

2. *Phyla dulcis* (Trevir.) Moldenke: Descripción de características anatómicas diagnósticas de la droga cruda

Granados-Dieseldorff, N., Paredes M., Ordóñez M., Martínez V.

Escuela de Estudios de Postgrado. Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales – MUPLAM-. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
nathaliagd@gmail.com

3. Resumen

Phyla dulcis (Trevir.) Moldenke, comúnmente conocido como orozus, es una planta de la familia Verbenaceae ampliamente distribuida en el territorio guatemalteco. Además de su propiedad edulcorante, posee diversos usos medicinales, destacándose su propiedad bactericida, antiespasmódica y antiinflamatoria que se usa para tratar enfermedades respiratorias como catarros y bronquitis. Esta especie posee variaciones químicas a nivel de poblaciones (Souto-Bachiller, 1997) que podrían indicar una variación a nivel de caracteres anatómicos tanto organolépticos como macroscópicos y microscópicos. Por esta razón, y debido a la necesidad de llenar vacíos de información científica que valide el uso popular de plantas de la región, así como la de generar información a nivel de control de calidad para laboratorios productores de fitofármacos, este estudio presenta los resultados de la comparación anatómica de 30 individuos de tres poblaciones diferentes.

Los procedimientos estadísticos realizados no revelaron diferencias anatómicas intra o inter poblacionales. Con esto se concluye que la droga cruda consiste en hojas desecadas cuyas características organolépticas más relevantes son su sabor muy dulce y olor aromático. La hoja es anfiestomática, con estomas en su mayoría anomocíticos, aunque también puede presentar paracíticos y diacíticos y una epidermis uniestratificada con cutícula estriada y células grandes y de paredes ligeramente onduladas en el haz y en el envés más pequeñas y altamente sinuadas. La hoja presenta en el haz abundantes tricomas tectores unicelulares y pluricelulares de tipo simple con base en roseta o base simple. Los tricomas que abundan en el envés son de tipo glandular, capitados, globosos, uni o pluricelulares. El mesófilo de la hoja suele presentar dos capas de parénquima en empalizada diferenciado del parénquima esponjoso. La vena central posee los mismos tejidos que el limbo y además cuenta con un haz vascular de tipo colateral. El pecíolo presenta una epidermis uniestratificada, seguido de 2-4 capas de colénquima, parénquima y un haz vascular colateral en forma de U. Todas las variables estudiadas a nivel microscópico fueron tomadas en cuenta para la elaboración de la cartilla micrográfica.

Palabras clave: *Phyla dulcis* (Trevir.) Moldenke, Verbenaceae, orozus, droga cruda.

4. Abstract

Phyla dulcis (Trevir.) Moldenke, commonly known as orozus, is a plant of the Verbenaceae family, widely distributed in Guatemala. Besides its sweetening property, orozus also possesses several medicinal properties (e.g. antibacterial, antispasmodic and anti-inflammatory properties). It is used to treat respiratory diseases such as colds, coughs and bronchitis. This species has chemical variations between different populations, which could suggest anatomy variation, including organoleptic, macroscopic and microscopic characteristics. Results of the anatomical comparison of 30 specimens of orozus from three different populations are presented, this in order to generate information that can help to validate popular uses of plants in the region, as well as to generate data for the phytopharmaceutical laboratories.

Groups within and between populations were not evident in the cluster analysis performed in this study. The drug consists of aromatic dried leaves with very sweet flavor. The leaf is amphistomatic, with majorly anomocytic stomata, but paracytic and diacytic stomata can also be found. This has onelayer epidermis and cells with striated cuticle. Larger and slightly wavy walls on the upper side of the leaf were found, and smaller highly sinuate on the underside of the leaf. The blade presents abundant unicellular and multicellular trichomes, these can be simple or grounded in a rosette like cell disposition. In the underside of the leaf, the thricomes are glandular, capitated, uni or multicellular type. The mesophyll usually has two layers of differentiated pallisade parenchyma and spongy parenchyma. The central vein has the same tissues as the rest of the leaf and also has a collateral vascular bundle type. Petiole presents a one-layer epidermis, followed by 2-4 layers of collenchyma, parenchyma and U-shaped vascular bundle.

