



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA Y ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE TILLANDSIA IMPERIALIS C. J. MORREN EX ROEZL (BROMELIACEAE).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JOSÉ ALEJANDRO VITE POSADAS



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. HELIA REYNA OSUNA FERNÁNDEZ

2005



m342518



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Caracterización anatómica y estudio farmacológico de Tillandsia imperialis
C.J. Morren ex Roetzl (Bromeliaceae)."

realizado por

Vite Posadas José Alejandro
con número de cuenta 09710171-6 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Helia Reyna Osuna Fernández.

Propietario M. en C. María Gabriela Rojas Bribiesca.

Propietario Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco.

Suplente Dr. Guillermo Laguna Hernández.

Suplente M. en C. Armando Gómez Campos.

Consejo Departamental de Biología.

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

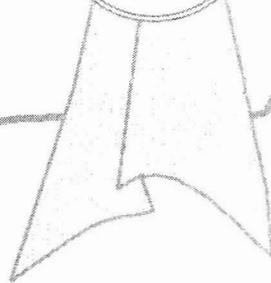
DEDICATORIA

*Con especial cariño,
respeto y admiración
a mis padres y a mi hermano:*

*Por creer en mi, por alentarme y por brindarme
las herramientas necesarias para seguir adelante
Mil gracias por todo su apoyo.*

*A mis amigas y amigos por estar conmigo, por dar y
demostrar la gran calidad humana que los caracteriza.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México y a
México.*



**EL TRABAJO FARMACOLÓGICO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO
DE MICROBIOLOGÍA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL
SUR (CIBIS) DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL EN
XOCHITEPEC, MORELOS BAJO LA DIRECCIÓN DE LA
M. EN C. MARIA GABRIELA ROJAS BRIBIESCA**

A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco sinceramente a la Dra. Helia Reyna Osuna Fernández, por su orientación, sus consejos, sus enseñanzas y por la calidad humana mostrada durante el desarrollo de esta tesis. Mil gracias.

A los sinodales: M en C. María Gabriela Rojas Bribiesca, Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco, Dr. Guillermo Laguna Hernández y al Dr. Armando Gómez Campos por su contribución y atención.

Al laboratorio de Microcine, en especial a la M.F.P. Ana Isabel Bieler Antolin, al M. en C. Alejandro Martínez Mena y al B. José Antonio Hernández Gómez por su dedicación y creatividad en la toma de fotografías lo cual permitió la ilustración fotográfica de la tesis.

Al laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias, en especial a la M. en C. Silvia Espinosa Matías y al M. en C. Alejandro Martínez Mena por su trabajo en la toma de fotografías.

Al Dr. Calixto Gómez de la Xiloteca del Instituto de Biología, por la asesoría técnica, por las observaciones hechas para el presente trabajo y por la gran calidad humana que lo caracteriza.

A la M. en C. Aurora Zlotnik, por la asesoría técnica y bibliográfica la cual me permitió obtener mejores resultados, pero sobre todo por la cordialidad, pasión y entrega de una profesora única.

Al Dr. Víctor Navarro por las facilidades y su apoyo en el estudio farmacológico.

Al Dr. Adolfo Espejo y Ana López-Ferrari, por la identificación de la especie y por permitirme la consulta, así como de su ayuda siempre amable.

Al M en C. Margarita Ponce y a la Dra. Guillermina Munguía por ampliarme el panorama biológico y en especial por ofrecerme su ayuda profesional y humana.

Al Dr. Flores por su ayuda siempre oportuna y valiosa.

A la M. en C. Araceli Gutiérrez y la M. en C. Esthela Sandoval, por brindarme su ayuda.

A las chicas del Laboratorio de Xochitepec: Alma, Elizabeth, Alba y en especial a Paty Álvarez Fitz por su ayuda técnica y profesional en la parte farmacológica.

A Judith, a Paty, a Yoscelina y a Oyuki, por haberme acompañado en este apasionante camino. Gracias por saber escuchar y alentar, pero sobre todo por ser realmente unas Amigas de verdad.

A Carolina, una bromeliologa ejemplar, por compartirme información y ayudarme.

A Norma Castillo, Margarita Ferruzca, Mónica Pérez, Julio Laurrabaquio y a Jorge Escutia por la ayuda otorgada.

A mi familia, por los apoyos otorgados, por sus contribuciones y sugerencias.

