles adulterantes dentro de la muestra.

Se espera con la elaboración de manuales de calidad, equiparar la fitoterapia como una opción terapéutica en los sistemas oficiales de salud, mejorar la competitividad de la industria fitofarmacéutica, la credibilidad por parte del sector médico e impulsar el uso y comercialización adecuada de dichos productos, así como la creación de nuevas fuentes de trabajo en beneficio del país.

Materiales y métodos

Las muestras botánicas de cada una de las plantas fueron recolectadas en el CEDA y a partir de ellas se prepararon ejemplares de herbario. Las muestras de la materia médica (droga cruda), de cada una de las especies del estudio, proporcionadas por FARMAYA, fueron colocadas en frascos de vidrio adecuados y debidamente identificados con etiquetas. A simple vista y con la ayuda de lupa y microscopio estereoscópico, se revisaron y anotaron todos los caracteres que ayuden a la correcta identificación de la materia médica fresca y seca, tales como: morfología, color, olor. Para cada una de las especies en estudio se elaboró una descripción botánica en base a lo descrito por la Flora de Guatemala, que permita una diagnosis taxonómica, práctica y resumida, para su clara identificación. Para el estudio microscópico del material fresco, se utilizaron las técnicas de embebido en parafina y cortes a mano alzada montados con gelatina. Para el estudio microscópico de la droga seca se utilizaron las técnicas de diafanizado para las hojas de Ixbut, Timboco y Hierba del Toro, y disociado fuerte para la corteza de Timboco y raíz de Chalchupa. Los materiales así procesados se tiñeron con Safranina.

Para el tamizaje fitoquímico se realizó la determinación de alcaloides, almidón, grasas, aceites esenciales, mucílagos, lignina, aleuronas, saponinas y taninos. Para ello se utilizaron cortes de

material fresco de acuerdo al procedimiento reportado por Gattusso (1999).

Entre las pruebas de pureza realizadas a la droga seca se hizo la determinación de cenizas, el cual da una idea del contenido total de minerales en la muestra. Para ello se colocó aproximadamente 1 gramo de droga seca de cada una de las especies en estudio en crisoles de porcelana, previamente calcinados y a peso constante, los crisoles con las muestras se introdujeron en un horno a 550°C hasta que se obtuvieron cenizas blancas, gris claro o gris-rojo. Se dejaron enfriar los crisoles en desecador. Se pesaron rápidamente y se anotaron los resultados, el procedimiento se repitió dos veces.

Para la determinación de humedad se consideró que por humedad del material se entiende la materia volátil que se elimina por calentamiento, conduciendo a la pérdida de peso de la muestra. La determinación se hizo por el método de termogravimetría en un equipo marca Sartorius, en el que se seleccionó un programa de 15 minutos a 105°C. Se determinó el porcentaje de humedad para cada droga vegetal y se repitió cinco veces el procedimiento.

Resultados y discusión

Propuesta de calidad de *Rauvolfia tetraphylla* L.

Nombre popular: Chalchupa.

Es un pequeño árbol o arbusto perteneciente a la familia Apocynaceae, la cual incluye varios géneros. Muchas especies del género *Rauvolfia* se cultivan con fines ornamentales por sus llamativas y fragantes flores.



Figura 1. Fruto Chalchupa, (*Rauvolfia tetraphylla*).

Fuente: Colección de plantas medicinales, CEDA.

Información de la droga vegetal (raíz seca)

Análisis macroscópico y organoléptico: La raíz seca de Chalchupa puede obtenerse entera o fraccionada, la droga fraccionada consiste en rodajas oblicuas y delgadas, con la superficie fisurada y color pardo claro, la región central lisa y amarillenta con una región medular color pardo oscuro. El olor es suavemente aromático, terroso y ácido.



Fig. 2: Droga seca entera.

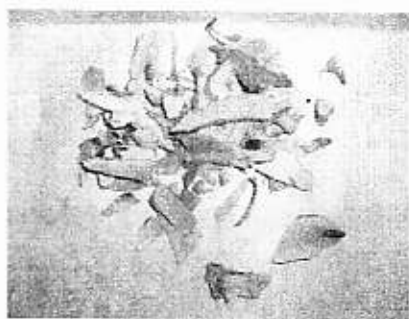


Fig. 3: Droga seca y fragmentada.

Análisis microscópico de la droga seca: El disociado de la droga seca muestra partes de la epidermis de la raíz con células poligonales pardo oscuro y células triangulares o rectangulares del córtex. Presenta además granos de secreción color pardo.

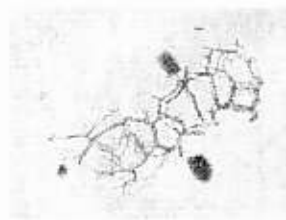


Fig. 4: Células epidérmicas.

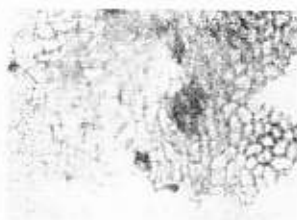


Fig. 5: Epidermis y córtex.



Fig. 6: Gránulos de secreción.

Análisis microscópico de la materia vegetal fresca: En el análisis microscópico del corte transversal de una raíz fresca, de más de un año de edad, se observa de afuera hacia adentro la presencia de córtex, peridermis, periciclo, floema, cambium vascular, xilema secundario y primario.

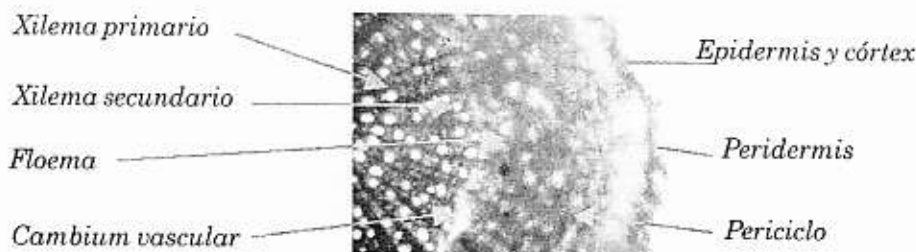


Fig. 7: Corte transversal de la raíz.

Tamizaje fitoquímico: De acuerdo a Cáceres (1999), la planta completa presenta alcaloides, glicósidos cardiotónicos, taninos y triterpenos. En las pruebas microquímicas se puede demostrar en todos los tejidos radiculares la presencia de alcaloides con la aparición de un precipitado rojo ladrillo, aceites volátiles con una coloración rojo claro, lignina con una coloración rojo intenso, mucílagos con un color azul Francia y una pequeña cantidad de taninos en la peridermis con una coloración azul verdosa.

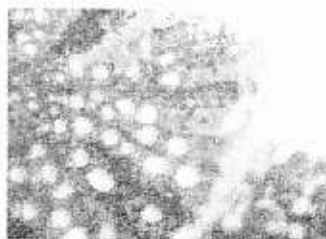


Fig. 8: Positivo alcaloides.



Fig. 9: Positivo débil taninos.



Fig. 10: Positivo lignina.



Fig. 11: Positivo débil mucílago.



Fig. 12: Positivo aceites volátiles.



Fig. 13: Positivo aceites volátiles.

Pruebas de pureza: El promedio de la humedad de la muestra patrón analizado fue de 9.43%, y las cenizas totales 5.53% (Anexo 1, Tablas 1 y 2), lo cual cumple con la norma establecida por la OMS.

Propuesta de calidad de *Tecoma stans* (L.) HBK

Nombre popular: *Timboco*.

El Timboco es miembro de la familia Bignonaceae, se caracteriza por la belleza de sus flores de color amarillo intenso, en algunos individuos casi anaranjadas, con finas líneas de color rojizo en el interior de la corola.



Figura 14: *Timboco (Tecoma stans)*. Fuente: Colección de plantas medicinales, CEDA.

Información de la droga vegetal (hoja seca).

Análisis macroscópico y organoléptico: La droga vegetal consistente en las hojas desecadas, cuando están sin fragmentar, presentan un color verde a pardo, opaco, de consistencia crustácea,

pecioladas, lanceoladas, 4-10 cm de largo, atenuado-acuminadas en el ápice, cuneadas en la base, aserradas, glabras, envés punctato, nervaduras retrobarbadas, más evidentes en el envés. Por su consistencia las hojas tienden a romperse por lo que normalmente la droga vegetal está formada por fragmentos irregulares de hoja color verde castaño claro y opaco, de olor suavemente aromático, ahumado, ácido, dulce y agradable.



Fig. 15: Droga seca sin fragmentar.

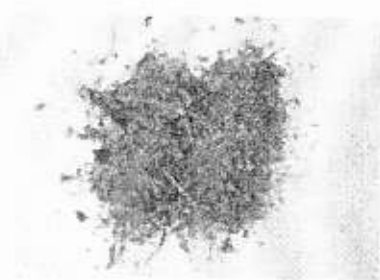


Fig. 16: Droga seca fragmentada.

Análisis microscópico de la droga seca: El diafanizado de la hoja seca de Timboco, muestra los estomas anomocíticos, las bases de tricomas glandulares en forma de roseta, los engrosamientos secundarios de los elementos traqueales helicoidales y la nervación caspedódroma mixta.



Fig. 17: Glándulas y nervaduras.



Fig. 18: Glándulas y epidermis.



Fig. 19: Estoma anomocítico.



Fig. 20: Glándulas y estomas.



Fig. 21: Haces vasculares.



Fig. 22: Nervación.

Análisis microscópico de la materia vegetal fresca: En el corte transversal de la hoja, se observa una cutícula gruesa formada por una monocapa de células en la epidermis del haz (cara adaxial), en el mesófilo una capa de parénquima en empalizada, parénquima lagunar laxo o parénquima esponjoso y una capa de células epidérmicas en el envés. En el corte transversal de la nervadura central se observa la disposición biclateral de los haces del xilema. En la disección de la epidermis de la hoja, se observan gruesas bases de tricomas glandulares y estomas anomocíticos.



Fig. 23: Corte transversal hoja.



Fig. 24: Corte transversal nervadura.

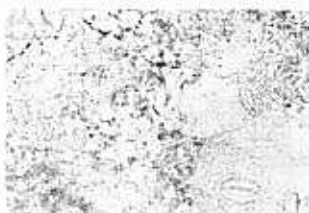


Fig. 25: Disección de epidermis.



Fig. 26: Estoma anomocítico.



Fig. 27: Detalle de los haces del xilema.

Tamizaje fitoquímico: De acuerdo a Cáceres (1999), las hojas de Timboco contienen alcaloides, triterpenoides, resinas, cera, aceite esencial, sales minerales, grasa, taninos, azúcares y glucósidos iridioides. El tamizaje permitió demostrar la presencia de abundantes aceites esenciales, sobre todo en la epidermis y la base de los tricomas, alcaloides, en la nervadura central, y mucílagos en la epidermis y la nervadura.



Fig. 28: Aceites esenciales, positivo.



Fig. 29: Mucílagos positivo.

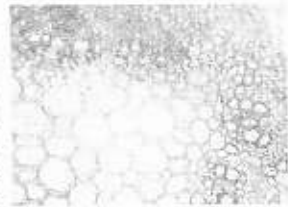


Fig. 30: Alcaloides positivo.

Pruebas de pureza: El promedio de la humedad de la muestra patrón analizada fue de 8.15% y las cenizas totales de 4.44% (Anexo 1, Tablas 1 y 2), lo cual cumple con la norma establecida por la OMS.

Información de la droga vegetal (corteza)

Análisis macroscópico y organoléptico: La droga seca vegetal consistente en trozos de corteza color pardo claro, superficie gruesa y áspera color pardo oscuro, la madera interior es de una textura muy fina con suaves vetas pardo oscuro. Presenta un suave olor a paja seca.



Fig. 31: Droga seca (corteza).

Análisis microscópico de la droga seca: El disociado de la corteza del Timboco, muestra células aplanadas del tejido suberoso de la corteza y fibras xílicas, además se observa el cambium vascular estratificado con rayos vasculares o sistema radial orientado en forma horizontal, compuesto por largas células parenquimáticas.



Fig. 32: tejido suberoso.

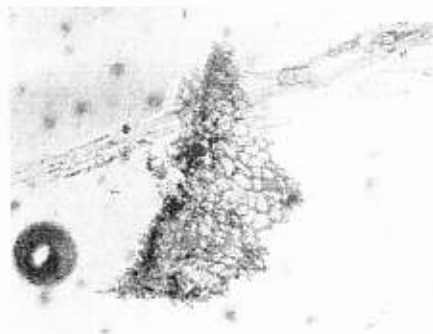


Fig. 33: Fibras y tejido suberoso.



Fig. 34: Rayos del cambium.

Análisis microscópico de la materia vegetal fresca: El análisis microscópico del tallo de Timboco nos muestra las características de los tallos de las angiospermas, con xilema endarco y floema centrípeto. Se observa además la presencia de tricomas pluricelulares en la superficie del tallo.

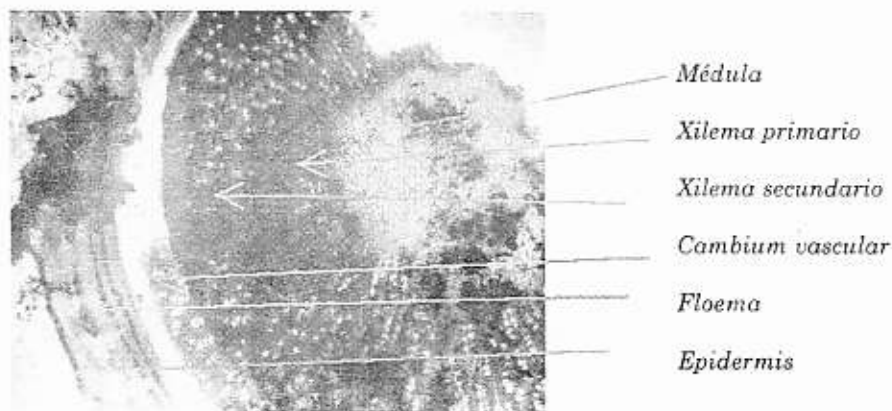


Fig. 35: corte de tallo.



Fig. 36: Tricomos del tallo.

Tamizaje fitoquímico: Cáceres (1999) reporta la presencia de alcaloides, triterpenoides, resinas, cera, aceite esencial, sales minerales, grasa, taninos, azúcares y glucósidos iridioides en la corteza. El tamizaje permitió demostrar la presencia de aceites esenciales en la peridermis, y en el resto de tejidos alcaloides, mucílagos, lignina y taninos.



Fig. 37: *Aceites esenciales.*



Fig. 38: *Mucílagos positivo.*



Fig. 39: *Lignina positivo.*



Fig. 40: *Taninos positivo.*

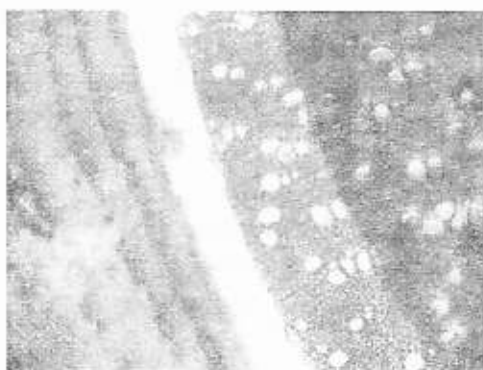


Fig. 41: *Alcaloides positivo.*

Pruebas de pureza: El promedio de la humedad de la muestra patrón analizada fue de 8.75% y las cenizas totales de 4.84% (Anexo 1, Tablas y 2), lo cual cumple con la norma establecida por la OMS.

Propuesta de calidad de *Tridax procumbens* L.

Nombre común: Hierba del Toro.



Es una planta verde perenne, que crece en forma silvestre en campos de maleza y praderas, en suelo cubierto de arena a las orillas de arroyos o caminos así como en terrenos valdíos. Pertenece a la familia Asteraceae y es nativa de México y Centroamérica.