Keywords: *Phyla dulcis* (Trevir.) Moldenke, Verbenaceae, orozus, drug.

5. Introducción

El estudio del recurso fitofarmacéutico se ha incrementado en las últimas décadas en países en vías de desarrollo como Guatemala, ya que hay mayor responsabilidad y controles gubernamentales tanto a nivel nacional como regional, así como mayor apoyo académico. Como consecuencia de ello la elaboración de productos a partir de especies locales ha tomado cada vez mayor importancia y las instancias gubernamentales y académicas han desarrollado protocolos básicos para el control de calidad y para demostrar la bioactividad que incluyen la identidad, pureza y farmacología de la especie en interés, que validen su uso terapéutico confiable y seguro como una alternativa en el sistema de salud o como coadyuvante en el tratamiento de algunas enfermedades. Diversas entidades e instituciones trabajan conjuntamente para desarrollar monografías herbolarias de especies de la región cuya propiedad farmacológica ha sido demostrada y validada por el uso prolongado durante décadas por la población local.

Una de las plantas con uso medicinal utilizada ampliamente en Guatemala es *Phyla dulcis* (Trevir.) Moldenke (Verbenaceae), conocida como orozuz. Se encuentra ampliamente distribuida en el territorio guatemalteco, desde el nivel del mar hasta los 1800 m. Posee diversos usos medicinales, destacándose su propiedad para tratar enfermedades respiratorias, además de servir como edulcorante. (Cáceres, 1999; Compadre, *et al.*, 1985)

El presente estudio describe los caracteres anatómicos diagnósticos de la hoja por medio del análisis de especímenes de tres poblaciones provenientes de distintos rangos altitudinales; se complementa con las descripciones de la droga cruda a nivel macro y microscópico así

como una cartilla micrográfica preliminar como propuesta para la monografía de control de calidad de la especie. Se evalúa además, si presentan variaciones anatómicas asociadas a la variable ambiental altitudinal.

6. Materiales y Métodos

Población y muestras

Se evaluaron las hojas de 10 individuos de cada población. Las poblaciones estudiadas fueron colectadas en las siguientes áreas:

Localidad	Rango altitudinal	Ubicación	Altitud (msnm)
CEDA*, Guatemala	1200-1800 msnm	N14° 34.811' W 90° 33.220'	1465
El Chico, UsulutánZacapa	600-1200 msnm	N 15° 01.020' W 89° 50.468'	929
Platanares, Güesacapán, Santa Rosa	0-600 msnm	N14° 34.811' W 90° 33.220'	262

*CEDA: Centro Experimental Docente de Agronomía, USAC

Colecta

Para cada población se tomaron muestras de diferentes estadios de las hojas (jóvenes y maduras) recolectando las ramas, colocándolas en bolsas plásticas y transportándolas en una hielera. Las muestras se fijaron con formol aceto alcoholico (FAA) lo antes posible para evitar que la planta se marchitara. (Gattuso, M y Gattuso, S, 1999 y Granados, 2007) Secado El material vegetal se secó a la sombra, tomando un promedio de 3-4 días. Se colocó dentro de sobres de papel periódico para ayudar a absorber humedad

Macroscopía

Se tomaron en cuenta las siguientes características: Aspecto general, consistencia, color, forma, olor, sabor, superficie de la lámina, transparencia y pecíolo.

Técnicas histológicas (Microscopía)

Cortes a mano alzada

Se colocó la hoja sobre un portaobjetos y se cubrió con otro portaobjetos. Luego con una hoja de afeitar se realizaron cortes transversales muy finos conforme se iba corriendo el portaobjetos superior.

Técnica de semidiafanizado y diafanizado Se tomó la hoja completa de *Phylla dulcis* tomando en cuenta que ocupara completamente un portaobjetos. Después de seleccionado el material se procedió a realizar una mezcla de las técnicas de semidiafanizado y diafanizado de la siguiente manera:

Se colocó el material en un vaso de precipitado con una mezcla de alcohol al 96% e hidróxido de potasio al 5% en partes iguales y se colocó en una estufa a 60°C durante media hora. Luego se hizo un enjuague con agua hasta que el líquido quedara limpio, teniendo mucho cuidado de no quebrar el material.

Se trasladó el material a una caja de Petri con hipoclorito de sodio al 50% hasta que quedaran blanco-transparentes.