A todas las personas que de alguna u otra forma contribuyeron hacer este sueño posible.

A mi familia

de Laboratorio:

Yoscelina, Oyuki, Norma,

Margarita Ferruzca, Mónica, Eddy,

Alejandra, Fabiola, Odeth, Dulce,

Karina, Margarita Ponce, Guille, Edith, Lluvia,

Ela, Edgardo, Paty Zendejas, Jesús, Ricardo, Florencia,

Gaby, Miguel, Ulises, Lulú, Rosy, Diana, Silvia, Alma

y Aurelio por brindarme fabulosos momentos durante

mi estancia y darle soporte a la realización de esta tesis.

A los biólogos:

Ana, Claudia, Carolina, Eduardo, Eddy, Gaby, Iriliana,

Israel, Ixchel, Jorge, Julio, Judith, Lizeth, Lino, Laura, Mariana, Miriam

Oyuki, Paty,

Rocío, Roxana,

Verónica,

Yoscelina.

Muchas gracias por compartir grandes momentos en la carrera

El futuro tiene muchos nombres.
Para los débiles es inalcanzable
Para los temerosos, lo desconocido.
Para los valientes es la oportunidad.

Victor Hugo.

Í N D I C E

| | Pag. |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. RESUMEN | 3 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 3. ANTECEDENTES | 7 |
| Familia Bromeliaceae | 7 |
| Morfología de las bromeliáceas | 8 |
| Anatomía de la familia Bromeliaceae | 9 |
| Estudios fitoquímicos de las bromeliáceas | 10 |
| Tillandsia | 10 |
| Descripción de la especie <i>Tillandsia imperialis</i> C.J. Morren ex Roehl | 11 |
| ☞ Distribución | 14 |
| ☞ Nombres comunes | 14 |
| Usos de la especie | 15 |
| Enfermedades respiratorias | 16 |
| ☞ Tos en la medicina tradicional | 16 |
| ☞ Situación mundial | 16 |
| ☞ Infecciones más frecuentes | 16 |
| Farmacognosia | 17 |
| 4. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS | 19 |
| 5. MÉTODO | 20 |
| I. Colecta | 20 |
| II. Procesamiento del Material | 20 |
| A. Caracterización morfológica y /o macroscópica | 20 |
| i. Color y patrón de los pigmentos de hoja y bráctea | 20 |
| ii. Sabor y Olor | 21 |
| iii. Superficie | 21 |
| B. Caracterización microscópica | 21 |
| i. Anatomía foliar | 21 |
| ii. Morfología palinológica | 24 |
| C. Morfometría foliar | 24 |
| i. Área foliar | 24 |
| ii. Densidad de estomas y tricomas | 25 |
| iii. Longitud estomática y tricomática | 25 |
| iv. Grosor epidérmico apical en las caras abaxial y adaxial | 25 |

| | Pag. |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| v. Longitud del tallo tricomático en la parte basal..... | 26 |
| D. Estudio farmacológico | 28 |
| i. Evaluación microbiológica..... | 28 |
| 6. RESULTADOS | 31 |
| A. Caracterización morfológica y /o macroscópica..... | 31 |
| i. Color y patrón de los pigmentos de hoja y bráctea | 31 |
| ii. Sabor y Olor..... | 33 |
| iii. Superficie..... | 33 |
| B. Caracterización microscópica..... | 34 |
| i. Anatomía foliar | 34 |
| ☞ Epidermis | 34 |
| ☞ Estomas y cámara estomática..... | 38 |
| ☞ Tricomas | 42 |
| ☞ Hipodermis | 43 |
| ☞ Haces vasculares | 47 |
| ☞ Parénquima | 50 |
| ii. Morfología palinológica..... | 53 |
| C. Morfometría foliar | 55 |
| i. Área foliar | 55 |
| ii. Densidad de estomas y tricomas | 55 |
| iii. Longitud estomática y tricomática..... | 56 |
| iv. Grosor epidérmico apical en las caras abaxial y adaxial..... | 56 |
| v. Longitud del tallo tricomático en la parte basal | 56 |
| D. Estudio farmacológico | 59 |
| i. Evaluación microbiológica..... | 59 |
| 7. DISCUSIONES | 61 |
| 8. CONCLUSIONES | 66 |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 67 |

1. RESUMEN

Vite-Posadas, J.A. 2005. Caracterización anatómica y farmacológica de *Tillandsia imperialis* C. J. Morren ex Roetzl (Bromeliaceae).