Figura 42: Hierba del Toro (*Tridax procumbens*).

Fuente: Colección de plantas medicinales, CEDA.

Información de la droga vegetal (Hierba)

Análisis macroscópico y caracteres organolépticos: La droga seca está constituida por fragmentos de tallos con hojas y flores de aproximadamente 10 cm de largo, las hojas pequeñas, color verde grisáceo, opacas, pilosas con textura crustácea, los tallos largos, color verde pardo, algunos amarillentos, pilosos, delgados y quebradizos, las flores si las hay son cabezuelas con lígulas amarillas muy pequeñas. El olor recuerda el de la hierba recién cortada.



Fig. 43: Droga seca sin fragmentar.

Fig. 44: Droga seca fragmentada.



Análisis microscópico de la droga seca: El diafanizado de la hoja de hierba del toro muestra abundantes tricomas de 3 células, con grandes bases glandulares, ubicados sobre toda la hoja y los bordes incluyendo el ápice, diminutos y múltiples estomas anomocíticos, células epidérmicas muy irregulares y una compleja red vascular.



Fig. 45: Epidermis y estomas.



Fig. 46: Detalle de estoma.



Fig. 47: Nervación.



Fig. 48: *Tricomos del ápice.*



Fig. 49: *Bases glandulares.*



Fig. 50: *tricomos tricelulares.*

Análisis microscópico de la materia vegetal fresca: El corte transversal de la hoja muestra la epidermis uniestratificada, un estrato de parénquima clorofílico en empalizada, parénquima esponjoso bastante compacto y tricomas glandulares. La nervadura muestra un haz vascular. En la disección de la epidermis se observan los estomas con clorofila en las células oclusivas y en ambos extremos. Los tallos también muestran los haces vasculares en anillo con una médula muy grande y colénquima anular.



Fig. 51: Corte transversal de la hoja. **Fig. 52:** Estomas anomocíticos.

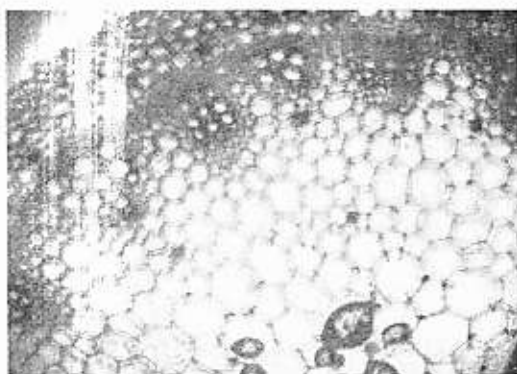


Fig. 53: Corte transversal del tallo.

Tamizaje fitoquímico: De acuerdo a Cáceres (1999), toda la planta presenta esteroides/terpenoides, flavonas, taninos, saponinas, azúcares y beta-sistosterol, el tamizaje fitoquímico permitió demostrar la presencia de mucílagos en las células parenquimáticas de la hoja y el tallo, alcaloides y taninos entre el parénquima en empalizada y el parénquima esponjoso y en el parénquima cortical del tallo, saponinas en la hoja y aceites esenciales en la cutícula y la base de los tricomas.



Fig. 54: *Mucílagos en tallo.*



Fig. 55: *Alcaloides en tallo.*



Fig. 56: *Taninos en tallo.*



Fig. 57: *Reacción positiva para saponinas.*



Fig. 58: *Reacción positiva de aceites.*

Pruebas de pureza: El promedio de la humedad de la muestra patrón analizada fue de 9.44% y de cenizas totales 4.57% (Anexo 1, Tablas 1 y 2), lo cual cumple con la norma establecida por la OMS.

Propuesta de calidad de *Euphorbia lancifolia* Schlectht

Nombre común: *Ixbut*.



El Ixbut es una especie que pertenece a la familia Euphorbiaceae, de hábito semirrastrero originaria de Guatemala, crece en bosques húmedos y sombreados. Ampliamente conocida por sus propiedades galactogogas, tanto para humanos como para animales.

Figura 59. *Ixbut (Euphorbia lancifolia).*
Fuente: Colección de plantas medicinales, CEDA.

Información de la droga vegetal (Hoja)

Análisis macroscópico y organoléptico: La droga vegetal consiste en hojas secas color verde amarillento más oscuras y lisas por el haz y ligeramente aterciopeladas y blanquecinas por el envés, borde liso ligeramente curvado hacia el envés, pecioladas, base atenuada con nervación braquidódroma, nervadura y nervios laterales blanquecinos, la nervadura central muy marcada. Los trozos de tallo son lisos, color verde con entrenudos pardo rojizos. Presenta un olor dulce y agradable y una consistencia papirácea poco quebradiza.



Fig. 60: *Droga seca sin fragmentar.*

Análisis microscópico de la droga seca: El diafanizado de la hoja muestra epidermis de células poligonales, abundantes tricomas glandulares y tectores, los glandulares osteolados de 3 células, sobre base pluricelular de 8 células radiales, los tricomas tectores pluricelulares ubicados en el borde y algunos en la superficie de la hoja, estomas anomocíticos, engrosamientos de los elementos traqueales escalariformes.



Fig. 61: *Tricomas tectores.*



Fig. 62: *Tricomias glandulares.*



Fig. 63: *Elementos traqueales.*

Análisis microscópico de la materia vegetal fresca: El corte transversal de la hoja muestra una epidermis uniestratificada de células planas con un estrato de parénquima clorofílico en empalizada con células de tamaño irregular, el mesófilo esponjoso (aerénquima) con abundantes espacios aéreos. El corte transversal de la nervadura central muestra una capa de parénquima gruesa y compacta con un haz colateral. El tallo, es hueco y muestra un haz vascular en anillo, característico de las dicotiledóneas y se observa el colénquima laminar. La disección de la epidermis muestra estomas anomocíticos.



Fig. 64: *Corte transversal de la hoja.*



Fig. 65: *Parénquima clorofílico.*



Fig. 66: *Aerénquima.*



Fig. 67: *Estomas anomocíticos.*



Fig. 68: *Nervadura central.*



Fig. 69: *Colénquima laminar.*

Tamizaje fitoquímico: No se encontró información sobre la composición química de el Ixbut, en las pruebas histoquímicas se demostró la presencia de aceites esenciales, alcaloides y mucílagos.



Fig. 70: *Aceites esenciales positivo.*



Fig. 71: *Alcaloides positivo.*

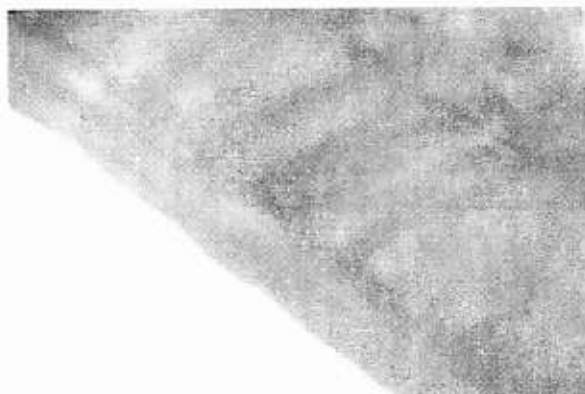


Fig. 72: Mucílagos positivo.

Pruebas de pureza: El promedio de la humedad de la muestra patrón analizada fue de 9.61% y las cenizas totales 2.76% (Anexo 1, Tablas 1 y 2), lo cual cumple con la norma establecida por la OMS.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- *El primer paso para lograr una calidad adecuada de la materia prima, necesaria para la industrialización de los productos fitofarmacéuticos, es la correcta identificación de las especies botánicas y la demostración de la presencia de los principios activos responsables del efecto terapéutico deseado.*
- *Es posible establecer características específicas para cada droga vegetal a partir de técnicas histológicas e histoquímicas.*
- *El uso de diferentes coloraciones permite identificar de mejor forma las estructuras de la microanatomía vegetal.*
- *La determinación de humedad y cenizas totales de la droga seca utilizada en este estudio está ajustada a la norma de la OMS.*

- *Se cumplieron satisfactoriamente todos los objetivos planteados.*
- *La elaboración de este trabajo permitió elaborar las bases para el desarrollo de monografías de calidad de las cinco drogas en estudio.*
- *Es necesario completar los estudios de estas cinco drogas vegetales para elaborar las monografías de las cuatro especies estudiadas.*
- *Es importante continuar recabando información de las especies medicinales, ya que aún falta mucho por hacer, y son muchas las especies cuya utilidad ha sido reconocida durante distintas épocas y diversos países como recursos herbolarios de las llamadas medicinas tradicionales, y que ahora emergen como candidatos importantes para el desarrollo de fitofármacos, para el tratamiento de tantas enfermedades que aquejan a la población guatemalteca, que no tiene acceso a medicamentos de síntesis, o que por los efectos adversos de los mismos, hacen necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.*

BIBLIOGRAFÍA

- Cáceres, A. *Plantas de uso medicinal en Guatemala. 1 Ed. Guatemala: Editorial Universitaria, USAC. 1999. 402 p.*
- Cañigueral S. *La fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio?. Revista de Fitoterapia 2002;2:101-121.*
- Gattuso M, Gattuso S. *Manual de Procedimientos para el análisis de drogas en polvo. Argentina: Editorial UNR. 1999. 26p.*
- Golberg H.S. *De la fitoterapia a la etnomedicina. Fitociencia. 1999;11:16-17.*
- Rosengarten FA. *Neglected Mayan galactagogue - Ixbut (Euphorbia lancifolia). Journal of Ethnopharmacology. 1982;5: 91-112.*
- Stanley PC, Williams LO. *Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany, 1966;24(8):381.*

BÚSQUEDA DE ACTIVIDAD CONTRA ESPECIES DE *CAMPYLOBACTER* EN PLANTAS NATIVAS DE GUATEMALA

Ana M. Paz M.*
Armando Cáceres*
Olga R. Torres**



RESUMEN

Las infecciones bacterianas que causan diarrea constituyen un problema de salud muy importante en Guatemala. Uno de los principales agentes es el bacilo Campylobacter jejuni, cuyo cuadro clínico varía desde asintomático hasta una enfermedad diarreica aguda que cursa con fiebre, dolor abdominal y heces diarreicas con presencia de leucocitos, moco y sangre. C. jejuni cobra interés por su capacidad de desarrollar rápidamente resistencia a los antimicrobianos de elección, lo que reduce el espectro de opciones terapéuticas y obliga a la búsqueda de alternativas terapéuticas en el reino de las plantas que es una vasta fuente de sustancias activas por investigar. El propósito de este trabajo fue implementar el bioensayo para la evaluación de actividad anti-Campylobacter en extractos de diez especies nativas,

* Dept. Citohistología, Escuela de Química Biológica, Facultad de CCQQ y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

** Laboratorio de Microbiología, Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá, INCAP.

cinco de las cuales tienen uso popular para tratar diarrea y enteritis y otras cinco plantas fueron seleccionadas por tener actividad contra otros agentes enteropatógenos. Dos metodologías fueron evaluadas, resultando la técnica de difusión en agar como más adecuada. Ninguna de las plantas evaluadas fue activa contra el patógeno.

ABSTRACT

Bacterial infections that cause diarrhea are a major health problem in Guatemala. One of the main agents is the Gram negative bacillus, Campylobacter jejuni, with a clinical picture that ranges from asymptomatic to an acute diarrheic disease with the presence of leukocytes, mucus and blood. C. jejuni becomes more important since it has the ability to rapidly develop resistance to antimicrobial agents, which reduces the scope of therapeutic options. Such situation demands the search of new therapeutic alternatives among the kingdom of the plants which is a vast source of active substances to investigate. The purpose of this study was to implement a bioassay for the estimation of anti-Campylobacter activity in extracts of ten native species of plants. Five of the selected plants are popularly used to treat gastrointestinal disorders such as diarrhea and enteritis and the other five were selected for their formerly proved activity against other enteropathogen agents. Two methods were evaluated and the agar diffusion technique was found as the most adequate. None of the studied plants were active against the pathogen.

Palabras clave: bioensayo; antimicrobiano; enteropatógeno.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas que ocasionan enfermedad diarreica constituyen un problema de salud en Guatemala, ya que prevalecen en el país las condiciones sanitarias y nutricionales favorables para su desarrollo. La enteritis es una forma clínica importante caracterizada por diarrea acuosa, dolor abdominal y en ocasiones acompañada de sangre y moco, cuyos agentes causales son principalmente especies de los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* y miembros de la especie de *Escherichia coli*: enterotoxigénica (ETEC), enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC) y enteroinvasiva (EIEC).

En los últimos años la tasa de infecciones por *Campylobacter* ha ido en incremento, con cifras que exceden muchas veces a los casos de salmonelosis y shigelosis. Los datos sobre la incidencia de los miembros patógenos de la especie *E. coli* no se conocen con certeza, aunque se sabe que la mayoría de casos es por ETEC.

C. jejuni es una de las bacterias más frecuentemente aisladas de las heces de niños con diarrea en los países en desarrollo, como resultado de alimentos y agua contaminados. Según datos de hace más de diez años, en Guatemala existía ya una tasa de aislamiento de 12.1% de *Campylobacter* spp. en niños menores de 5 años (Cruz 1994).

La enteritis por *Campylobacter* es autolimitante en personas inmunocompetentes y no se suele recomendar terapia antimicrobiana. En países en desarrollo los niños presentan diversos grados de desnutrición, que redundan en su competencia inmunológica, haciendo necesaria la aplicación de antibióticos para su control. Los antibióticos de elección son la eritromicina y la ciprofloxacina.

*La investigación de esta infección en Guatemala refiere una tasa entre 7 y 12.1% en niños con diarrea o disentería, y de 8.1% en niños asintomáticos. Las manifestaciones clínicas más importantes de la infección por *C. jejuni* son la diarrea acuosa con abundante cantidad de leucocitos, dolor abdominal y fiebre, presentando en ocasiones disentería con sangre y moco.*

*Además de estudios sobre su importancia clínica, la infección por *Campylobacter jejuni* obliga a la investigación de agentes con propiedades antimicrobianas porque esta bacteria ha demostrado una creciente tasa de resistencia a los antibióticos, la cual ha sido documentada alrededor del mundo. Existen numerosos reportes del aumento acelerado de cepas resistentes a los antibióticos de elección y de disponibilidad en el mercado actual.*

Una estrategia ante el problema de la resistencia antimicrobiana es la búsqueda de sustancias seguras y eficaces que sustituyan a las drogas que han perdido su efectividad. Los recursos naturales, especialmente las plantas, son una fuente para este propósito además de la arraigada práctica histórica de la curación con plantas medicinales en países como el nuestro.

*El Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología y el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, (LIPRO-NAT), de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, se han dedicado a la búsqueda de actividad antimicrobiana en extractos vegetales desde hace varios años, de lo cual se ha derivado una gran cantidad de datos importantes en cuanto a plantas activas, así como la puesta a punto de varios ensayos biocidas. Actualmente se tiene una batería de tamizaje antibacteriano que incluye a bacterias Gram positivo y Gram negativo, así como hongos filamentosos, levaduras y protozoarios, entre otros. Las especies de *Campylobacter* no han sido trabajadas anteriormente por sus requerimientos de cultivo que los distingue como "fastidiosos" y fue objetivo de este trabajo implementarlo como un nuevo bioensayo.*

Se pretendió también realizar la búsqueda de actividad antimicrobiana específica contra *C. jejuni* en diez plantas nativas de Guatemala, con el propósito de validar el papel de algunas plantas empleadas en la medicina popular para el tratamiento de diarreas, enteritis e infecciones gastrointestinales en general. La selección de las plantas a estudiar siguió dos criterios: plantas nativas utilizadas por la medicina popular tradicional para el tratamiento de diarreas y plantas con actividad antibacteriana contra agentes microbianos entéricos demostrada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron obtenidos los extractos hidroalcohólicos de las diez plantas nativas seleccionadas: *Tagetes lucida* (hoja), *Psidium guajava* (hoja y corteza), *Neurolaena lobata* (hoja), *Solanum americanum* (hoja), *Byrsonima crassifolia* (corteza), *Cornutia pyramidata* (hoja), *Ryzophora mangle* (corteza), *Smilax domingensis* (hoja, fruto, tallo y raíz), *Quercus crispifolia* (tallo y hoja) y *Piper aeroginosibacum* (hoja), mediante el método de percolación y concentración por rotavapor.