Se lavó con agua destilada, hasta eliminar totalmente el hipoclorito de sodio. Se colocó en hidrato de cloral (2:5) durante 1015 minutos como mínimo, hasta que se tornaran transparentes.

El material se coloreó con Safranina al 1% y agua y se montó con gelatina-glicerina.

El índice de estomas se determinó de la siguiente manera (Gattuso, M; Gattuso S, 1999 y Solís *et al.*, 2005)

Se observó con un microscopio equipado de tubo de dibujo, utilizando el objetivo de 40x. Se dibujó en el papel el área observada de 2 mm de lado.

Se dibujó dentro de esa área una cruz por cada célula epidérmica y un círculo por cada estoma. Se calculó el resultado de la siguiente manera: $I = (S \times 100) / (E + S)$

Donde I el índice de estomas, S el número de estomas en una superficie determinada de la

hoja y E el número total de células epidérmicas en la misma área (incluyendo los tricomas que pudieran aparecer)

Cartilla Micrográfica (Granados, 2007) Se seleccionaron solamente las características comunes de la especie, eliminando las que difieren entre poblaciones o entre individuos. Se hicieron los dibujos de la microscopía con tinta china, de la manera más exacta y precisa, utilizando los esquemas de Metcalfe y Chalck (Gattuso, M; Gattuso S, 1999). Con esto se procedió a hacer una descripción tanto macro como microscópica de la especie.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis multivariado utilizando distancia euclidiana de enlace completo.

7. Resultados

Descripción de caracteres diagnósticos.

Características organolépticas.

Las hojas desecadas de *Phylla dulcis* (Trevir.) Moldenke. presentan el haz de color verde olivo oscuro y el envés verde olivo, más claro que el del haz. Su sabor es muy dulce y su olor es aromático.

Caracteres macroscópicos para identificar la droga cruda (Figura A)

Las hojas enteras desecadas listas para su uso son quebradizas, delgadas y de aspecto papiráceo. Las hojas enteras jóvenes son ovadas. El haz y el envés de la hoja poseen numerosos tricomas que le dan una textura suave y sedosa. El ápice de la hoja es agudo, la base atenuada y el margen crenado, cada lóbulo está más o menos dentado. No posee puntos de transparencia y el pecíolo es de tipo alado. El pecíolo de las hojas es largo, la nerviación es pinnada, con un nervio principal recto que inicia a nivel de la base y culmina en el ápice. De la vena primaria se ramifican

venas secundarias que llegan al margen de la hoja.

Caracteres microscópicos para identificar la droga cruda

La epidermis tanto del haz como del envés es simple y uniestratificada. En corte transversal se observa la siguiente secuencia: las células de la epidermis del haz son de forma redonda y las del envés son de igual forma ovalada, aplanadas dorsiventralmente y más pequeñas (Figura B2 y B5). La epidermis del haz posee una cutícula gruesa y estriada (Figura B1). En vista superficial, las células del haz son rectangulares, con paredes ligeramente sinuadas (Figura E). Las células de la epidermis del envés son rectangulares con paredes altamente onduladas (Figura D). La hoja es anfiestomática con un mayor índice de estomas en el envés que en el haz. El índice promedio del envés es de 23.3 con un rango desde 20.15 hasta 27.18 y una moda de 23.43. El del haz es de 13.71 con un rango desde 10.15 hasta 17.35 con una moda de 13.12. Los estomas son en su mayoría anisocíticos (Figura J) y en menor frecuencia de tipo diacítico (Figura L) y paracítico (Figura K). En el haz, los tricomas son en su mayoría tectores, aunque pueden ser también glandulares (Figura C1 y C2). En el envés, la mayoría de tricomas son glandulares, aunque también se presentan tectores. Los tricomas tectores son de dos tipos: el primer tipo es unicelular simple con base en roseta (Figura F) y el segundo tipo es pluricelular (dos células por lo general) con base simple (cuatro células epidérmicas normales) (Figura G). Algunos tricomas

pueden contener cristales (cistolitos) en su interior (Figura M). Los tricomas glandulares son de base muy corta, capitados y globosos, unicelulares o formados por dos células (Figura I2).