La lista de plantas usadas por la medicina tradicional mexicana para curar ciertas enfermedades es muy diversa. Entre las familias botánicas con más especies reportadas con usos medicinales se encuentran: las Asteraceae, Fabaceae y Euphorbiaceae. Existen otros taxa en los que el conocimiento medicinal es reducido como ocurre con la familia Bromeliaceae. *Tillandsia imperialis*, se usa junto con otras plantas y animales para curar ciertas afecciones respiratorias. No obstante, los únicos trabajos realizados para esta especie son los referentes con aspectos taxonómicos. Para definir la identidad correcta y la actividad biológica de la planta, en el presente trabajo se realizaron un estudio anatómico y uno farmacológico.

Los resultados anatómicos e histoquímicos aportaron información útil para la correcta determinación taxonómica y farmacognóstica de la especie. Esta bromelia contiene antocianinas, taninos condensados, granos de almidón y cuerpos silíceos. El arreglo de los tricomas peltados fue de acuerdo a lo descrito para otras bromelias tipo tanque. Sin embargo, la información morfométrica reveló diferencias significativas en la densidad estomática y tricomática a lo largo de la cobertura foliar, así como en el grosor epidérmico y en la longitud del tallo tricomático. El análisis palinológico mostró un polen monosulcado y tectado. La unión de todas estas características constituyen atributos anatómicos esenciales para la caracterización de la especie en forma completa o parcial.

El estudio farmacológico reveló actividad antibacterial en cinco de los seis extractos evaluados. La inhibición de las bacterias Gram (–): *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi* fue con el extracto metanólico foliar a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 8mg/ml. *Streptococcus faecalis* fue inhibida por el extracto hexánico de la inflorescencia (CMI 8mg/ml). *Staphylococcus aureus*, bacteria Gram (+) fue inhibida por tres extractos: el hexánico foliar (CMI 4mg/ml); el hexánico y diclorometánico de la inflorescencia (CMI 0.5 mg/ml). Éstos dos últimos extractos presentaron la CMI más baja registrada en este estudio. Ninguno mostró actividad antimicrobiana para *Candida albicans* y *Escherichia coli*. Se evaluaron dos cepas de *S. aureus* aislados de pacientes en la clínica, teniendo el extracto hexánico de la inflorescencia actividad sobre una de ellas (CMI 8 mg/ml).

El hecho de que los extractos de hexano y diclorometánico de inflorescencia hayan tenido una fuerte acción inhibitoria sobre la cepa de *S. aureus* y el hexano de la inflorescencia sobre la cepa aislada clínica *S. aureus* AHD, especie virulenta y agente causal de enfermedades respiratorias, valida el uso específico etnobotánico señalado por la medicina tradicional mexicana. Así la planta constituye una posible alternativa terapéutica frente a las enfermedades respiratorias; en especial las causadas por *S. aureus*, bacteria que posee cepas resistentes a ciertos fármacos.

2. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la medicina tradicional (MT) como prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y minerales, terapias espirituales, técnicas y ejercicios para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades (OMS, 2002). La medicina tradicional representa una opción importante de respuesta ante las necesidades de atención de salud en diferentes países de América Latina y el Caribe. Esta participación ha sido reconocida por la OMS y por otras organizaciones internacionales (WHO, 1978; citado en Nigenda, *et al*, 2001). Las medicinas basadas en plantas y la acupuntura son las terapias más ampliamente utilizadas. Los informes de las investigaciones de su eficacia clínica se han publicado en prestigiosas revistas científicas (OMS, 2002).