Se realizaron los bioensayos mediante los métodos de dilución en agar (Mitscher 1987) y de difusión en disco adaptado de Bauer-Kirby (Fernández 2002), utilizando una cepa estándar de *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291). El medio de cultivo usado para el método de dilución fue el de Columbia (Oxoid™) suplementado con factores X y V combinado con el extracto vegetal a una concentración de 0.5 mg/ml. El medio para el método de difusión fue agar Columbia suplementado con sangre de carnero (7.5%). Los cultivos se realizaron a una temperatura de 36°C durante 48 horas en jarra Gas-pak en medio microaerofílico ((5% O₂, 10% CO₂ y 85% de N₂) provocado por el sistema Campy-pak™. El antibiótico utilizado como control positivo en el bioensayo fue Ácido Nalidíxico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*El trabajo consistió en tres fases. La primera tuvo por objeto la adaptación de *Campylobacter jejuni* a las condiciones del laboratorio de bioensayos para lo que fue necesario un entrenamiento previo sobre las técnicas microbiológicas y los procedimientos de operación estándar en el manejo de esta bacteria, lo cual incluyó las técnicas de aislamiento a partir de especímenes clínicos, técnicas de incubación e identificación, así como las técnicas de almacenamiento y criopreservación de las cepas (Figura 1).*

*La segunda fase consistió en implementar el ensayo para evaluar la actividad contra *Campylobacter* en los extractos vegetales obtenidos previamente. La metodología de rutina para la evaluación de actividad antibacteriana en el laboratorio, está basada en el método de dilución en agar, descrita por Mitscher (Figura 2). No se obtuvieron resultados reproducibles. Se procedió a lo implementación del método basado en la difusión en agar, por medio de discos impregnados, como una adaptación del método de Bauer-Kirby. Para esto se usaron placas de agar Columbia enriquecido con sangre de carnero al 7.5%, inoculadas con una suspensión de bacterias equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml (estándar de McFarland 0.5) e incubadas a 36°C por 48 horas en contacto con discos de papel filtro impregnados previamente con las concentraciones deseadas de los extractos vegetales (0.5 y 1.0 mg/ml). Cada placa incluyó un disco de ácido nalidíxico (30 mcg) como control positivo. Con esta técnica se obtuvieron mejores resultados, siendo el crecimiento de *Campylobacter jejuni* homogéneo, así como los halos de inhibición fueron fáciles de interpretar, por lo que se determinó que este bioensayo es de mejor aplicación para esta bacteria (Figura 3).*

*La tercera fase consistió en evaluar la actividad de las diez plantas seleccionadas en ensayos por triplicado, utilizando los quince extractos etanólicos. No se encontró actividad contra *C. jejuni* en ningún extracto a concentraciones de 1.0 y 0.5 mg/ml.*

El propósito principal de adaptar el método de dilución de Mitscher fue utilizar un medio de cultivo traslúcido e incoloro, evitando el uso de sangre, ya que muchas plantas poseen alto contenido de saponinas y otras sustancias que causan hemólisis, lo que podría interferir con la interpretación de los resultados. Sin embargo, el medio sin sangre no fue el mejor para el crecimiento de la bacteria, por lo que se optó por probar el método de difusión en agar, utilizando discos impregnados con los extractos vegetales. En este caso, los resultados de este ensayo fueron mejores, obteniéndose un crecimiento adecuado y una fácil la lectura de los halos de inhibición del mismo.

*En la búsqueda de actividad antimicrobiana contra *C. jejuni*, tanto en plantas usadas popularmente para combatir diarrea y disentería como en aquellas que han mostrado una actividad interesante contra otros patógenos entéricos, no fue posible obtener buenos resultados. Todos los extractos fueron inactivos contra la bacteria, tanto a concentraciones de 0.5 mg/ml como de 1.0 mg/ml. La razón de haber usado estas dos concentraciones es que cuando se busca validar un uso popular de una planta, la cual es extraída por infusiones o decocciones y aún por tinturas, la actividad es aceptable a una concentración de 1.0 mg/ml. Para la búsqueda de actividad interesante de una planta para su subsecuente estudio químico, la concentración máxima de actividad debe ser de 0.5 mg/ml.*

*Por lo tanto, las plantas seleccionadas no pueden ser recomendadas para el tratamiento de enteritis o diarreas cuyo agente causal demostrado sea *C. jejuni*.*

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- a) *Fue posible adaptar el crecimiento de *C. jejuni* a las condiciones del laboratorio de bioensayos.*
- b) *El método de dilución para establecer la actividad antimicrobiana contra *C. jejuni* no fue reproducible.*

- c) *El método de difusión en agar sangre con discos impregnados es un método adecuado para el tamizaje de actividad biocida contra C. jejuni.*
- d) *Las cinco plantas usadas popularmente para el tratamiento de afecciones gastrointestinales estudiadas en el presente trabajo: T. lucida, P. guajava, N. lobata, S. americanum y B. crassifolia, no tienen actividad contra el microorganismo, por lo que no pueden ser recomendadas para el tratamiento de campilobacteriosis.*
- e) *Las cinco plantas elegidas por su actividad antimicrobiana contra otros patógenos entéricos: R. mangle, C. pyramidata, Q. crispifolia, P. aeruginosibacum y S. domingensis, no tienen actividad contra C. jejuni.*
- f) *Se recomienda realizar más pruebas para la adaptación del método de dilución para evaluar la actividad biocida de plantas contra C. jejuni, continuar con la búsqueda de actividad anti-Campylobacter en plantas usadas popularmente como antidiarreicos y en plantas nativas de la región. También se recomienda utilizar como blanco de la actividad biocida tanto la cepa estándar ATCC 33291 como los ribotipos que circulan en el país (R1 a R8).*

AGRADECIMIENTOS

A Teresa Véliz T.L., del Laboratorio de Microbiología de INCAP.

A los revisores del manuscrito: Patricia Saravia, Q.B. PhD. y Vicente Martínez Ing. agr. MSc.

Al Dept. de Citohistología de la Escuela de Química Biológica, Facultad de CCQQ y Farmacia de USAC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cruz, JR. et al. 1991. *Infection, diarrhea, and dysentery caused by Shigella species and Campylobacter jejuni among Guatemalan rural children. Pediatr Infect Dis J; 13:216-23.*
- Fernández, H.; Farace, MI. 2002. *Manual de Procedimientos: Diagnóstico de Campylobacter en muestras clínicas y de alimentos. Global Salm-Surv, WHO, CDC, CSR, Universidad Austral de Chile.*
- Mitscher, LA; Darker, S; Gollapudi, A. 1987. *A modern look at folkloric use of anti-infective agents. J. Nat. Prod. 5:1025-1041.*
- Nachamkin, I; Blaser, MJ. 2000. (eds.) *Campylobacter, 2 ed. Washington, ASM Press, 545p*

FIGURAS

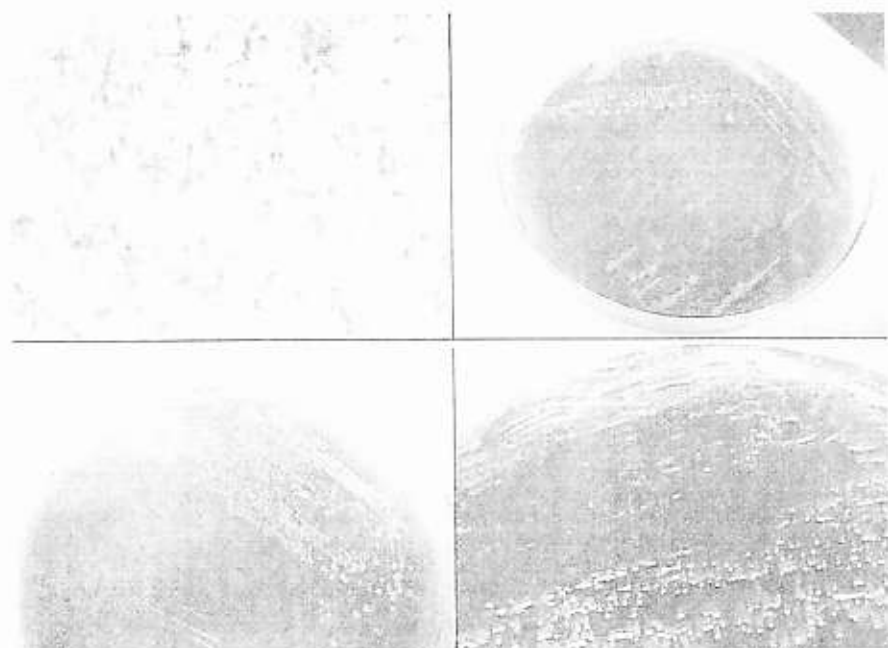


Figura 1. Gram y cultivos de *Campylobacter jejuni* en el Laboratorio de Bioensayos.
Fuente: M. Paz. (Fase experimental).

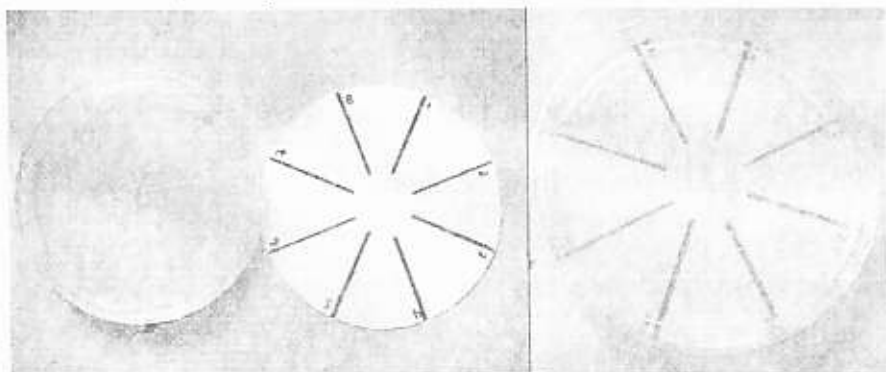


Figura 2. Plantilla de inoculación sobre agar-planta según Mitscher.
Fuente: M. Paz. (Fase experimental).

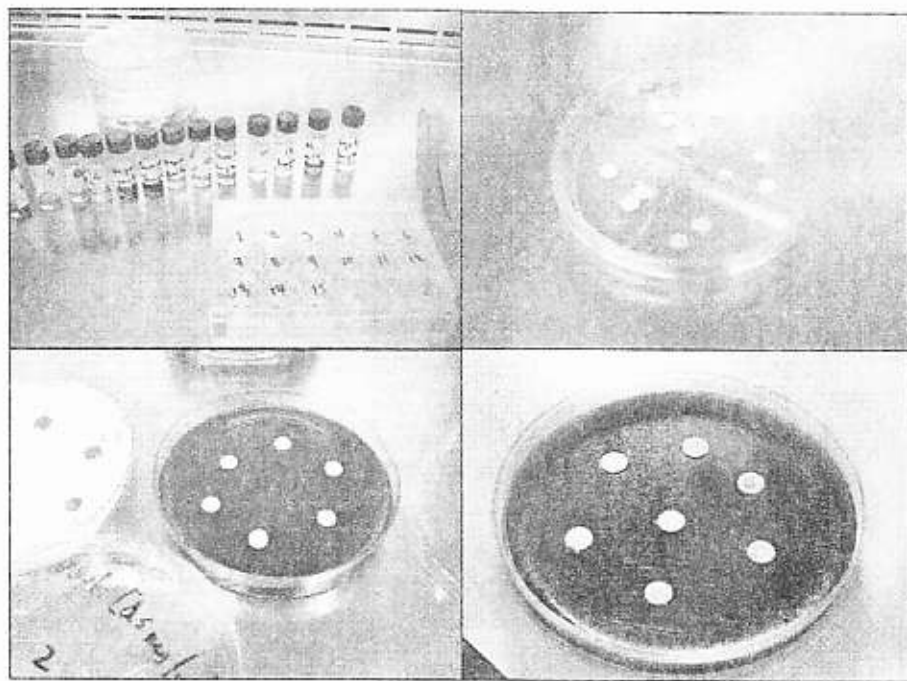


Figura 3. Método de difusión en agar con discos impregnados con extractos vegetales.

Fuente: M.Paz (Fase experimental).

CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA Y ANÁLISIS DEL CONTENIDO MINERAL DE *Smilax domingensis* Willd.

Cecilia I. Cleaves H.*
Rodolfo M. Orozco Ch.*



RESUMEN

Smilax domingensis, zarzaparrilla, es una especie nativa, tradicionalmente utilizada como medicina. Sin embargo, se reportan usos tradicionales como tónico y alimento. Esta especie ha sido confundida con otras especies del mismo género, dado a que se reporta variabilidad en la morfología de la misma. El presente estudio contribuirá a generar información básica para su aprovechamiento sostenible como potencial nutracéutico o suplemento alimenticio. La investigación se llevó a cabo en dos localidades: "Ecoparcela el Cacaotal", Samayac, Suchitepéquez y "Finca Sabana Grande", Escuintla. Se colectaron muestras botánicas, se utilizaron descriptores botánicos y se sometieron a un análisis Cluster utilizando el Coeficiente de Distancia Euclidiana. La caracterización del contenido mineral del rizoma, hojas y tallo, fue determinada por el método de espectrometría de fluorescencia total de rayos x. Se encontró que existe variabilidad morfológica de los especímenes. Sin embargo, el contenido mineral no fue variable.

* Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. MUPLAM.
Revisor: Ing. Agr. Darvín González.

Los minerales mayormente encontrados en toda la planta fueron el Calcio (Ca) y Potasio (K), seguidos por Hierro (Fe), Cobre (Cu), Zinc (Zn), Níquel (Ni), Rubidio (Rb), Estroncio (Sr), Cobalto (Co) y en menor cantidad Manganeso (Mn) y Cromo (Cr). La concentración de la mayoría de estos minerales se encuentra en niveles iguales o mayores a los recomendados en la dieta de nutrientes ideal.

ABSTRACT

Smilax domingensis, "zarzaparrilla", is a native specie, traditionally used as medicine. However, there are reports on its use as a tonic and food. This specie has been confused with other species of the same genera, and morphological variability has been reported. The study aims to contribute on the generation of basic information for the sustainable use of this specie as nutraceutic or food supplement. The investigation was done in two places, "Ecoparcela El Cacaotal", Samayac, Suchitepéquez and "Finca Sabana Grande", Escuintla. Botanical samples were collected, botanical descriptors were used and a cluster analysis was made using the Euclidian distance coefficient. The characterization of the mineral content on rhizome, leaves and stem, was determined through the spectrometric fluorescence of x ray method. It was found that there is morphological variation between the specimens. However, the mineral content was not variable. The most found minerals in all the plant were Calcium (Ca) and Potassium (K), followed by Iron (Fe), Copper (Cu), Zinc (Zn), Nickel (Ni), Rubidium (Rb), Strontium (Sr), Cobalt (Co) and low contents of Manganese (Mn) and Chromium (Cr). The concentration of most of these minerals is in the same or higher levels of the recommended dietary supplements.