La constitución del mesófilo es homogénea. Posee dos capas de parénquima en empalizada seguida por el parénquima esponjoso. El parénquima en empalizada suele tener células alargadas verticalmente, de forma rectangular y en general de 4 a 5 veces más largas que anchas (Figura B3). No se observan espacios intercelulares lo que se traduce en una sección compacta y homogénea por debajo de la epidermis del haz. El parénquima esponjoso suele presentar células redondas, grandes y con menor cantidad de cloroplastos (Figura B4). En la región de la vena central la epidermis es uniestratificada con tricomas tanto tectores como glandulares. Bajo la epidermis se encuentra una capa gruesa de parénquima con células redondeadas, grandes, rodeando al haz vascular de tipo colateral.

En el corte transversal de pecíolo se puede observar una epidermis uniestratificada con tricomas tectores y glandulares (Figura N1, O1 y O3). Por debajo de la epidermis se puede observar una sección de colénquima lagunar de 2-4 capas (Figura N2 y O2) y por debajo de éste se observa una capa gruesa de parénquima con las mismas características que las de la vena central (Figura N3 y O4). Los haces vasculares del pecíolo son colaterales (Figura O5 y O6) observándose uno principal y puede haber uno o dos secundarios, en la región del ala del pecíolo.

Propuesta de Cartilla Micrográfica de *Phyla Dulcis* (Trevir.) Moldenke.