Plantas Medicinales

La Herbolaria y la medicina tradicional poseen una amplia historia recorrida, antes de la llegada de los españoles los indígenas ya tenían conocimiento sobre el uso medicinal y terapéutico de varias plantas y animales; esto se puede constatar en los murales de Teotihuacán (uno de ellos conocido como “El mural de la medicina náhuatl”) y en los escritos del siglo XVI como es “*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*” (Chino y Jácquez, 1986). El conocimiento de la medicina tradicional indígena ha llegado a nuestros días por medio de las costumbres, así como por los legados bibliográficos de fray Bernardino de Sahagún, Martín de la Cruz y Juan Badiano, Francisco Bravo, Francisco Hernández y por las descripciones geográficas de los jesuitas, solo por mencionar algunos (Barba de Piña, 2002). La medicina tradicional en la República Mexicana como en muchos otros países, juega un papel importante en la práctica médica pues es la primera alternativa en el cuidado de la salud (McGaw *et al*, 2000); ésta se percibe y recrea en la sociedad mexicana y con mayor fuerza en las comunidades indígenas actuales, donde constituye el primer nivel de atención de salud (Guie-Natividad *et al*, 1999). De aquí que más de 15 millones de mexicanos consulten curanderos (Baytelman, 1993 citado en García, 2002). Según Argueta *et al*, (1994) la medicina occidental en México ocupa el 40% de los servicios médicos y el 25% de la población, aproximadamente 25 millones de personas, aún dependen del uso de plantas

medicinales. En contraste, reportes más actualizados señalan a 40 millones de usuarios de la herbolaria (Viesca, 1997 citado en García, 2002).

En México se entrelazan y combinan diferentes culturas, dando como resultado una visión singular del mundo de acuerdo al grado de dominio de la naturaleza (García, 2002). Esto hace que la lista de especies vegetales mencionadas por las culturas indígenas para curar ciertas afecciones, dolores, malestares e incluso enfermedades sea muy diversa. Las plantas empleadas abarcan especies desde el género *Abies* hasta *Ziziphus*, e incluyen tanto plantas vasculares como las pteridofitas; así como también a las gimnospermas y angiospermas.

La riqueza florística ha ido disminuyendo debido a la explotación y destrucción de ecosistemas, con lo cual aumenta el empobrecimiento sobre los conocimientos tradicionales; además la información sobre el conocimiento medicinal se encuentra disperso en diversas publicaciones, muchas de las cuales su circulación y divulgación es restringida o poco conocida. Asimismo, existen muchas familias taxonómicas donde el conocimiento sobre el uso medicinal no ha sido reportado o incluso la información es escasa como ocurre con la familia Bromeliaceae; en cambio los estudios anatómicos realizados sobre esta familia son diversos (Tomlinson, 1969; Flores, 1971; Beutelspacher, 1971; Benzing, 1976; Benzing *et al.*, 1978; Gardner, 1982; Dahlgren *et al.*, 1985; Arambarri y Mandrile, 1999; Pierce *et al.*, 2001; Proença y Sajo, 2004; Prychid *et al.*, 2004). Las principales líneas de investigación abarcan interesantes aspectos relacionados con la morfología y ultraestructura de los tricomas, unos aplican los caracteres epidérmicos a la sistemática de algún taxa y otros más hacen mención de la anatomía ecofisiológica (Martin *et al.*, 1985). No obstante, pocos estudios se centran en establecer relaciones sobre aspectos anatómicos-farmacológicos de plantas medicinales (Arambarri y Mandrile, 1999), contribuyendo a su identificación y control de calidad.

Los lineamientos relacionados con el control de calidad no sólo son necesarios para esta especie sino para cualquier planta medicinal; pues aseguran la autenticidad de las plantas utilizadas, haciendo énfasis en su identidad y pureza. Un requisito necesario debido a que la demanda creciente y el comercio progresivo de estas plantas plantea implicaciones sanitarias; sobre todo efectos negativos para la salud por el uso inadecuado de las plantas curativas.

En síntesis, podemos decir que a pesar de la amplia gama de trabajos realizados sobre las bromelias, la divulgación de éstos es restringida y en ciertos grupos biológicos la información existente es fragmentada y poco explotada. Tal es el caso de *Tillandsia imperialis*, una bromelia mesofítica de la cual no existen registros ni de anatomía foliar ni de la morfología polínica y mucho menos relacionada a la etnofarmacología; por tal motivo es de interés realizar estudios multidisciplinarios a nivel anatómico, histoquímico, fitoquímico y farmacológico para lograr un conocimiento integral y un mejor manejo del recurso. El conocer las posibles estructuras secretoras de algún compuesto o metabolito secundario, el tipo y distribución morfológica—histológica del material ergástico, así como ensayos biológicos que demuestren o validen en esta planta la actividad biológica para enfermedades respiratorias reportadas por la etnobotánica, fueron las principales líneas de investigación realizadas en el presente estudio.