Palabras clave: *Smilax domingensis*, zarzaparrilla, caracterización botánica, espectrometría de fluorescencia total de rayos x.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, los nutraceuticos (compuestos que se encuentran en materias primas y alimentos de origen vegetal que tienen efectos positivos en la salud de las personas), se han constituido como una alternativa de salud ya que proporcionan varios nutrientes esenciales para las funciones vitales de nuestro organismo (García 2001). El estudio de plantas medicinales como potenciales nutraceuticos es un campo nuevo que se puede aprovechar si se conocen los componentes minerales de algunas especies nativas.

Smilax domingensis Willd es una planta nativa medicinal, con propiedades antirreumáticas, antiinflamatorias y diuréticas (Cáceres, 1996). A pesar de que se reportan algunos usos alimenticios (Alcorn 1984), estos son escasos y de origen popular. No existen estudios que evalúen el potencial de esta especie como nutraceutico o suplemento alimenticio potencial. Por otro lado, desde el punto de vista botánico, es una especie de interés para su estudio, dado a que su identificación es difícil. Esto se debe a algunas características de la especie, como tipo de hábito, longitud del tallo, ser dioica, entre otras.

El objetivo de la presente investigación es generar información básica para el aprovechamiento sostenible de *Smilax domingensis* como potencial nutraceutico o suplemento alimenticio. Específicamente, se pretendió realizar la caracterización morfológica, determinar el contenido mineral del rizoma, tallo y hojas de *S. domingensis* a través de la técnica de fluorescencia de rayos X, y a través de la técnica de absorción atómica, analizar los minerales del suelo en donde se colectaron los especímenes evaluados, localizados en la Ecoparcela El Cacaotal, Suchitepéquez y en la Finca Sabana Grande, Escuintla. La primer localidad es una plantación mixta bajo manejo y la segunda corresponde a

áreas de manejo combinadas con áreas silvestres, en donde se colectó el material. La información que se obtenga servirá de base para posteriores investigaciones que se realicen con el fin de determinar el potencial de *S. domingensis* como nutracéutico o suplemento alimenticio y para contribuir a la identificación botánica de los especímenes de esta especie.

Asimismo, se considera que por ser un estudio exploratorio, puede servir como base para el análisis posterior de otras especies nativas de Guatemala, con potencial como suplemento alimenticio.

Materiales y métodos

Área del estudio

El estudio se llevó a cabo en los departamentos de Suchitepéquez y Escuintla. La caracterización morfológica de especímenes y análisis de suelo se realizó para dos localidades: Eco-parcela El Cacaotal, Samayac, Suchitepéquez, que corresponde a una parcela agroecológica, con manejo sistemático. La Finca Sabana Grande se encuentra en la Aldea el Rodeo, Escuintla, en donde se encuentran especies silvestres de *S. domingensis*, sin ningún tipo de manejo. El trabajo de campo se realizó durante el mes de septiembre de 2005.

Muestreo

En total, se muestrearon 20 especímenes. La determinación botánica a nivel de campo se realizó acorde a la clave de estructuras vegetativas propuesta por el CATIE (Rueda, 2003). Todos los especímenes fueron herborizados. Los especímenes con flor y/o fruto fueron depositados en el herbario de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (AGUAT) y en el herbario del Laboratorio y Droguería "FARMAYA" S.A.

Muestreo de suelo

Se obtuvo una muestra compuesta del suelo de cada localidad, con la finalidad de realizar un análisis de caracterización de pH y contenido mineral. El análisis fue llevado a cabo en el Laboratorio de suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Colecta del material vegetal

Se colectaron muestras de tallo, hojas y rizoma. Cada muestra tuvo un peso aproximado de 500 g del material fresco, que fueron utilizadas para el análisis de contenido mineral. Conjuntamente, se obtuvieron muestras para herbario que sirvieron para su confirmación botánica.

Caracterización botánica

Con base en los descriptores desarrollados por López (2004) y Ramos (2004) se realizaron varias medidas de las siguientes variables de respuesta para realizar el proceso de caracterización: Tallo: longitud (m), diámetro (mm), longitud de entrenudos (cm), número de ramas terminales, color, según la escala de Munsell para tejidos vegetales. Hoja: longitud (cm), ancho (cm), forma, longitud de peciolo (mm), tipo de ápice, base. Rizoma: forma, longitud (cm), ancho (cm), porcentaje de humedad.

Análisis de la información de campo

Se realizaron todas las mediciones y determinación de datos cualitativos. Se decidió eliminar las variables correspondientes a las características morfológicas de los órganos reproductivos, dado a que se encontraban presentes en menos del 50% de los especímenes colectados. Se realizaron los siguientes

cálculos: media, desviación estándar, rango, coeficiente de variación. Se realizó un análisis Cluster a las variables cuantitativas por medio del programa NT-SYS, utilizando el coeficiente de distancia euclidiana.

Digestión ácida de material vegetal (rizoma, hoja y tallo)

- a) *Se redujo el tamaño de la muestra vegetal seca y se pesaron 0.2000 g en un vaso de precipitar de 25 ml.*
- b) *Se agregó cuidadosamente 3 ml de una mezcla de ácido nítrico y ácido perclórico concentrados en relación 2:1 respectivamente.*
- c) *Se tapó con vidrio de reloj, y se calentó lentamente en estufa hasta digestión completa de la muestra (tiempo aproximado 10 minutos).*
- d) *Se quitó el vidrio de reloj, se adicionaron cuidadosamente 3ml de agua desmineralizada y se evaporaron cuidadosamente los vapores ácidos, utilizando campana de extracción.*
- e) *Se mantuvo el volumen constante del vaso de precipitar (aprox. 5 ml) adicionando agua desmineralizada durante el tiempo de eliminación de los vapores ácidos (tiempo aproximado 2 horas).*
- f) *Se dejó enfriar el vaso de precipitar que contiene la muestra digerida y se trasvasó cuantitativamente a un balón volumétrico de 25 ml.*
- g) *Se adicionaron 125 μ l de solución estándar interno de itrio 1000 ppm. aforar con agua desmineralizada.*
- h) *Se aplicaron 10 μ l de la solución anterior en el reflector, y se secaron con lámpara IR.*

- i) Se leyó el contenido mineral de la muestra en el espectrómetro de fluorescencia de rayos X durante 100 seg. 30 kv y 0.20 MA.
- j) Se hizo una lectura previa con la curva de calibración con una solución estándar que contuviera los elementos de interés en una concentración de 5 ppm cada uno y además que contenga 5 ppm del estándar interno itrio (*Discussion group of x ray analysis 1994, Zepeda 1998*).

Cuantificación del contenido mineral de rizoma, tallo y hojas de *S. domingensis*

- a) Se encendió el generador de rayos X y se fijaron las condiciones de operación en 30 Kv, 20 mA (Mo/40/20) 100 seg y 10 μ l. Y se verificó que el sistema estuviera alineado.
- b) Se colocaron 10 μ l de cada muestra en el centro del reflector de cuarzo y se determinaron las áreas y concentraciones de los espectros obtenidos.
- c) Se cuantificaron las concentraciones ppm de los elementos de interés en el rizoma, tallo y hojas de *S. domingensis*, por medio del programa para computadora SAX.

Para los cálculos se utilizó la siguiente fórmula:

$$m_i = (I_i * m_s) / (I_s * K_i / \rho)$$

en donde:

m_i = masa del elemento i en la muestra en solución

m_s = masa del estándar interno en la solución

I_i = intensidad del elemento i

I_s = intensidad del estándar interno

K_1 / ϵ = constante de sensibilidad del estándar interno respecto al elemento de interés:

$$Y: C_1 = m_1 / m_d$$

m_d = masa de la muestra pesada y digerida, de harina, en base húmeda.

(Discussion group of x ray analysis 1994, Zepeda 1998).

Resultados y discusión de resultados

Respecto a la caracterización botánica, se encontró que la mayor variabilidad morfológica la presentan los datos de ancho, largo y porcentaje de humedad del rizoma. Las características de las hojas fueron las que presentaron la menor variabilidad, por lo que estas variables no son tan útiles para poder diferenciar especímenes entre sí.

En base a información, a continuación se presenta una descripción de los especímenes evaluados: Plantas trepadoras de hasta 38 metros de altura. Tallos de color 5GY 5/4 y 5GY 5/6, según escala de Munsell para tejidos vegetales; algunas veces presentan manchas de color más oscuro, de forma irregular, diseminadas. Entre nudos de 0.05-6.60 cm de longitud y 0.05-36.00 mm de diámetro. De 0 a 103 espinas por entrenudo, estando mayormente concentradas en los primeros entrenudos desde el rizoma y estando mayormente ausentes en los entrenudos de las ramas terminales. Hojas ovadas, lanceoladas u oblongolanceolada, de color 5GY 7/4 y 5GY 3/6, según escala de Munsell para tejidos vegetales. Las de la base de la rama, oblongas, brevicuspidadas y de base obtusa. Las de las ramas mayormente lanceoladas u oblongolanceoladas, de ápice acuminado o brevicuspidado y base obtusa, redondeada o mayormente aguda. Longitud de la hoja de 3.0-13.8 cm, ancho de

0.2-11.0 cm. Pecíolo de 0.3-6.6 mm de largo. Rizoma mayormente de forma indefinida, algunas veces alargado; de 28-160 cm de largo y 13-140 cm de ancho, con una profundidad de 12-40 cm.

El análisis cluster se trabajó con las variables cuantitativas. La figura 1 muestra los resultados obtenidos.

El análisis del cluster muestra que sí existen diferencias en cuanto a las características morfológicas de los especímenes analizados. En total, se obtuvieron siete grupos. Es de notar que el grupo 1 está constituido únicamente por individuos provenientes de la Finca el Cacaotal y el grupo 3 está constituido mayormente por especímenes provenientes de Sabana Grande. Las diferencias encontradas pueden deberse a factores ambientales, al origen de los especímenes, a la edad de la planta o al tipo de manejo agroeológico que reciben.

Respecto al contenido mineral de los especímenes evaluados, se encontró que individualmente existen diferencias en cuanto a minerales presentes y concentraciones de los mismos. Los cuadros 1, 2 y 3 muestran el contenido mineral encontrado en rizoma, hojas y tallo de *S. domingensis*.

En el Cuadro 1 se puede observar que los elementos Mn, Co y Sr están presentes en bajas concentraciones y solamente se presentan en algunos rizomas. El Fe y Cu están presentes en concentraciones altas y los elementos mayoritarios son el K y Ca, siendo éste el más abundante.

En el Cuadro 2 se puede observar que los elementos Cr y Co se presentan en concentraciones bajas y en pocas hojas. El Fe, Cu, Zn, Rb y Sr se encuentran en concentraciones altas y los elementos mayoritarios son el K y Ca siendo éste el más abundante.

En el Cuadro 3 se puede observar que los elementos Cr, Mn y Sr se presentan en concentraciones muy bajas y solamente están presentes en pocos tallos. El Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Rb están presentes en concentraciones bajas siendo los elementos mayoritarios el K y Ca.

El Cuadro 4 presenta el resumen del contenido mineral de los tres órganos evaluados, en donde se puede observar que no existen grandes diferencias en los promedios del contenido mineral de los especímenes de ambas localidades. Sin embargo, se puede observar que el Cr no está presente en el rizoma, pero se encuentran las mayores concentraciones de los siguientes elementos: Co y Sr. Los elementos Cr, Fe, Ni y Cu se encuentran en mayores concentraciones en el tallo y hojas. Los restantes elementos se encuentran presentes a concentraciones parecidas tanto en el rizoma, como en el follaje.

En resumen, se determinó que el K y el Ca son los elementos mayoritarios. Sin embargo, en la Ecoparcela El Cacaotal se observaron mayores concentraciones de Ca, lo que se considera se debe en parte al pH reportado (5.5) en el suelo para esta localidad, ya que éste aumenta la solubilidad de las sales de calcio. El alto contenido de K encontrado se debe a que es un catión altamente soluble, por lo tanto, de fácil absorción por el rizoma, en especial cuando el suelo es húmedo y su concentración puede variar dependiendo de la edad de la planta, ya que así serán sus requerimientos nutricionales. En el rizoma que absorbe y el tallo que transporta los minerales en la planta reportaron valores muy parecidos de estos minerales. Las concentraciones más altas de Fe y Cu se observaron en las hojas y el rizoma, esto puede variar dependiendo de la madurez de la planta, condiciones climáticas y cambios estacionales.

Los elementos de Cr y Co no están presentes en la mayoría de las plantas analizadas, solamente se cuantificaron en pequeñas concentraciones en algunas hojas y tallos analizados. La concentración de Ni fue afectada al momento de realizar las lecturas, ya que el detector del equipo utilizado está hecho de una mezcla de Si y Ni, por lo cual los valores reportados deben de ser menores a los valores reales en la planta.

Respecto a la posibilidad de utilizar el rizoma de *S. domingensis* como nutracéutico, se compararon los valores de contenido mineral recomendados para la dieta (RDAs) en los siguientes elementos: K, Ca, Cr, Fe, Cu y Zn. Se encontró que, con base en las tablas de valores de requerimientos nutricionales de minerales según Fennema (1996), estos minerales se encuentran dentro o por encima de los RDAs en los tres órganos de la planta para los siguientes elementos: K, Ca, Cu y Zn.

En el caso del Cr y Fe, los valores estuvieron dentro de los rangos recomendados únicamente en los casos de tallo y hoja. Sin embargo, es importante recalcar que estos datos son los que se reportan para la planta cruda y que pueden haber variaciones de acuerdo a la forma de ingesta y a la biodisponibilidad de estos elementos en el cuerpo humano. Por ello, es necesario realizar estudios que puedan determinar con esta información básica, su potencial como nutracéutico, a lo cual, habrá que evaluar otros factores como toxicidad.

Un dato interesante es que se reporta el uso tradicional de *S. domingensis* para el tratamiento de anemia y como tónico. Este uso popular podría estar respaldado por las altas concentraciones encontradas de elementos como Fe, Ca y K. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, deben realizarse estudios de biodisponibilidad para determinar su eficacia.

Conclusiones y recomendaciones

- a. *Existen diferencias respecto a las características morfológicas de los especímenes de S. domingensis. Estas diferencias se presentan tanto en hojas, como en tallo y rizoma.*
- b. *Los especímenes provenientes de la Ecoparcela El Cacaotal son diferentes morfológicamente a los especímenes de la Finca Sabana Grande. Estas diferencias pueden deberse a factores ambientales, origen y edad de los especímenes o al tipo de manejo que cada grupo recibe.*
- c. *Existen diferencias respecto al contenido mineral y sus concentraciones en los especímenes evaluados individualmente, no así en los datos promedio obtenidos por localidad, en donde las concentraciones (ppm) son similares.*
- d. *Por el alto contenido (ppm) de K, Ca, Cu y Zn presente en rizoma, hojas y tallo; así como de Cr y Fe presente solamente en hojas y tallo; S. domingensis es una planta potencial para ser utilizada como nutracéutico o suplemento alimenticio.*
- e. *Para próximos estudios de caracterización morfológica de la especie S. domingensis, se recomienda utilizar descriptores separados para las hojas de la base de la rama y de las hojas de la rama.*
- f. *Se recomienda realizar estudios de caracterización morfológica que incluyan factores genéticos, ontogenéticos, ambientales y diferentes fases de crecimiento y desarrollo de la especie.*
- g. *Se recomienda incluir la variable sexo dentro del estudio, dado a que la especie S. domingensis es dioica, pudiendo este fac-*

tor influir en las características morfológicas y químicas del rizoma y follaje.