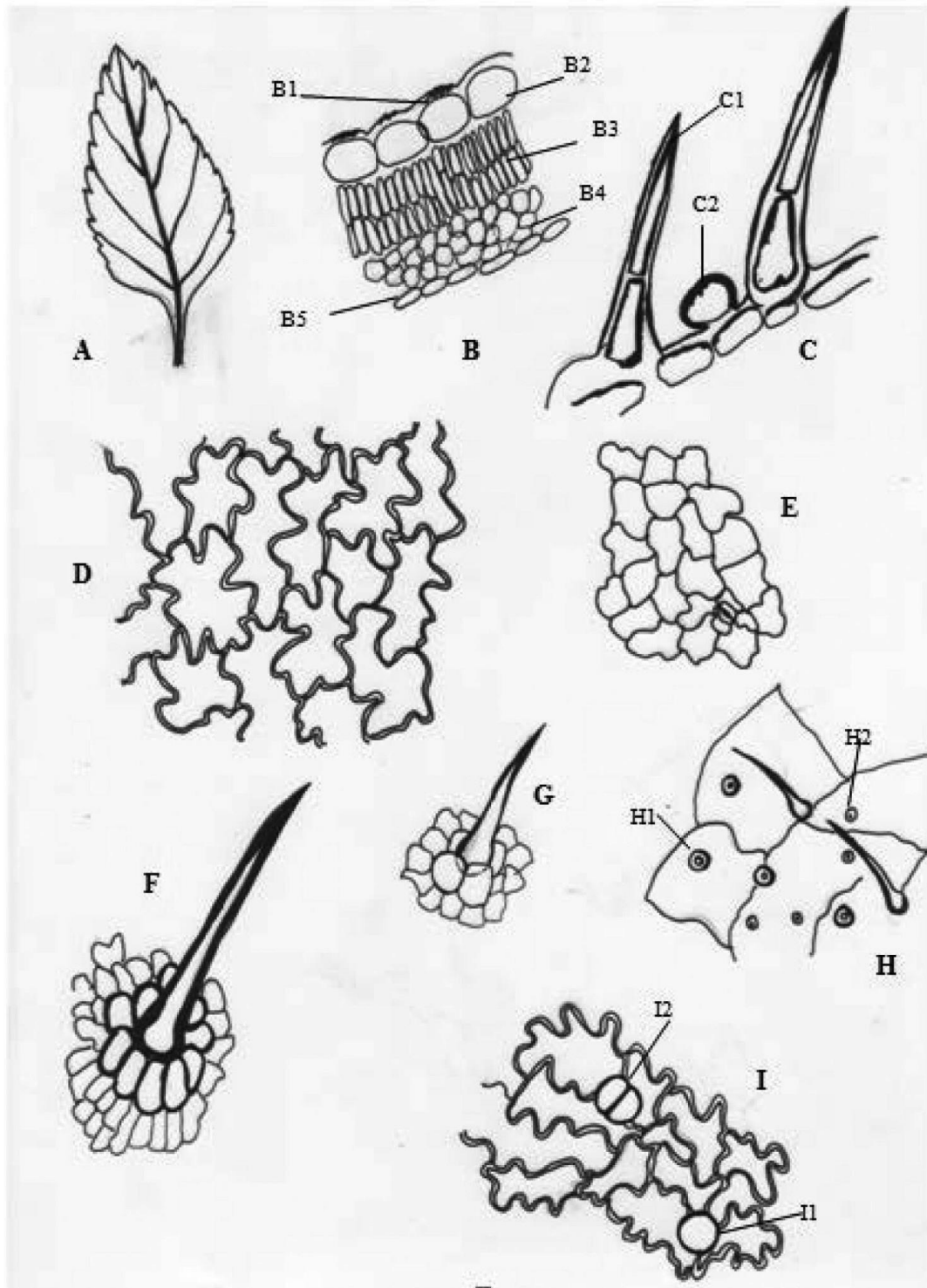


Fig. A. Lámina de *Phylla dulcis* (Trevir.) Moldenke. **Fig. B.** Corte transversal de hoja B1. Cutícula estriada B2. Epidermis del haz B3. Parénquima en empalizada B4. Parénquima esponjoso B5. Epidermis del envés **Fig. C.** tricomas C1. Tricoma tector C2. Tricoma glandular **Fig. D.** Epidermis del envés **Fig. E.** Epidermis del haz **Fig. F.** Tricoma con base de roseta **Fig. G.** Tricoma con base simple **H.** Diafanizado de hoja H1. Tricoma grande H2. Tricoma pequeño **Fig. I.** Epidermis del envés I1 Tricoma pluricelular I2 Tricoma unicelular