3. ANTECEDENTES

Familia Bromeliaceae

La familia Bromeliaceae esta compuesta por 61 géneros y más de 2700 especies; los miembros son generalmente conspicuos y fácilmente distinguibles de otras monocotiledóneas por sus tricomas absorbentes (escamas) y por el arreglo de roseta de sus hojas (Espejo y López-Ferrari, 1998, 1999). La familia es endémica de América con excepción de *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr, nativa del oeste de África. Este taxa posee una distribución tropical y subtropical, principalmente de Centro y Sudamérica (Espejo y López-Ferrari, 1998); en América las encontramos distribuidas desde el estado de Virginia en los Estados Unidos a Brasil o Argentina (Smith y Downs, 1974, 1977, 1979; Padilla, 1986, Benzing, 2000). La familia se divide en tres subfamilias bien definidas taxonómicamente. Existen algunas diferencias en cuanto a su forma de crecimiento, Pitcairnioideae es generalmente terrestre, mientras las Tillandsioideae son generalmente epífitas y las Bromelioideae presentan ambas formas biológicas (Dahlgren *et al*, 1985).

México tiene el segundo lugar de riqueza florística en el continente americano y de las monocotiledóneas mexicanas, la familia Bromeliaceae es el cuarto lugar en número de especies después de Poaceae, Orchidaceae y Cyperaceae (Espejo y López-Ferrari, 1998, 1999). Las epífitas son elementos característicos de las comunidades vegetales en México, las bromeliáceas ocupan el tercer lugar en diversidad de especies de epífitas vasculares en el territorio mexicano; en primer y segundo lugar se encuentran las orquidáceas y las pteridofitas (Aguirre-León, 1992). Las bromelias son un componente ecológico importante en los hábitats naturales mexicanos, este taxa tiene una preferencia por los bosques de coníferas y encinos. Además, hay un componente importante de la familia en los bosques mesófilos y selvas tropicales perennifolias. La riqueza más grande de la bromelioflora se encuentra en los bosques mesófilos, pues a pesar de cubrir solo entre 0.5-1 % del territorio contiene el 25.6% del taxa (Espejo y López-Ferrari, 1999).

Existen registrados 23 géneros bromeliáceos para México, éstos incluyen 328 especies y 27 variedades o subespecies, o 355 taxa representando el 12% del total mundial (Espejo y López-Ferrari, 1994, 1999). La subfamilia mejor representada es la Bromelioideae con 13 de

los 37 géneros, le sigue la subfamilia Tillandsioideae con 6 de los 7 géneros y finalmente Pitcairnioideae, con 4 de los 17 géneros. Sin embargo, la subfamilia Tillandsioideae es la más grande en número de especies, con unas 207, pero Pitcairnioideae posee el más alto porcentaje de endemismo a nivel de especies (81.4 %). México presenta diferentes niveles de endemismo, a nivel de género se halla *Ursulea*, a nivel de especie podemos indicar que el 91.5% de los representantes del género *Hechtia*, distribuidos en nuestro país son endémicos. Los estados con mayor número de especies son Oaxaca, Chiapas, Veracruz, Guerrero y Jalisco y los estados con mayor número de especies endémicas son Oaxaca, Guerrero y Chiapas (Espejo y López-Ferrari, 1998).

Morfología de las bromeliáceas

Las bromelias presentan características morfológicas básicas tanto a nivel vegetativo como reproductivo, para un mejor entendimiento de la información presentada en este trabajo, se definen algunos de los términos más empleados basados en obras relacionadas a la familia

- Lámina foliar:** Porción superior de la hoja que se expande de la vaina, generalmente es más angosta comparada con la vaina; forma parte de las hojas y de las brácteas de las bromeliáceas.
- Vaina:** Estructura foliar que envuelve la porción basal del tallo, esta porción está unida al eje de crecimiento, generalmente ensanchada; forma parte de una hoja o una bráctea en las bromeliáceas
- Bráctea floral:** Hojas adyacentes a los sépalos de las flores las cuales pueden presentar colores brillantes. Existen dos tipos, las dísticas distribuidas en un solo plano; y las polísticas distribuidas en varios planos.
- Bráctea primaria:** Hojas modificadas, que nacen del eje principal de la inflorescencia y se encuentran en la base de las ramas o ejes secundarios, pueden ser de color verde o de otro color.
- Inflorescencia:** Parte de la planta que posee o contiene las flores. Según la posición se conocen como erectas y péndulas. Y del lugar donde emergen las flores se clasifican en tres: simples (flores emergen directamente del eje principal),

compuestas (nacen de ejes secundarios) y aglomeradas (asemejan un globo o balón achatado).