- h. Se recomienda hacer estudios de biodisponibilidad de K, Ca, Fe, Cr, Cu y Zn en *S. domingensis* para evaluar su uso potencial como nutracéutico. Asimismo, se recomienda realizar más estudios sobre la toxicidad del rizoma y estudios sobre la toxicidad de hojas y tallo, para evaluar la seguridad en el uso de la especie como alimento.
- i. Se recomienda hacer estudios de contenido mineral de rizoma y follaje de *S. domingensis*, utilizando una curva de calibración con mayor número de minerales, para poder evaluar la presencia de otros micronutrientes importantes en la nutrición humana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rueda, R. et al. 2003. El género *Smilax* en Guatemala, Nicaragua y Costa Rica: una guía para la identificación en el campo. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza -CATIE-. Costa Rica. sp.
2. Cáceres, A. 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 402 p.
3. Alcorn, J. 1984. Huastec Mayan Ethnobotany. University of Texas Press. Austin, US. 982 p.
4. García, M. 2001. Fitoquímicos: nutrientes del futuro. Solgar. España. 20 p.
5. López, A. 2004. Caracterización morfológica y fenológica de una plantación de zarzaparrilla (*Smilax domingensis* Willd) en el municipio de Samayac, Suchitepéquez. Tesis Lic. Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. 44 p.

6. Ramos, J. 2004. Caracterización morfológica, fenológica y dinámica de regeneración natural de una población de zarzaparrilla (*Smilax dominicensis* Willd) en la aldea Pueblo Viejo, Santa Rosa de Lima, Santa Rosa. Tesis Lic. Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. 64 pp.
7. 5th Workshop Advances in X Ray Fluorescence Spectroscopia Methods. (1994, Japan). 1994. Eds. Discussion Group of Xray Analysis. Japan. v. 126, 69 – 72 p.
8. Zepeda, E. 1988. Determinación simultánea de elementos en aguas por Fluorescencia de Rayos x. Tesis Lic. Química. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. 58 pp.
9. Fennema, O. 1996. Food chemistry. 3 ed. Marcel Dekker, Inc. New York, US. 1067 p.

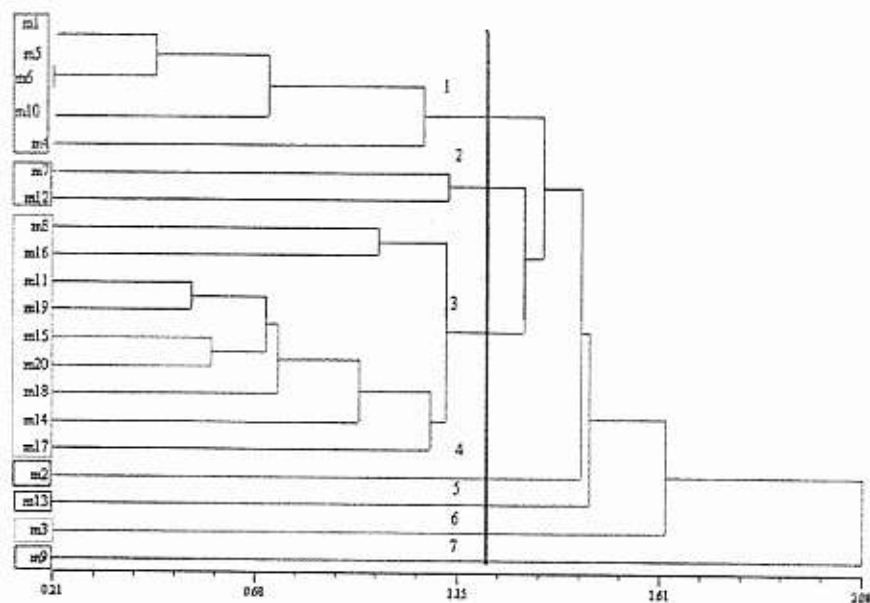


Figura 1. Cluster de información cuantitativa de especímenes de *S. dominicensis*

Cuadro 1. Contenido mineral (ppm) en rizoma de especímenes de *S. domingensis*

Muestra	K	Ca	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Rb	Sr
Rizoma 1	5921	3650	0	48	0	36	61	0	89	0
Rizoma 2	2904	2450	0	91	0	175	55	0	8	0
Rizoma 3	3405	5330	0	91	202	0	0	0	176	0
Rizoma 4	3846	4223	0	167	188	92	0	45	159	0
Rizoma 5	4604	9832	0	48	11	37	70	0	0	0
Rizoma 6	4279	9113	0	118	0	71	102	0	0	0
Rizoma 7	3930	3899	37	331	73	82	114	68	194	0
Rizoma 8	14107	29702	11	112	18	0	0	74	265	0
Rizoma 9	11395	12863	42	394	0	100	149	35	0	0
Rizoma10	3985	8562	15	177	0	0	70	27	53	0
Rizoma11	3278	6882	0	91	0	95	110	56	82	75
Rizoma12	3749	3478	9	143	0	97	0	85	0	0
Rizoma13	3579	3268	0	76	0	39	76	14	0	0
Rizoma14	4219	9388	35	224	0	154	0	0	0	0
Rizoma15	2409	2317	0	183	0	94	108	62	52	0
Rizoma16	1809	1561	0	141	28	0	0	0	0	221
Rizoma17	7834	25656	25	152	0	47	115	0	0	107
Rizoma18	21618	39772	0	165	0	82	137	137	0	332
Rizoma19	72	204	0	362	0	349	461	108	511	0
Rizoma20	3978	3190	0	64	0	55	81	42	0	0
D. estándar	4939	10464	14	100	60	80	102	41	130	89
Min	72	204	0	48	0	0	0	0	0	0
Max	21618	39772	42	394	202	349	461	137	511	332

Cuadro 2. Contenido mineral (ppm) en hojas de especímenes de *S. domingensis*

Muestra	K	Ca	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Rb	Sr
Hoja1	11656	18761	0	28	152	24	69	0	311	0	0
Hoja2	1062	5518	35	12	56	7	18	43	0	105	51
Hoja3	3805	5169	33	11	52	6	16	40	0	99	67
Hoja4	43223	71336	0	103	479	0	0	542	112	0	120
Hoja5	9280	23208	0	65	628	0	66	0	0	0	149
Hoja6	7621	12917	0	0	617	0	446	170	232	73	94
Hoja7	6349	8877	10	23	166	0	46	101	0	0	0
Hoja8	8602	13594	5	21	253	0	31	0	36	0	126
Hoja9	8402	14478	0	82	139	0	49	89	41	45	108
Hoja10	14205	32456	0	0	170	0	49	117	29	227	0
Hoja11	18792	32177	0	129	185	17	77	111	0	171	349
Hoja12	9746	22338	0	25	153	0	85	105	0	107	0
Hoja13	11238	22453	0	13	177	0	34	60	35	0	126
Hoja14	14816	25390	0	17	207	0	56	81	37	67	172
Hoja15	6884	9858	0	13	56	0	35	63	0	158	0
Hoja16	14837	26000	0	0	136	0	43	86	0	0	0
Hoja17	8319	27243	0	27	161	13	49	119	0	106	114
Hoja18	29487	42332	0	25	176	0	87	129	101	0	0
Hoja19	10770	20082	0	15	110	9	25	46	31	0	148
Hoja20	14589	26759	0	18	84	0	39	82	29	19	0
Destánda	9178	14896	11	35	168	7	92	114	83	70	117
Min	3805	5169	0	0	52	0	0	0	0	0	0
Max	43223	71336	35	129	628	17	446	542	232	227	120

Cuadro 3. Contenido mineral (ppm) en tallo de especímenes de *S. domingensis*

Muestra	K	Ca	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Rb	Sr
Tallo1	4237	9363	0	0	25	2	33	62	62	0	0
Tallo2	5296	11079	4	0	54	0	0	55	0	0	28
Tallo3	5411	11892	0	12	74	26	79	98	439	0	0
Tallo4	5067	10729	8	0	43	0	37	57	52	0	0
Tallo5	5474	11448	0	0	58	16	54	74	20	88	0
Tallo6	3906	8534	0	0	27	0	4	34	62	22	59
Tallo7	6732	13908	0	0	131	0	25	38	22	105	10
Tallo8	3246	6852	0	0	31	23	40	15	75	24	0
Tallo9	10349	20893	0	17	72	63	81	0	0	0	0
Tallo10	404	844	0	0	3	3	3	7	0	4	0
Tallo11	4448	9529	13	9	55	11	24	24	40	72	33
Tallo12	2541	5566	0	0	13	0	21	32	8	55	0
Tallo13	5676	12608	0	11	70	0	59	93	33	0	0
Tallo14	15119	33202	6	21	136	0	90	145	0	155	0
Tallo15	3753	8258	0	0	43	9	34	53	0	87	0
Tallo16	3370	7525	8	0	159	0	49	44	0	40	0
Tallo17	4876	10143	2	0	47	0	59	63	46	0	0
Tallo18	3444	8031	0	5	21	0	39	96	75	0	0
Tallo19	6757	13932	0	0	43	0	51	62	52	0	0
Tallo20	2603	5551	0	0	18	0	19	37	14	47	0
D estándar	3099	6614	4	7	42	15	26	35	95	45	16
Min	404	844	0	0	3	0	0	0	0	0	0
Max	15119	33202	13	21	159	63	90	145	439	155	59

Cuadro 4. Resumen del contenido mineral de tallo, hoja y rizoma de *S. domingensis* (en ppm)

Elemento	K	Ca	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Rb	Sr
TALLO											
<i>Cacaotal</i>	3788.0	8219.0	1.8	1.4	50.0	2.8	38.0	55.0	32.0	30.1	1.2
<i>Sabana Grande</i>	3793.0	8215.0	2.1	1.6	51.0	2.0	39.0	55.0	37.0	23.0	1.4
HOJA											
<i>Cacaotal</i>	3845.0	8301.0	1.3	1.8	37.0	2.2	37.0	57.0	41.0	20.9	1.5
<i>Sabana Grande</i>	3717.0	8071.0	1.2	2.0	36.0	2.5	35.0	56.0	40.0	23.5	1.7
RIZOMA											
<i>Cacaotal</i>	3751.0	8075.0	0	1.4	1.6	38.0	2.8	34.0	51.0	36.2	26.0
<i>Sabana Grande</i>	3375.0	7343.0	0	1.4	1.8	33.0	7.6	28.0	48.0	36.1	31.0

ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *IN VITRO* DE HIERBA LUISA, *ALOYSIA TRIPHYLLA* (L'HERRIT) BRITT

María A. Ordóñez M.*

Carolina Rosales**

Domingo Amador***

RESUMEN

Con el fin de lograr el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Aloysia triphylla*, se evaluaron diferentes métodos de desinfección superficial para los explantes, combinando etanol al 70% con hipoclorito de sodio en concentraciones de 1 al 2% y tiempos de inmersión de 5 a 15 minutos. Se utilizaron como explantes segmentos uninodales y trozos de lámina foliar, provenientes de plantas cultivadas en el campo.

Los explantes se sembraron en el medio Murashige y Skoog (1962) diluido a la mitad, suplementado con sacarosa al 3%, phytigel 2 g/l, ácido cítrico a 100 mg/l, bencilaminopurina (0.10 mg/l) y ácido naftalenacético (0.05 mg/l). Los explantes fueron incubados a una

* Trabajo de Tesis de Maestría en Uso y Producción de Plantas Medicinales, Universidad de San Carlos de Guatemala.

** Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

*** Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala.

temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y 16 h de fotoperíodo a una intensidad lumínica de 1000 lux.

El hipoclorito de sodio (NaOCl) no logró controlar los microorganismos contaminantes en los explantes nodales, obteniendo porcentajes muy elevados de contaminación (de 89 a 100%). Sin embargo, en los explantes foliares si se logró reducir la contaminación, obteniendo el menor porcentaje de contaminación (44%) al utilizar NaOCl al 2% por 5 minutos.

El mejor tipo de explante para establecer el cultivo *in vitro* de *A. triphylla* fueron los trozos de lámina foliar, no sólo por la obtención de explantes asépticos, sino también por la viabilidad de los mismos, ya que todos los explantes asépticos indujeron la formación de callo abundante. De tal forma que el mejor método de desinfección para los segmentos foliares fue al utilizar NaOCl al 1.5% por 15 minutos.

Los resultados del presente trabajo demuestran la posibilidad de iniciar el cultivo *in vitro* de *A. triphylla* a partir de segmentos foliares, como explantes, como primer paso para su micropropagación.

Palabras claves: *Aloysia triphylla*, establecimiento *in vitro*, segmento nodal, trozos de lámina foliar, viabilidad.

In Vitro culture establishment of Hierba Luisa, *Aloysia triphylla* (L'Herrit) Britt

María A. Ordóñez M. MA¹. – Carolina Rosales MSc². – Domingo Amador MSc³.

ABSTRACT

To improve in vitro establishment of Aloysia triphylla, different methods of superficial disinfection were evaluated, combining 70% ethanol with sodium hypochlorite at concentrations from 1 to 2% and immersion times from 5 to 10 min. Nodal and foliar segments were used as explants, which came from adult field grown plants.

Explants were seeded in Murashige and Skoog (1962) media diluted to half and supplemented with 3% saccharose, 2 g/l phytigel, 100 mg/l citric acid, 0.10 mg/l Bendilaminopurine and 0.05 mg/l naftalenic acid. Explants were incubated at a temperature of $24 \pm 2^\circ\text{C}$ and a 16 hours photoperiod to a luminance intensity of 1000 lux.

Sodium Hypochlorite (NaOCl) did not manage to control contaminating microorganisms in the nodal explants, obtaining a very elevated percentage of contamination (from 89 to 100%). Nevertheless, in foliar explants it managed to reduce contamination, obtaining the lowest contamination percentage (44%) by using 2% NaOCl for 5 minutes. The best kind of A. triphylla explant to establish in vitro were the pieces of foliar lamina, not only by the obtaining of aseptic explants, but also by their viability, since all the aseptic explants induced the formation of abundant callus. Then, the best method of disinfection for the foliar segments was using 1.5% NaOCl for 15 min. The results of the present work demonstrate the possibility of initiating the in vitro culture of A. triphylla from foliar segments, as explants, as the first step for its propagation.

Key words: *Aloysia triphylla, in vitro establishment, nodal segment, foliar lamina segments, viability.*

INTRODUCCIÓN

La *Aloysia triphylla*, conocida comúnmente como Hierba Luisa, es una planta nativa de Sur América, originaria de la región montañosa de Argentina, Chile y Perú. En Guatemala se ha adaptado al clima templado del Altiplano Central, encontrándose cultivada principalmente en huertos familiares (Cáceres, 1996).

Esta especie es de importancia terapéutica, por su acción carminativa, digestiva, espasmolítica, estimulante, estomáquica, expectorante, febrífuga, pectoral, sedante, sudorífica y emenagoga. Asimismo, se utiliza en la industria alimenticia, cosmética y de perfumería, principalmente por su agradable aroma, conocido como Lemon Verbena y bastante codiciado en el ámbito de los aceites esenciales (Cáceres, 1996; Dellacassa, 2003).

El método para su propagación más eficiente es a través de esquejes, pues su multiplicación por semillas es casi nula. En su lugar de origen se logran buenos resultados propagándola por medio de división de matas, acodos, o estacas (Herbotecnia, 2005). Sin embargo, en nuestro país se han realizado algunos ensayos preliminares para lograr su multiplicación, pero el porcentaje de pegue por estacas es bastante bajo, a pesar de los esfuerzos realizados por aumentar el enraizamiento de las estacas utilizando ácido indol butírico (IBA) al 2%, (Orellana, 2005; Martínez, 2005).

El cultivo de tejidos vegetales abarca un grupo de técnicas que consisten en aislar y cultivar ciertas partes de la planta (explan-te) como células, tejidos y órganos y proporcionarles condiciones físicas y químicas artificiales para que expresen su capacidad morfogénica, es así que el cultivo in vitro, es una herramienta biotecnológica que se basa en el principio de la totipotencialidad

celular para obtener grandes cantidades de individuos en un tiempo menor que el que se requeriría naturalmente (Rosell et al. 1990).