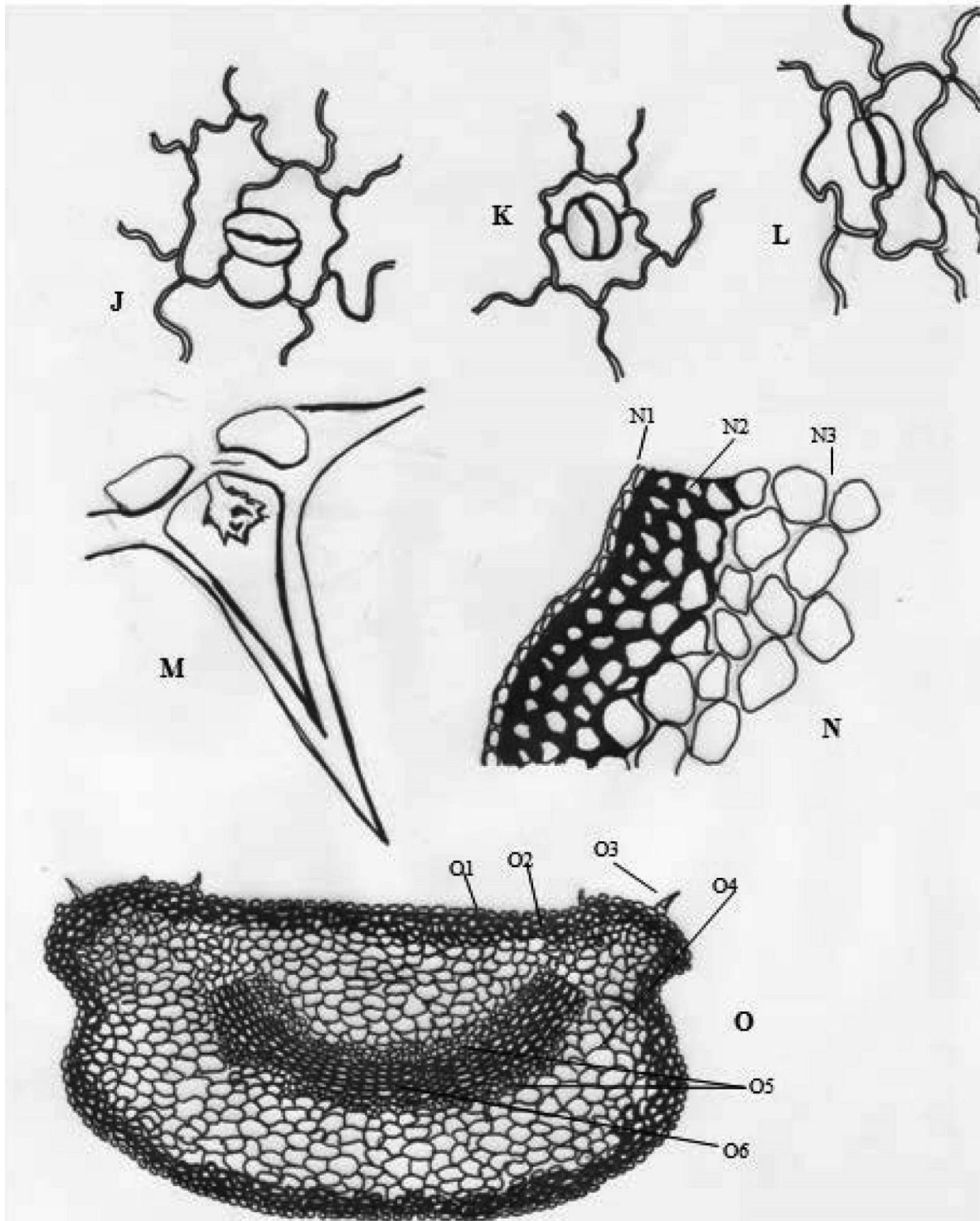


Fig. J. Estoma anisocítico **Fig. K.** Estoma diacítico **Fig. L.** Estoma paracítico **Fig. M.** Cistolito en tricoma tector **Fig. N.** Corte transversal de peciolo N1. Epidermis N2. Colénquima lagunar N3. Parénquima de almacenamiento **Fig. O.** Corte transversal de peciolo O1. Epidermis O2. Tricoma en peridermis O3. Coléquima lagunar O4. Parénquima de almacenamiento O5. Floema O6. Xilema

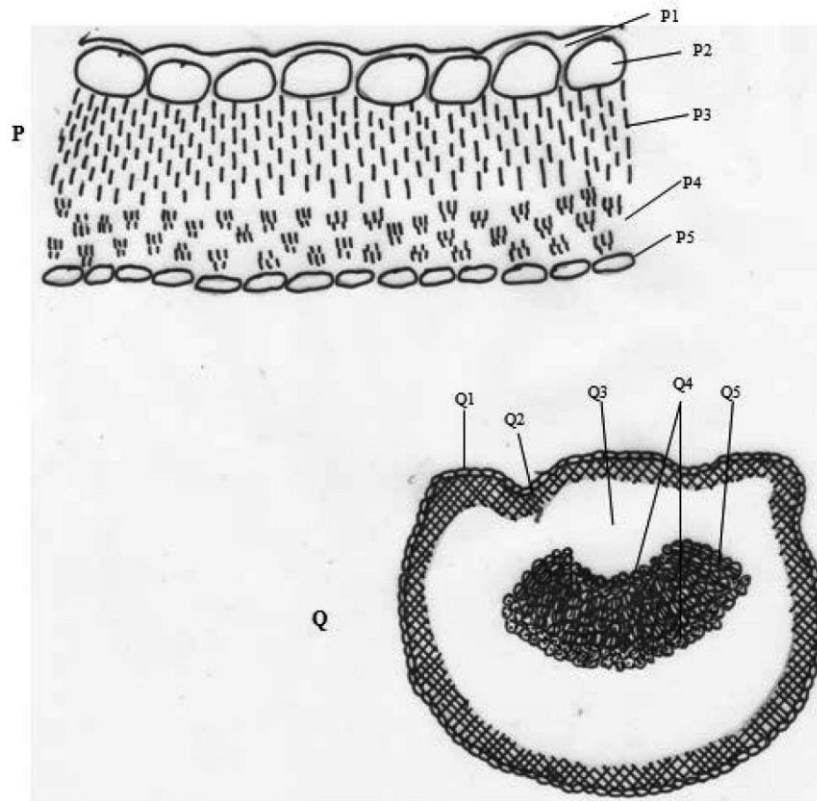
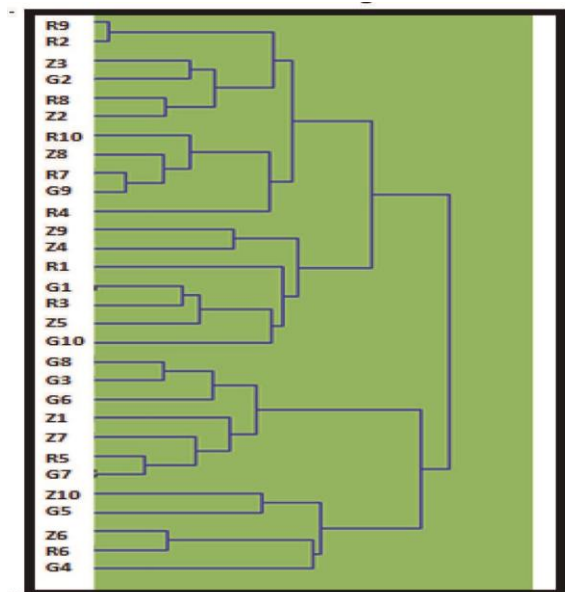