Espiga: Tipo de inflorescencia sin pedúnculo o con un pedúnculo corto en donde nacen las flores sobre un tallo floral no ramificado.

(Huidobro, 1988; Flores, 1998; Longley, 1996; Morales *et al.*, 1999).

Anatomía de la familia Bromeliaceae

Las investigaciones anatómicas de esta familia han sido ampliamente dominados por estudios enfocados a los apéndices epidérmicos o tricomas, por lo general denominados como escamas, estructuras peltadas o escamas tricomas. El énfasis de los trabajos científicos en esta estructura se ha debido a que el tricoma bromeliáceo es morfológicamente y fisiológicamente el más interesante y peculiar entre las monocotiledóneas (Gardner, 1982). Además, es un carácter anatómicamente distintivo de la familia, cada uno formado por un tallo uniseriado inmerso en la epidermis y un escudo distal expandido sobre ésta. Las escamas menos especializadas, por lo general se restringen a las epidermis gruesas y son escamas desorganizadas casi siempre en forma de embudo, mientras el escudo de las escamas más especializadas se diferencian en células interiores del disco y células marginales, alas o células aladas (Tomlinson, 1969). La ontogenia de caracteres epidérmicos como los tricomas y estomas han sido abordados en trabajos anteriores (Billings, 1904; Krauss, 1948).

Los estomas son restringidos a la cara abaxial de la hoja (Adams III y Martin, 1986; Evans y Brown, 1989) y la epidermis vista superficialmente presenta paredes sinuosas, sus paredes internas son más gruesas que las externas. La hipodermis se diferencia en un tejido esclerotizado o en un tejido de almacenamiento de agua (Tomlinson, 1969), los pigmentos antocianínicos han sido reportados en células hipodérmicas donde se observan contenidos de tonos castaños; y en ocasiones se almacenan cuerpos sílice, incluso los taninos de color amarillo opaco también se hallan en esta capa de células.

Estudios fitoquímicos en las bromeliáceas

La composición química de las bromelias ha sido foco de atención desde hace tiempo (McLaughlin y Witheraup, 1995), por ejemplo, los taxónomos se han interesado en las betainas para establecer relaciones filogenéticas (Adrian-Romero, 2001). Algunos otros estudios bioquímicos se han enfocado en caracterizar y separar las enzimas proteolíticas presentes en este tipo de plantas (como por ejemplo la bromelina), dichas enzimas poseen interés en el ámbito médico, farmacéutico e industrial. (Córdoba *et al*, 2000). En cambio, las investigaciones químicas mexicanas durante años dirigieron sus estudios sobre varias especies del género *Bromelia*, como son: *Bromelia hemisphaerica*, *B. karatas*, *B. palmieri* y *B. silvestris* (Castañeda *et al*, 1974; Córdoba *et al*, 2000), *Bromelia pinguin* (Camacho-Hernández *et al*, 2002); recientemente empezaron a realizarse trabajos científicos con especies del género *Tillandsia*, como lo demuestra el trabajo con *Tillandsia fasciculata* (Cantillo-Ciau *et al*, 2001) y en Brasil, *Tillandsia recurvata* (Vasconcelos *et al*, 2004). Metabolitos secundarios como triterpenos, esteroides, flavonoles y flavonas han sido aislados de las hojas de estas plantas; el patrón de flavonoides es similar al de la familia Commelinaceae. La más común antocianina es la cianidina y las proantocianidinas son ausentes (Tomlinson, 1969; Smith, *et al*, 1998; Benzing, 2000). En la mayoría de las investigaciones los componentes fitoquímicos aislados son los flavonoides y de este grupo de metabolitos secundarios destacan las antocianinas.

Tillandsia

Es el género más grande de la bromelioflora e incluye aproximadamente 518 especies distribuidas en la América tropical y de temperatura cálida (Benzing, 2000). Espejo y López-Ferrari,(1998) señalan que el número de especies reportado para México ha variado en el transcurso del tiempo; así en un inicio Till reportó 167, Kniff indicó 148, y García-Franco dio un número de 189, en cambio, Espejo y López-Ferrari, registraron 175 especies de las cuáles 111 son endémicas para el país. Sin embargo, Villaseñor (2004) lo reporta como el sexto género con mayor número de especies para México (188 spp).