Conociendo los inconvenientes de su propagación convencional en Guatemala, el presente trabajo plantea la opción de emplear la técnica del cultivo de tejidos vegetales, como una alternativa viable para iniciar la propagación de la Hierba Luisa. Sin embargo, hay que reconocer que previo a la micropropagación de una especie, es necesario como primera etapa, establecer su cultivo, considerando ciertos aspectos, como el tipo de explante, el método de desinfección, medio de cultivo y las condiciones ambientales de incubación.

Para lograr el establecimiento in vitro de Hierba Luisa se evaluaron dos tipos de explantes a partir de plantas cultivadas en el campo, segmentos uninodales y trozos de lámina foliar, así como diferentes métodos de desinfección combinando etanol al 70% e hipoclorito de sodio a varias concentraciones, para determinar qué tipo de explante inicial respondía mejor al cultivo in vitro y con cuál tratamiento se obtenía el menor porcentaje de contaminación de los explantes inoculados. Este trabajo constituye una acción preliminar que permitirá la micropropagación de Hierba Luisa en investigaciones futuras.

Materiales y Métodos

*Para desarrollar la fase de establecimiento del cultivo in vitro de *Aloysia triphylla*, el estudio se dividió en dos fases: a) el ensayo preliminar de la siembra de los explantes en un medio basal para determinar su respuesta al cultivo bajo condiciones controladas y b) la fase de iniciación de los explantes, propiamente, la etapa de establecimiento del cultivo in vitro.*

Fase I Ensayo preliminar

Las ramas jóvenes de plantas provenientes de campo se trasladaron al laboratorio para su desinfección en la cámara de flujo laminar. Inicialmente se sumergieron en alcohol al 70% por 30 segundos, luego en una disolución de cloro comercial al 30% (1.5% de ingrediente activo NaOCl) por 15 minutos, nuevamente en alcohol al 70% por 10 segundos y posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

Los dos tipos de explantes; segmentos nodales y porción de lámina foliar, se sembraron por separado en tubos de cultivo de 25x150 mm conteniendo 10 ml del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962). Incubados a 24 ± 2 °C y 16 h de fotoperíodo a una intensidad lumínica de 1000 lux para determinar el porcentaje de contaminación.

Fase II Establecimiento del cultivo in vitro de *Aloysia triphylla*

Considerando que el material vegetal para obtener los explantes provenía de plantas donantes que crecen directamente en el campo expuestas a plagas, enfermedades, polvo y otros agentes, sin ningún tipo de control ambiental (Ramírez, et al. 1997) y comprobándose notablemente la presencia de microorganismos contaminantes en el ensayo preliminar, se decidió aplicar un pretratamiento a las plantas madre con un fungicida y un bactericida sistémico durante 6 semanas previo a la realización de la fase de establecimiento in vitro con un intervalo de aplicación de tres días. Para ello se utilizó como bactericida el sulfato de estreptomycin y oxitetraciclina Agrimicyn WP 16.5% y como fungicida el methyl-1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazolecarbomato Benomyl WP 50%, en concentraciones de 0.75 g/l (0.075%) y 0.5 g/l (0.05%) respectivamente (Cruz, 2004).

Selección del tipo de explante

*Se probó iniciar el cultivo de tejidos de *A. triphylla* con la siembra de segmentos uninodales, explantes utilizados en la propagación in vitro de otras especies del género *Aloysia* y en otras especies vegetales (Ramírez, et al., 1997; Villalobos, et al. 1999; Ramírez-Villalobos, 2002; Passera, et al., 1999), ya que éstos contienen las yemas axilares, (tejido meristemático) que pueden inducir una brotación múltiple como respuesta morfogénica a la acción de reguladores de crecimiento; como también, con la siembra de trozos de lámina foliar (Luna, et al. 2005; Contreras, et al., 2005) que puede dar lugar a nuevas plantas por organogénesis directa o indirecta, si se encuentra la combinación adecuada de citocininas y auxinas.*

Colecta del material vegetal

Las ramas jóvenes Hierba Luisa provenientes de campo se introdujeron en una solución de Benomyl WP 50% + Agrimicyn 16.5% y antioxidantes (ácido cítrico 0.4% + ácido ascórbico 0.2%) para su traslado al laboratorio, donde se colocaron a una temperatura de 5 °C por 8 horas para luego proseguir con la desinfección (Cruz, 2004).

Desinfección del material vegetal

El proceso de desinfección para obtener ambos tipos de explantes consistió en sumergir el tejido vegetal en alcohol al 70% por 30 segundos, luego en la solución de hipoclorito de sodio a tres concentraciones (1, 1.5 y 2% de NaOCl) y tres tiempos de exposición (5, 10 y 15 minutos) diferentes, nuevamente en alcohol al 70% por 10 segundos, realizar tres enjuagues con agua destilada estéril y colocar el tejido en ácido cítrico a 110 mg/l para su posterior disección.

Diseción y siembra de los explantes

Los segmentos nodales, de 1.5 a 2 cm de longitud y los trozos de lámina foliar de 4 a 5 mm de tamaño, se sembraron en tubos de cultivo (150 mm x 25 mm) con 10 ml de medio nutritivo de Murashige y Skoog (1962) diluido a la mitad, suplementado con sacarosa al 3%, Phytigel 2 g/l, ácido cítrico a 100 mg/l, bencilaminopurina (0.10 mg/l) y ácido naftalenacético (0.05 mg/l). Los explantes fueron incubados a 24 ± 2 °C y 16 h de fotoperíodo a una intensidad lumínica de 1000 lux.

Tratamientos y variables de estudio

Para cada tipo de explante se evaluaron nueve tratamientos de desinfección, combinando alcohol al 70% y una solución de NaOCl en diferentes concentraciones y tiempos de exposición, ver cuadro 1.

Cuadro 1. *Tratamientos de desinfección evaluados*

Tratamiento	% NaOCl (concentración ingrediente activo)	Tiempo de inmersión (minutos)
1	1	5
2	1	10
3	1	15
4	1.5	5
5	1.5	10
6	1.5	15
7	2	5
8	2	10
9	2	15

La unidad experimental consistió en un tubo de cultivo de 25 x 150 mm, con 10 ml del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) adicionado con 0.10 mg/l de BAP y 0.05 mg/l de ANA, donde se sembró el explante. El total de unidades experimentales por tipo de explante (segmento nodal y de lámina foliar) fue de 81 unidades; producto de los nueve tratamientos y nueve repeticiones.

Las variables de estudio fueron porcentaje de explantes contaminados con hongos y bacterias luego de dos semanas de inoculación bajo condiciones ambientales controladas. Así también, se observó si los explantes se oxidaban o presentaban alguna toxicidad al método de desinfección evaluado. Debido a que el medio de cultivo estaba adicionado con reguladores del crecimiento (BAP y ANA), los explantes asépticos se mantuvieron en el medio de cultivo por 30 días para observar su respuesta morfogénica (viabilidad). Se evaluó la formación de callo con la siguiente escala de niveles de crecimiento por apreciación visual: a) Muy abundante: crecimiento en todo el tejido, b) Abundante: crecimiento en extremos de la nervadura central y en orillas del explante, c) Poca: crecimiento en extremos de nervadura central y d) Muy poca: crecimiento en extremos de la nervadura central.

Resultados y discusión

Fase I Ensayo preliminar

Los resultados obtenidos al realizar el ensayo preliminar para el establecimiento in vitro de *Aloysia triphylla* fueron entre el 95 y 100% de contaminación, para ambos tipos de explantes, demostrando la necesidad de aplicar un pretratamiento cultural a las plantas donantes; por lo que éstas fueron sometidas a un tratamiento con un fungicida y bactericida sistémico, previo a

la obtención de los explantes. Esta práctica agrotecnológica logró reducir el porcentaje de contaminación de ambos tipos de explantes, segmentos nodales y trozos de lámina foliar. Sugiriendo que el pretratamiento es esencial, como paso de rutina al iniciar el cultivo *in vitro* de la Hierba Luisa a partir de plantas de campo.

Fase II Establecimiento del cultivo ***in vitro* de *Aloysia triphylla***

Los datos de contaminación se tomaron a los 15 días después de haber realizado la siembra de los explantes. A pesar que ambos explantes provenían de plantas cultivadas en el campo, el efecto del agente de desinfección, el NaOCl, fue diferente para cada tipo de explante, reflejándose en los porcentajes de contaminación obtenidos. El hipoclorito de sodio utilizado en las concentraciones de 1, 1.5 y 2% en tiempos de inmersión de 5 a 15 minutos no logró controlar la contaminación de los segmentos nodales, ya que los porcentajes de contaminación principalmente por hongos fueron bastante elevados, (ver cuadro 2). Resultados de mayor efectividad se lograron en los explantes foliares, ya que en este caso el NaOCl resultó un buen agente de desinfección, ya que disminuyó el crecimiento de microorganismos contaminantes, obteniéndose menores porcentajes de contaminación (ver cuadro 3). Esta diferencia en cuanto al efecto del NaOCl, siendo más efectivo para los explantes foliares, pudo deberse a la morfología de los órganos de donde provienen los explantes, ya que en los segmentos de tallo, la unión del pecíolo a éste, puede favorecer que los microorganismos contaminantes no sean fácilmente removidos, permaneciendo bacterias, esporas de hongos u otros en la superficie, los que al encontrarse en un medio óptimo, proliferan.

En el caso de los segmentos nodales no se pudo establecer un método de desinfección efectivo, ya que en todos los tratamientos el porcentaje de contaminación estuvo entre el 89 y el 100%. Mientras que, para los trozos de lámina foliar el mejor método de desinfección fue el tratamiento con NaOCl al 2% por 5 minutos, con un 44% de contaminación, seguido en efectividad por los tratamientos, con NaOCl al 1% por 10 minutos y NaOCl al 1.5% por 15 minutos, ambos con un 56%, (ver cuadro 3).

Cuadro 2. Efecto de los métodos de desinfección sobre el establecimiento aséptico de segmentos nodales de *Aloysia triphylla*, 15 días después de la siembra in vitro.

Tratamiento	%NaOCl / tiempo	No. de Explantos contaminados			% Contaminación
		Por bacterias	Por hongos	Total	
1	1% / 5 min.		9	9	100
2	1% / 10 min.		8	8	89
3	1% / 15 min.		9	9	100
4	1.5% / 5 min.		9	9	100
5	1.5% / 10 min.	1	8	9	100
6	1.5% / 15 min.		8	8	89
7	2% / 5 min.		9	9	100
8	2% / 10 min.	1	7	8	89
9	2% / 15 min.	4	5	9	100

Fuente: Datos de laboratorio obtenidos en el presente estudio.

Cuadro 3. Efecto de los métodos de desinfección sobre el establecimiento aséptico de segmentos de lámina foliar de *Aloysia triphylla*, 15 días después de la siembra *in vitro*.

Tratamiento	%NaOCl / tiempo	No. de Explantes contaminados			% Contaminación
		Por bacterias	Por hongos	Total	
1	1% / 5 min.		8	8	89
2	1% / 10 min.		5	5	56
3	1% / 15 min.	1	7	8	89
4	1.5% / 5 min.		8	8	89
5	1.5% / 10 min.	1	6	7	78
6	1.5% / 15 min.	3	2	5	56
7	2% / 5 min.	2	2	4	44
8	2% / 10 min.	4	4	8	89
9	2% / 15 min.	3	4	7	78

Fuente: Datos de laboratorio obtenidos en el presente estudio.

Como se puede observar en los cuadros anteriores, la contaminación en ambos tipos de explantes fue principalmente por hongos y en menor cantidad por bacterias.

A pesar que no se logró eliminar completamente los microorganismos contaminantes con los medios de desinfección evaluados, un 4% de los explantes nodales y un 26% de los foliares permanecieron libres de contaminación. Dichos explantes no mostraron mayores síntomas de oxidación ni de toxicidad por el NaOCl; constituyéndose material vegetal posible para iniciar el cultivo *in vitro* de la *A. triphylla*.

En varios estudios realizados para el establecimiento de cultivos *in vitro* se han utilizado segmentos nodales como explantes; sin embargo, también la mayoría de éstos reportan proble-

mas de elevada contaminación al obtener los explantes de plantas de campo. El elevado porcentaje de contaminación del material vegetal, es común en varias especies, tales como en la *Psidium guajava* (80%), *Sechium edule* (85%), *Ilex paraguariensis* (75%) y *Pteris cretica* (90%) (Ramírez-Villalobos, et al., 2002).

Resultados similares a los observados en el presente estudio con los segmentos nodales de Hierba Luisa, se reportan para *Annona muricata*, donde la desinfección superficial con NaOCl no permitió el establecimiento aséptico del cultivo in vitro (Ramírez-Villalobos, et al., 2002). Por otro lado, el hipoclorito de calcio resultó más eficiente que el hipoclorito de sodio al 5.25% en el control de la contaminación de los segmentos nodales de guayaba, aunque éste afectó la viabilidad de los explantes (Ramírez, 1997). En ese mismo estudio con anona, se concluye que las condiciones de cultivo de la planta progenitora afectan el cultivo aséptico de los explantes, situación que también se evidencia en el caso de *Aloysia triphylla*, ya que en el estudio de Tarrago et al. (2001), no se reportan mayores problemas de contaminación inicial, al obtener segmentos uninodales de plantas que crecen en condiciones de invernadero. De igual forma, otro estudio reporta que la desinfección de los segmentos de tallo de *Aloysia polystachya* provenientes de plantas de invernadero, con NaOCl al 1.2 % por 15 minutos, permitió el establecimiento del cultivo in vitro (Contreras, et al., 2005), dicho método de desinfección es parecido al tratamiento con NaOCl al 1.5% por 15 minutos evaluado en el presente estudio.

Según los resultados obtenidos, el mejor explante para el establecimiento del cultivo in vitro de la Hierba Luisa, lo constitu-

yen los trozos de lámina foliar; no sólo por el mayor número de explantes asépticos, sino también por la viabilidad de éstos. Ya que para iniciar el cultivo de una especie, es necesario un método de desinfección que controle la contaminación, pero que no afecte la viabilidad de los explantes, es decir, que éstos mantengan su potencial intrínseco de responder al efecto inductor de los reguladores del crecimiento (Ramírez-Villalobos, 2002). En este sentido, el tratamiento con los mejores resultados para los explantes foliares, fue al utilizar NaOCl al 1.5% por 15 minutos, con el cual se logró un 56% de contaminación y la respuesta de todos sus explantes con la formación abundante de callo. Igual porcentaje de contaminación se logró con el tratamiento con NaOCl al 1% por 10 minutos, pero en este caso, sólo la mitad de sus explantes fueron viables, con muy poca formación de callo. A pesar que el menor porcentaje de contaminación se logró al desinfectar los explantes con NaOCl al 2% por 5 minutos (44%), la respuesta morfogenética fue escasa y según datos en anona, el NaOCl al 2% redujo la viabilidad de los explantes, posiblemente debido a un efecto tóxico (Ramírez-Villalobos, 2002).

La oxidación no fue un problema de importancia en el establecimiento del cultivo de *A. triphylla*, en ninguno se detectó exudación de compuestos fenólicos en el medio de cultivo y a pesar que algunos explantes se obscurecieron, aún así permanecieron viables. El empleo de antioxidantes, como el ácido cítrico y ácido ascórbico en la solución transportadora y el uso de ácido cítrico antes de la siembra de los explantes, con seguridad influyeron en tal condición.

La respuesta observada, tanto en los segmentos nodales como en los trozos de lámina foliar, fue la formación de callo (tejido desorganizado) de color verde y de consistencia compacta.

Sin embargo, como se observa en el cuadro 3, no todos los explantes respondieron al efecto de la auxina + citocinina. De los tres explantes nodales asépticos logrados, sólo el de tratamiento con NaOCl al 1% por 10 min, respondió con formación de callo en las tres yemas axilares (ver figura 1) y de los 21 explantes foliares obtenidos, 13 de ellos (62%) formaron callo, localizado en los extremos de la nervadura central.