Fig. P. Corte transversal de hoja de *Phylla dulcis* (Trevir.) Moldenke (esquema según Metcalfe y Chalk) P1. Cutícula P2. Epidermis del haz P3. Parénquima en empalizada P4. Parénquima esponjoso P5. Epidermis del envés **Fig. Q.** Corte transversal de peciolo de *Phylla dulcis* (Trevir.) Moldenke Q1. Epidermis Q2. Parénquima de almacenamiento Q3. Floema Q.4 Xilema

Análisis Estadístico

Se encontraron cuatro variables diagnósticas para la especie, siendo éstas: Índice de estomas del haz y del envés, número de capas de colénquima del peciolo y número de haces vasculares del peciolo. La distancia euclidiana tomada en cuenta para analizar dichos datos determinó que las variables no fueron discriminativas para hacer separación a nivel de subpoblaciones de *Phylla dulcis* (Trevir.) Moldenke tomando en cuenta la altitud en la que se encuentra. (Gráfica 1)

Gráfica 1. Dendrograma



Discusión de Resultados

Los datos obtenidos en el estudio comparativo de caracteres anatómicos de la droga cruda de *Phyla dulcis* (Trevir.) Moldenke. muestran una alta similitud entre individuos. Las variables tomadas así como el número de individuos estudiados no lograron marcar diferencias a nivel poblacional. Con esto, la altura no es una variable que influya en la anatomía tanto macro como microscópica de dicha planta. Las variaciones observadas tanto a nivel de número de capas de colénquima del pecíolo así como número de haces vasculares del pecíolo fueron mínimas, es decir, se presentaron de 2 a 4 capas de colénquima y siempre se presentó un haz vascular principal que puede ir o no acompañado de uno o dos haces secundarios. Estas variaciones no permiten realizar una separación interpoblacional, más bien, estas variaciones son a nivel de individuo. Un factor que podría determinar el número de capas de pecíolo es el tamaño de la hoja. Si una hoja es muy grande, es necesario que el pecíolo desarrolle más capas de colénquima ya que es un tejido que le da rigidez a la planta, así que dicha planta, si es grande, necesita tejidos que le ayuden a mantenerse erguida. Del mismo modo, si la hoja es grande, es necesario que hayan haces vasculares alternos que ayuden al intercambio de agua y nutrientes entre la hoja y el resto de tejidos vegetales. Esto podría explicar dichas variaciones. Cabe mencionar que el tamaño o edad de la hoja colectada no fue una variable tomada en este estudio lo que pudo causar dichas variaciones.

En un estudio publicado por Cáceres, A (2006) sobre monografías de la región, se presenta una propuesta de descripción anatómica de *Phyla dulcis* realizada en México, por el Instituto Mexicano de Seguridad Social (IMSS). Al realizar una

comparación con los datos obtenidos, se puede llegar a concluir lo siguiente:

La forma básica así como los caracteres macroscópicos son muy parecidos entre ambas descripciones. En cuanto a la descripción microscópica, el estudio publicado por Cáceres reporta cutícula rugosa en ambas caras de la lámina. En el presente estudio se reporta que la cutícula es de tipo estriada y solo se presenta de este modo en la cara adaxial. Además el estudio reporta estomas de tipo anisocítico, anomocítico, paracítico, diacítico y tetracítico. En el presente estudio se observaron en la gran mayoría estomas anisocíticos y algunos diacíticos y paracíticos, eliminando de dichas poblaciones los de tipo anomocítico y tetracítico. El mismo estudio publicado por Cáceres menciona que la lámina de la hoja puede presentar dos tipos de estructuras secretoras: el primero tipo son tricomas glandulares, uni o pluricelulares, que si coinciden con la presente descripción, y el segundo tipo describe unas glándulas formadas por un complejo de células secretoras e idioblastos en la epidermis y subepidermis. Con el presente estudio no se pudo afirmar la presencia de dichas estructuras, más bien, se consideran como tricomas en crecimiento ya que los idioblastos que ellos describen son células buliformes encargadas de enrollar las hojas en gramíneas. Esto no coincide con el tipo de planta trabajada ya que se trata de una Verbenaceae. Por otro lado, cabe mencionar que en ambos estudios se menciona la presencia de cristales, siendo éstos en el trabajo publicado por Cáceres de oxalato de calcio y oxalato de magnesio, mientras que en el presente estudio no se pudo determinar la naturaleza de dichos cristales ya que no se realizaron pruebas de tipo histoquímico. Además cabe mencionar que se observaron cistolitos dentro de algunos tricomas tectores.

Con esto se puede concluir que este tipo de características son continuas entre individuos de esta especie y por lo tanto, son caracteres diagnósticos de la droga cruda.

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

Si se comparan las características observadas con la descripción botánica de la especie, según la Flora de Nicaragua, se puede decir que las hojas colectadas en las poblaciones del CEDA (Centro Experimental Docente de Agronomía, FAUSAC, USAC), Guatemala; El Chico, Usumatlán, Zacapa y Platanares, Güasacapán, Santa Rosa fueron más pequeñas que las reportadas por la literatura, ya que en el presente estudio las hojas midieron 1-5 cm de largo y 0.5-3 de ancho y la literatura reporta hojas ovadas (lanceoladas), 3-7 cm de largo y 1.5-4 cm de ancho. En cuanto al tipo de ápice (agudo), margen (crenado) y presencia de tricomas, dichas descripciones si coinciden con la literatura. Para la realización de la cartilla micrográfica se tomaron en cuenta todos los parámetros evaluados en dicho estudio.

Agradecimientos

Se agradece por su colaboración a:

Laboratorio de Biensayos del Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC

Unidad de Análisis Instrumental (UAI); Facultad de CCQQ y Farmacia, USAC

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

M.Sc Carolina Rosales de Zea por sus valiosas correcciones y observaciones a dicho documento.

Referencias

- Souto-Bachiller, FA, *et al.* (1997). Terpenoid Composition of *Lippia dulcis*. *Phytochemistry*. Vol. 44 no.6: 1077-1086.
- Cáceres, A. (1999). Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Eds. L. Girón y A. Cáceres. Guatemala, GT, Editorial Universitaria. 402 p.
- Cáceres, A Ed. (2006). Propuesta de Monografías Farmacopeicas de 10 Plantas Medicinales Centroamericanas. OEA-AID (Organización de Estados Americanos OEA; Agencia Interamericana de Cooperación para el Desarrollo AICD). Guatemala, GT. 88 p.
- Compadre, C *et al.* (1985). Hernandulcin: An Intensely Sweet Compound Discovered by Review of Ancient Literature. *Science*. 227: 417-419.
- Gattuso, M; Gattuso SJ. (1999). Manual de Procedimientos para el Análisis de Drogas en Polvo. AR. UNR Editora. s.p.
- Granados, N. (2007). Establecimiento de los patrones de identidad farmacognóstica de *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass a partir de las características anatómicas de seis poblaciones silvestres. Tesis Lic. Guatemala, GT, USAC. Escuela de Biología. 85 p.
- Solís, PN *et al.* (2005). Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterápicos. OEA/AICD/AE 089/03: Proyecto

Desarrollo y Tecnología de Cultivo de
Plantas Medicinales y Producción de
Fitofármacos. 132p.

Williams, LO. (1981). The Useful Plants of
Central America. Ceiba. 24: 3-342.