Cuadro. 3. Explantes de *A. triphylla* no contaminados y su respuesta morfogénica, a los 30 días de su siembra in vitro

Tratamiento	%NaOCl/tiempo	Explantes asépticos		% Respuesta morfogénica (formación callo)
		Tipo	Cantidad	
1	1% / 5 min	Foliar	1	0
2	1% / 10 min	Foliar	4	50
		Nodal	1	100
3	1% / 15 min	Foliar	1	0
4	1.5% / 5 min	Foliar	1	100
5	1.5% / 10 min	Foliar	2	100
6	1.5% / 15 min	Foliar	4	100
		Nodal	1	0
7	2% / 5 min	Foliar	5	80
8	2% / 10 min	Foliar	1	0
		Nodal	1	0
9	2% / 15 min	Foliar	2	0

Fuente: Datos de laboratorio obtenidos en el presente estudio.

A pesar que en algunos explantes se observó la decoloración de las orillas del tejido, esto no inhibió la formación de callo en la nervadura central del trozo de lámina foliar.

Al utilizar la escala de niveles de crecimiento del callo para los explantes foliares, se encontró que en el explante tratado con NaOCl al 1.5% por 5 minutos el callo fue muy abundante, extendido en todo el tejido (ver figura 2); para los cuatro explantes del tratamiento con NaOCl al 1.5% por 15 minutos el callo fue abundante (ver figura 3); en los explantes desinfectados con NaOCl al 1.5% por 10 minutos y con NaOCl al 2% por 5 minutos la formación de callo fue poca (ver figura 4) y se obtuvo muy poco callo en los explantes tratados con NaOCl al 1% por 10 minutos.



Figura 1. Explante nodal con formación de callo en las yemas axilares, tratamiento 2. (Foto A. Ordóñez).



Figura 2. Explante foliar con formación muy abundante de callo, tratamiento 4. (Foto A. Ordóñez).



Figura 3. Explante foliar con formación abundante de callo, tratamiento 6. (Foto A. Ordóñez).



Figura 4. Explante foliar con poca formación de callo, tratamiento 7. (Foto A. Ordóñez).

En cuanto a la respuesta morfogénica de los explantes de *A. triphylla*, la formación de callo se debió a las concentraciones de bencilaminopurina, BAP, (0.1 mg/l) y ácido naftalenacético, ANA, (0.05 mg/l) empleadas. La formación de callo en el explante nodal se observó, como es común, en las yemas axilares, pues es allí donde se localiza el tejido meristemático que responde al efecto inductor de los reguladores de crecimiento (Rosell, et al. 1990; Roca et al., 1991). Sin embargo, en otro estudio al utilizar el mismo tipo de explante se logró la formación de brotes, al sembrarlos en el medio Murashige y Skoog diluido a $\frac{1}{2}$ con KNO_3/NH_4NO_3 $\frac{1}{4}$ sin reguladores de crecimiento (Tarrago, et al., 2001).

En el caso de los explantes foliares, el crecimiento de callo se observó en los extremos de la nervadura central, posiblemente por ser la hoja una extensión del tallo se encuentren células meristemáticas de origen cambial o bien, porque el tejido parenquimático se torna meristemático algunas veces (Raven, et al. 1999), de tal forma de promover la formación de callo al ser inducido por la citocinina y auxina. Estos resultados están apoyados por otro estudio en *Aloysia polystachya*, donde se obtuvieron los mejores resultados de formación de brotes a partir de trozos de lámina foliar sembrados en el medio de cultivo de Sansberro y Mroginski (1995) adicionado con ANA (0.1 mg/l) y BAP (0.1 mg/l) (Contreras, et al., 2005). También al utilizar trozos de lámina foliar de la especie *Pluchea sagittalis* se logró la formación de brotes al adicionar el medio de cultivo ANA (0.1 mg/l) y BAP (0.5 mg/l) (Luna, et al., 2005); estos resultados indican que la concentración de los reguladores del crecimiento determinan la respuesta morfogénica del explante.

Considerando los datos de contaminación y de viabilidad de los explantes de Hierba Luisa, se demuestra que es posible lograr el establecimiento del cultivo in vitro de esta especie, siendo los trozos de lámina foliar, el mejor tipo de explante para tal fin.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- *El mejor método de desinfección con el cual se logró el establecimiento del cultivo in vitro de Aloysia triphylla a partir de segmentos foliares fue al utilizar NaOCl al 1.5% por 15 minutos.*
- *Los trozos de lámina foliar constituyen el mejor explante inicial para el establecimiento del cultivo in vitro de Aloysia triphylla, ya que todos los explantes foliares asépticos indujeron la formación de callo abundante.*
- *Las condiciones de cultivo de la planta progenitora influyen en el establecimiento in vitro de los explantes, por lo que es necesario su pretratamiento con fungicida y bactericida previo a la obtención de los explantes.*
- *El hipoclorito de sodio, no logró controlar los microorganismos contaminantes de los segmentos nodales, ya que los porcentajes de contaminación fueron bastante elevados.*
- *El porcentaje de contaminación para cada tipo de explante, fue diferente, obteniéndose menor porcentaje con los segmentos de lámina foliar.*
- *Se recomienda evaluar el uso de otros agentes de desinfección o el uso de antibióticos en el medio de cultivo y/o antes de la siembra de los segmentos nodales, para controlar los microorganismos contaminantes.*
- *Se recomienda aplicar un pre-tratamiento a las plantas progenitoras, utilizando mayores concentraciones de fungicida y bactericida, como acción para reducir el porcentaje de contaminación.*

- Se recomienda continuar con los estudios, evaluando otras combinaciones de ANA y BAP para la obtención de brotes, tanto en segmentos nodales como en trozos de lámina foliar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cáceres, A. 1996. *Plantas Medicinales de Guatemala*. Editorial Universitaria. Guatemala. 402 p.
- Contreras, M; Luna, C; Tarrago, J; Sansberro, P; Mroginski, L. 2001. *Regeneración de plantas de Aloysia polysctachya por cultivo in vitro de lámina foliar y segmentos de entrenudos*. (en línea) Consultado octubre 2005. Disponible en www.unne.edu.ar/Web/cvt/cvt/2001/5-Agrarias/A-031.pdf
- Cruz, M. 2004. *Efecto de la 6-bencilaminopurina en la proliferación de brotes in vitro de tres variedades de caña de azúcar (Saccharum officinarum L.)* Tesis de Ingeniero Agrónomo Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Agronomía. 68 p. 46.
- Dellacassa, E. et al. 2003. Hierbaluisa, *Aloysia citriodora* Palau. *Revista de Fitoterapia*, 3 (1): 19-25.
- Herbotecnia. 2005. *Tecnología en producción de plantas medicinales, aromáticas y tintóreas. Descripción de Cedrón* (en línea). Consultado en abril 2005. Disponible en <http://www.herbotecnia.com.ar/aut-cedron.html>.
- Luna C; Sansberro P; Flachslan E; Mroginski L. 2005. *Regeneración de plantas de Pluchea sagittalis (Lamb.) Cabr. por cultivo in vitro de lámina foliar* (en línea). Consultado octubre 2005. Disponible en <http://agr.unne.edu.ar/extension/res2004/biotecnologia/biotec-indice04.htm>

- Martínez, V. 2005. Ensayos del cultivo de *Aloysia triphylla*. Centro Experimental y Docencia (CEDA) de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. (Entrevista). Guatemala
- Orellana, A. 2005. Propagación por estacas de *A. triphylla*. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola ICTA Chimaltenango. (Entrevista). Guatemala.
- Passera, C.B. y Ambrosetti, J.A. 1999. *In vitro* propagation of "incayuyo", *Lippia integrifolia* (gris.) hier. (verbenaceae), a medicinal and aromatic plant of monte phytogeographical province, Argentina. *Acta Hort. (ishs)* 502:319-324.
- Ramírez, M. y Salazar, E. 1997. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.) *Rev. Fac. Agrom. (LUZ)*. 14: 497-506
- Ramírez-Villalobos, RM; Sierralata SL. de; Fernández, AU. 2002. Establecimiento *in vitro* de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio *Rev. Fac. Agron.* V.19 n.1.
- Raven, PH., Evert, RF., Eichhorn, SE. 1999. *Biology of Plants*. W.H. Freeman and Company Worth Publishers. 6th edition. 944p.
- Roca, W.M. y Mroginski, L.A. 1991. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Colombia. Centro Internacional de Agricultura. Tropical. CIAT.
- Rosell, C.H. y Villalobos, V.M. 1990. *Fundamento teórico-prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales*. Italia. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO.

Tarrago, J. et al. 2001. Efecto de diferentes fuentes y niveles de nitrógeno en la brotación in vitro de *Aloysia triphylla* (Verbenaceae). (en línea). Consultado junio 2005. Disponible en <http://agr.unne.edu.ar/Extension/Res2004/Biotecnologia/Biotec-007.pdf>.

Villalobos, RM; Sierralata SL. de; Fernández, AU. 1999. Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento in vitro de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz. Rev. Fac. Agron. (LUZ).16: 243-255.

EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA EFECTIVIDAD DE VALERIANA PRIONOPHYLLA COMO INDUCTORA DEL SUEÑO

Elda C. Cruz*
Gilda R. Gomar**
Marino Barrientos***



RESUMEN

El insomnio, patología que afecta al 10 % de la población mundial, consiste en una incapacidad prolongada para dormir adecuadamente, o despertar por la noche y tener problemas para volver a dormir. Hace años aumentó la tendencia de tratamientos alternativos como técnicas de relajación y fitoterapia para esta patología. En Guatemala existe la Valeriana, prionophylla, que tiene metabolitos activos con propiedades inductoras del sueño similares a V. officinalis, con la ventaja de ser nativa. En este estudio se comparó la efectividad en la inducción del sueño de V. prionophylla contra una técnica de relajación. Se estudiaron 32 pacientes, pero se concluyó con 28, 21 mujeres y 7 hombres, administrándoles tintura 1:5 (500 mg) de V. prionophylla, una hora antes de acostarse

*Fac. Ciencias Médicas.

**Escuela de Nutrición Fac. CC.QQ. y Farmacia.

***Fac. de Agronomía.

Revisora: Licda. Olga Leticia Mena.

durante 14 días. Posteriormente los mismos pacientes practicaron una técnica de relajación por una semana, y completaron un cuestionario diariamente como control de su evolución. Los resultados fueron analizados con ANDEVA, Prueba de Duncan de rangos múltiples, con una significancia de 0.05, se evidenciaron diferencias significativas ($p=0.0001$), indicando que *V. prionophylla* fue más efectiva que la relajación en disminuir la etapa de latencia del sueño, el número de veces de despertar durante la noche, y mejorar calidad del sueño.

Palabras clave: Insomnio, tiempo que tarda en conciliar el sueño, número de veces que se despierta.

ABSTRACT

Insomnia affects 10% to the World population. It is defined as long time difficulty to get the satisfactory sleeping time. Since some years ago, the alternative therapies have increased in the treatment of this type of pathologies (fitotherapy, relaxing techniques), In Guatemala there is a very well known Valeriana prionophylla,¹ which has active metabolites with sleeping induction properties, similar to the Valeriana . officinalis, but with the great advantage of being a native plant. This study compare the efficacy of V. prionophylla vrs a relaxing technique as sleeping induc-tors, 32 individuals were included, 4 of them left the study, then the conclusions are based on 28 patients, 21 women and 7 men. They were administered with 1:5 (500 mg) of V. prionophylla one hour before to their bed time during 14 days, after this treatment and during one week the patients by their self used a relaxing technique, all the patients auto applied a questionnaire during

every day answering topics related with the evolution of the insomnia problem. The results were analyzed using ANDEVA and Duncan's test to the multiply ranges, with 0.05 alfa, they shown statistical differences ($p=0.0001$), meaning that *V. prionophylla* was strongly more effective in the insomnia treatment than the relaxing technique, decreasing the sleeping latency phase, decreasing number of wake up periods at night and an increment in the quality of the sleeping period.

INTRODUCCIÓN

El insomnio puede ser temporal, ocasional o crónico; afecta gran parte de la población mundial, en donde se reporta una incidencia de una de cada diez personas. En Guatemala no se cuenta con estadísticas acerca de la frecuencia del insomnio pero en la práctica clínica éste es motivo de consulta frecuente.

Para su tratamiento se han utilizado diversas terapéuticas, tales como: técnicas de relajación, en las que se realizan ejercicios mentales que relajan grupos musculares siguiendo un orden determinado que inducen al sueño; otras terapias como acupuntura, cambios del estilo de vida y medicamentos derivados de las benzodiazepinas, barbitúricos, meprobamato, buspirona, etc., cuyo uso lleva a la dependencia física o psicológica por lo que es peligroso y no es justificado a largo plazo.

Otro recurso terapéutico es el uso de plantas medicinales, algunas casas farmacéuticas fabrican medicamentos que tienen principios activos con actividad inductora del sueño, entre ellas: *Valeriana officinalis*, con el inconveniente de ser cultivada en Europa, Asia, y Norte América, por lo que se tiene que importar, mientras que *Valeriana prionophylla* que es una planta nativa de Guatemala, a la que en estudios de laboratorio se le ha demostrado componentes activos con propiedad de inducir el sueño, similares a *V. officinalis* como lo son el ácido valerénico y los valepotriatos. Su uso como sustituto de *V. officinalis*, constituiría una alternativa de producción para los agricultores y facilitaría la adquisición por parte de los laboratorios nacionales que la utilizan como materia prima. Hasta el momento en Guatemala, no se cuenta con ningún estudio en el

que se pruebe su efectividad como inductora del sueño a nivel clínico donde la respuesta a lo encontrado en estudios de laboratorio pueda ser confirmada.

El propósito de este estudio fue comparar la eficacia de la tintura 1:5 de V. prionophylla (2.5 ml una hora antes de acostarse durante 15 días) como inductora del sueño, contra una técnica de relajación, en personas mayores de 40 años con problemas de insomnio, el cual se realizó en una clínica en la ciudad de Guatemala, en el año 2005.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

Estuvo conformada por 32 pacientes con insomnio, 24 del sexo femenino y ocho del sexo masculino.

Tipo de estudio:

Ensayo clínico, prospectivo, comparativo, exploratorio.

Metodología

Se elaboraron instrumentos diagnósticos en base a los objetivos para recolectar la información, los cuales incluían datos como: nombre del paciente, edad, sexo, breve historia clínica, diagnóstico, medicamentos utilizados para otras patologías, fecha de inicio de tratamiento con V. prionophylla, fecha en que se finalizó el mismo, efectos colaterales, tiempo que tardaron en conciliar el sueño, número de veces que se despertaron durante la noche, calidad del sueño que presentaron (malo, regular, bueno, muy bueno).

Determinación del tamaño de muestra

Para determinar el tamaño de la muestra (n), se realizaron cálculos estadísticos con una muestra piloto en base a los datos de los primeros diez pacientes.

Selección de la muestra de estudio

Esta estuvo integrada por todas las personas con insomnio que asistieron a la clínica particular seleccionada y otras personas que cumplieron con los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión

Pacientes con diagnóstico de insomnio

Mayores de 40 años de edad

De uno u otro sexo

Que aceptaron voluntariamente participar en el estudio

Que no estuvieran consumiendo ningún medicamento para el insomnio.

Que no sufrieran ninguna patología que pudiera alterar los resultados (enfermedades psiquiátricas, depresión).

Criterios de exclusión

Menores de 40 años de edad

Que estuvieran consumiendo medicamentos derivados de las benzodiazepinas o barbitúricos.

Que padecieran problemas psiquiátricos.

Que no aceptaran participar en el estudio.

Que sufrieran patologías que pudieran alterar los resultados.

Obtención de la Tintura de V. prionophylla.

Esta fue elaborada por Laboratorios Farmaya, con una concentración 1:5, y alcohol al 35%, el producto cuenta con el certificado de calidad, así como la autorización para su uso en el presente estudio.

Obtención de los CD con la técnica de relajación

Estos fueron adquiridos en el Instituto Guatemalteco de Psicología e Hipnosis Clínica IGUAPHIC, donde se desarrolló la técnica de relajación y se autorizó su utilización en este estudio.

Para la realización del estudio

Todos los pacientes que participaron en este estudio siguieron el mismo esquema, la primera semana se utilizó solamente para recolectar información, los pacientes completaron el cuestionario, (grupo 1 = sin tratamiento, el cual constituyó el grupo testigo), las dos siguientes semanas, el mismo grupo de pacientes recibió el tratamiento con la tintura de V. prionophylla la tintura 1:5 se administró a dosis de 2.5 ml (500 mg) mezclados con un cuarto de agua pura una hora antes de acostarse (grupo 2). La cuarta semana los mismos pacientes únicamente completaron el cuestionario (grupo 3 = post tratamiento) y la quinta semana el mismo grupo de pacientes recibió la terapia de relajación guiada (grupo 4), para lo que escucharon el CD con dicha técnica. Durante las cinco semanas, los pacientes completaron el cuestionario diariamente.

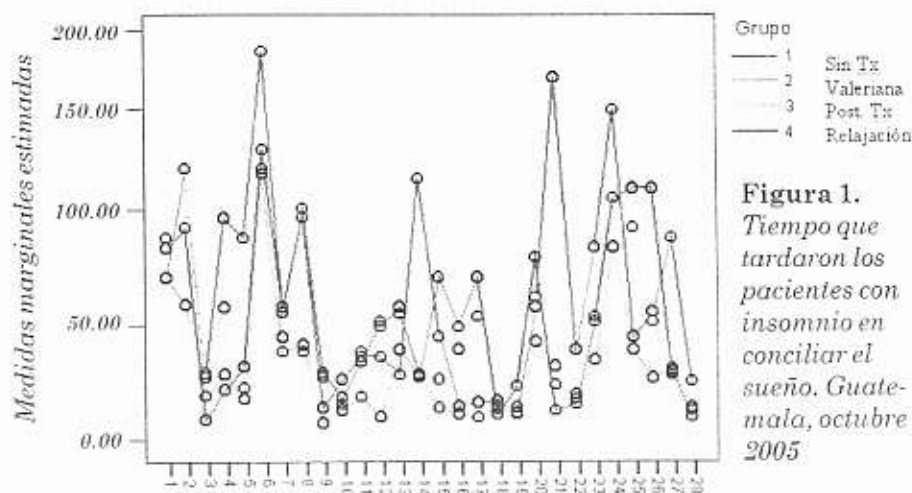
Análisis de datos

Para analizar el tiempo en conciliar el sueño, se realizó un análisis de varianza para bloques al azar y una comparación de medias. Para analizar el despertar durante la noche y la calidad del sueño de los pacientes se realizó un análisis de varianza por rangos de Friedman, con una significancia de 0.05.

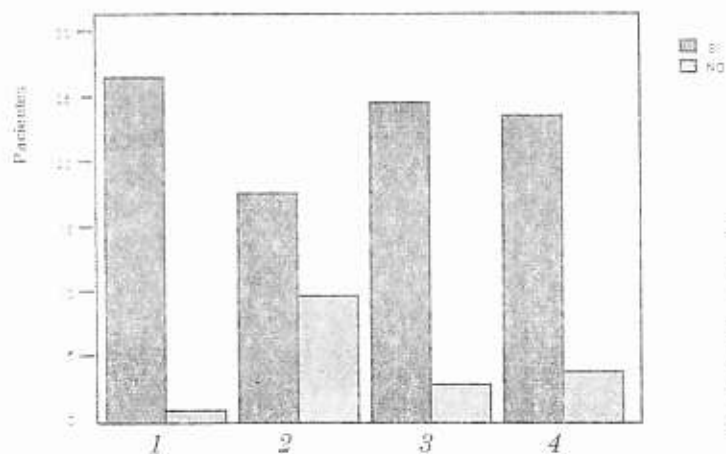
RESULTADOS

*El estudio se inició con una muestra de 32 sujetos, integrada por 24 pacientes de sexo femenino y 8 pacientes de sexo masculino, con edades comprendidas entre 40 y 87 años. Finalizaron el estudio 28 pacientes (21 femeninos y 7 masculinos), cuatro pacientes abandonaron el mismo (un paciente en la primera semana porque no deseaba responder el cuestionario diariamente, dos pacientes en la segunda semana por presentar molestias gástricas al ingerir la tintura de *V. prionophylla*, y un paciente en la cuarta semana por problemas personales).*

*Para la variable tiempo en conciliar el sueño se utilizó ANDEVA para diferencia de medias con una significancia de 0.05, para analizar el efecto entre tratamientos, entre pacientes y la interacción grupo por paciente, se encontró que sí existieron diferencias muy evidentes entre grupos y entre pacientes, con un valor p de 0.0001. Para conocer qué grupos presentaban las diferencias se aplicó la prueba de Duncan de rangos múltiples la cual evidenció diferencias significativas en los promedios de tiempo, el grupo que recibió tratamiento con *V. prionophylla* presentó una media de 33.9 minutos contra 65.7 minutos del grupo testigo (sin tratamiento), se observó además que el grupo de pacientes en la fase post tratamiento con *V. prionophylla* presentó una media de 49.9 minutos contra 55.2 minutos que presentó el grupo de pacientes con la técnica de relajación. (Figura 1).*



En cuanto al despertar durante la noche, en los pacientes con tratamiento con *V. prionoophylla* se observó un aumento en el número de pacientes que dejaron de despertarse durante la noche, en comparación con los del grupo testigo (sin tratamiento). El número de pacientes en terapia de relajación y cuando estuvieron en la etapa post tratamiento también aumentó con respecto al grupo testigo, pero en menor intensidad. (Figura 2).



Al analizar el número de veces que despertaron los pacientes durante la noche, también se encontraron diferencias significativas entre grupos y entre pacientes ($p=0.0001$) y en la prueba de Duncan para rangos múltiples se evidenció que el grupo que recibió tratamiento con *V. prionophilla*, fue el que más disminuyó el número de veces en despertarse durante la noche, seguido por el grupo que recibió la técnica de relajación, luego el grupo post tratamiento con *V. prionophilla*, y por último el grupo testigo (sin tratamiento) (Cuadro 1, Figura 3).

Cuadro 1. Número de veces que se despertaron los pacientes con insomnio. Guatemala, octubre 2005

GRUPO	No. DE VECES				TOTAL
	0	1	2	3 o más	
1	1	6	14	7	28
2	10	12	6	0	28
3	3	6	18	1	28
4	4	9	13	2	28

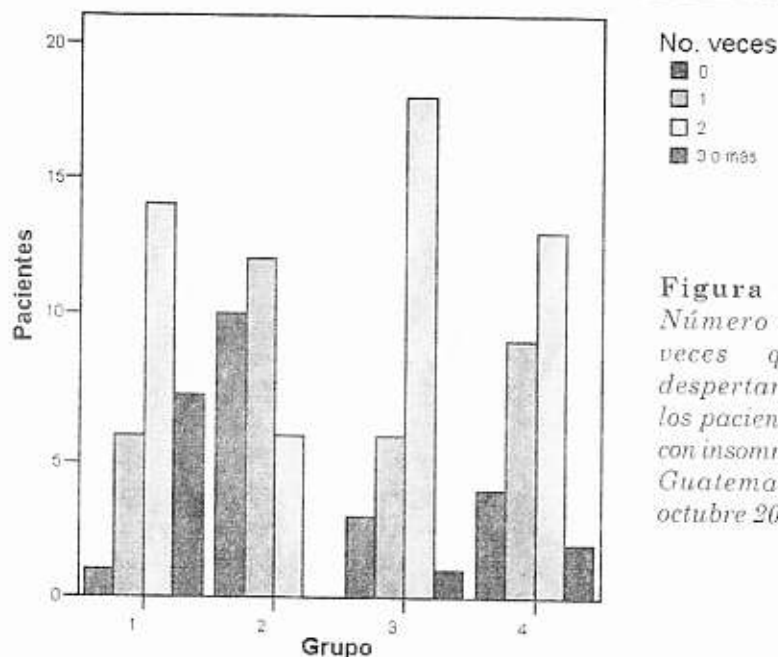


Figura 3. Número de veces que despertaron los pacientes con insomnio. Guatemala, octubre 2005

En cuanto a la calidad del sueño de los pacientes, nuevamente se observaron diferencias significativas entre grupos y entre pacientes ($p=0.0001$). Con la prueba de Duncan para rangos múltiples se observó que el grupo que recibió tratamiento con *V. prionophylla* presentó mejor calidad del sueño, seguido por el grupo post tratamiento, luego por el grupo con la técnica de relajación y finalmente el grupo sin tratamiento (Cuadro 2, Figura 4).

Cuadro 2. Calidad de sueño de los pacientes con insomnio. Guatemala, octubre 2005.

GRUPO	No. DE VECES			TOTAL
	MALO	REGULAR	BUENO	
1	9	18	1	28
2	0	10	18	28
3	1	21	6	28
4	3	17	8	28

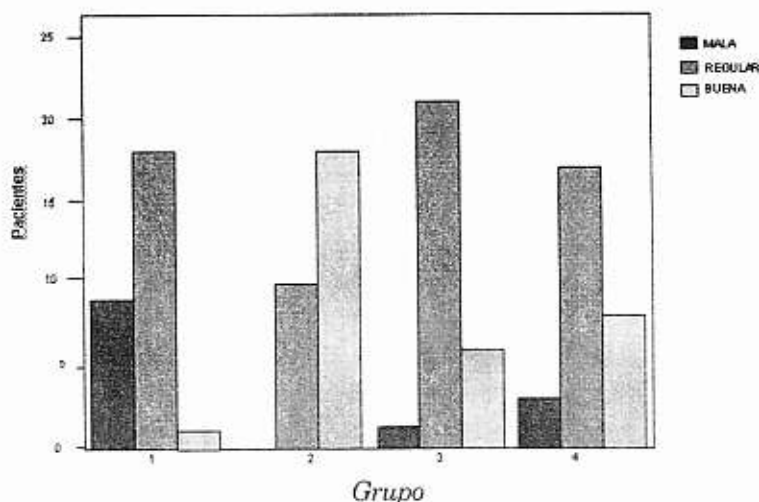


Figura 4. Calidad del sueño de los pacientes con insomnio. Guatemala, octubre 2005

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La muestra del estudio estuvo conformada por 32 pacientes de los cuales 4 abandonaron el mismo, dos pacientes por molestias gástricas, un paciente por no completar los datos del cuestionario y un paciente por razones personales. Concluyeron el estudio 28 pacientes, de los cuales predominó el sexo femenino con 21 pacientes y 7 de sexo masculino, datos que coinciden con lo reportado en la literatura, en la que se menciona que en el sexo femenino se hace más evidente el problema de insomnio. (3,5).

En cuanto al grupo etéreo que presentaron los pacientes en este estudio, el rango de edad fue entre 40 y 87 años, con un promedio de 50.2 años, la edad más frecuentemente observada fue de 40 años.

*Al analizar la etapa de latencia del sueño, se pudo observar en este estudio que los pacientes en la fase de tratamiento con *V. prionophylla* redujeron la misma en 32 minutos en comparación con el grupo testigo. Se observó, asimismo, que el tiempo promedio que duró esta etapa de latencia del sueño en este grupo de pacientes, es similar al tiempo en minutos de una etapa de latencia en sujetos que tienen un sueño normal, de acuerdo a lo que reportan los expertos en este campo, además es de hacer notar que esta etapa de normalización del tiempo en conciliar el sueño persistió en estos pacientes durante 3 ó 4 días más, probablemente debido a que los patrones de sueño habían empezado a normalizarse o bien podría deberse a efecto residual del medicamento, aunque en la mayoría de estudios no se reportan efectos residuales del mismo.*

En ensayos como el de Balderer (4), quien en 1985 demostró reducción en la etapa de latencia del sueño utilizando extracto

acuoso de *V. officinalis*, en sujetos con insomnio, los resultados son similares a lo observado en este estudio, lo que no sucedió con el grupo que utilizó la técnica de relajación, ya que el tiempo de latencia del sueño sólo disminuyó 10.5 minutos en promedio en comparación con el grupo sin tratamiento. Esto pudo ser porque a algunas personas les molestó el efecto de eco que presentaba la voz del sujeto que daba las instrucciones de relajación, lo que les causó una mayor dificultad para conciliar el sueño, esto no coincide con lo encontrado por Garzón et al (2) quien reportó que para el tratamiento de pacientes con insomnio las terapias de relajación son más efectivas que los tratamientos farmacológicos. Pero esto puede deberse a las diferentes características culturales que presentaron los pacientes de este estudio ya que lo reportado por Garzón et al (2) fue realizado con personas colombianas.

En cuanto al número de veces que se despertaron los pacientes durante la noche, se encontró que cuando los pacientes tomaron *V. prionophylla* despertaron un menor número de veces que el resto de grupos, lo que coincide con lo reportado en la literatura para la *V. officinalis*, por Donalith et al (1), no así por lo encontrado por Garzón et al (3) para la técnica de relajación, ya que en este estudio los pacientes que estaban utilizando dicha técnica despertaron en promedio un mayor número de veces.

Respecto a la calidad de sueño se encontró que los pacientes con *V. prionophylla* presentaron una mejor calidad del mismo, lo que coincide con lo reportado por Poyares en el 2002 para la *V. officinalis*. (4)

Es importante resaltar que ningún paciente en fase de tratamiento con *V. prionophylla*, reportó reacciones negativas sobre el estado de alerta a la mañana siguiente, así como ningún efecto

de toxicidad aguda como cefalea, excitabilidad o disturbios cardíacos, lo que pudo deberse a la dosis empleada y a que solamente se utilizó durante 14 días. En este caso sólo fueron reportadas molestias gástricas leves, las que desaparecieron al discontinuar el tratamiento.

Es de hacer notar que al no encontrarse estudios similares con *V. prionophylla*, estos resultados solamente se pueden comparar con el grupo sin tratamiento, y con los resultados de los estudios realizados utilizando *V. officinalis*, porque sus propiedades inductoras del sueño son similares.

CONCLUSIONES

1. La *V. prionophylla* disminuyó significativamente la etapa de latencia del sueño.
2. La *V. prionophylla* disminuyó el número de veces que los pacientes despertaron durante la noche.
3. La *V. prionophylla* mejoró significativamente la calidad del sueño.
4. La *V. prionophylla* fue más efectiva como inductora del sueño que la técnica de relajación en pacientes mayores de 40 años con insomnio.

RECOMENDACIONES

Realizar otros estudios con *V. prionophylla* en los que se investigue la dosis y características de los pacientes en los que el medicamento no sea efectivo.

REFERENCIAS

1. Donath F. et al. 2000. *Critical Evaluation of the Effect of Valerian Extract on Sleep Structure and Sleep Quality. Pharmacopsychiatry.* 33, (2); 47-53.
2. Garzón A. et al. *Tratamiento no Farmacológico del Insomnio Crónico, Manejo. Psicológico del Insomnio Crónico. Consultado el 25 de Julio 2005. Disponible en <http://www.geocities.com/feescob/manejono.html>.*
3. Goldman L y Bennett J.C. 2000 *Tratado de Medicina Interna de Cecil. Trad Blengio J. et al. 21º. ed. Madrid: McGraw-Hill – Interamericana de España, S. A. U. Vols. 1. 1302pp.*
4. Hobbs C. 1995. *Valerian. The Relaxing and Sleep Herb. 3rd printing, Botanica Press. The Herbs and Health Series.*
5. Kasper et al. 2001. *Harrison Principles of Internal Medicine – 15 th Edition. McGraw-Hill – Interamericana de España. 1 disco compacto (CD-ROM).*