Tillandsia está distribuido en casi todos los tipos de vegetación, pero es más abundante en los bosques tropicales caducifolios y bosques de pino-encino. Son casi exclusivamente

epifíticos y se desarrollan desde el nivel de mar hasta arriba de los 3000 m.s.n.m. Hay algunos grupos de especies en este género con problemas de delimitación taxonómica y de una necesaria revisión. El género ha tenido una historia taxonómica inestable (Huidobro, 1988), ésta ha variado según el taxónomo. Gardner, en su *Systematic study of Tillandsia subgenus Tillandsia* (1982) sugiere una reclasificación por medio de estudios más detallados a partir de material vivo, y en efecto, el género *Tillandsia* ofrece un amplio problema taxonómico; a razón de la notoria variación de caracteres en los ejemplares colectados como son el color de las flores, inflorescencias, la textura de las hojas, diferencias en el tamaño de las brácteas primarias, densidad de escamas foliares, además, esta variación parece ser favorecida por la diversidad climática, fisiográfica y de la vegetación (Huidobro, 1988).

Descripción general de la especie *Tillandsia imperialis* C. J. Morren ex Roezl

Tillandsia imperialis C. J. Morren ex Roezl. Deutsche. Gärtn.-Zeitung 118,1881.

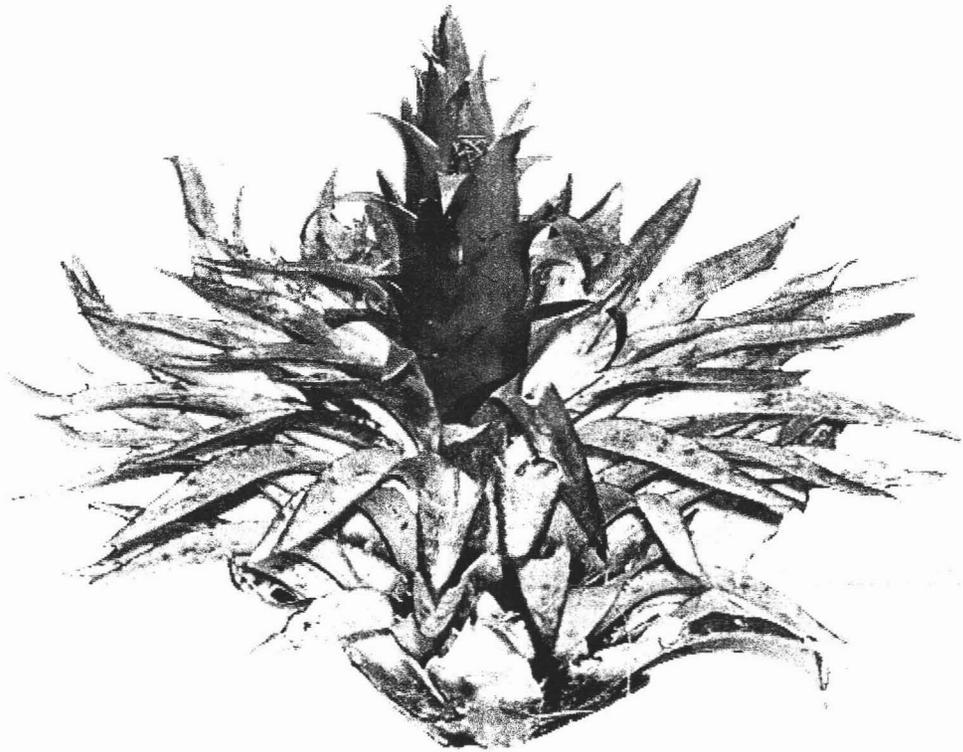
Epífita hasta 50 centímetros (cm) al florecer, acaules. **Roseta** densa de hojas verde claro, **Hojas** densamente arrosetadas, 30–45 cm. **Vainas** distintas, ovales de 5–6 cm de ancho, y de 10–15 cm de largo, y 7–8 de ancho, pálidas, ocasionalmente matizadas de púrpura cerca de la transición entre la lámina y vaina, moderadamente adpreso pardo lepidotas. **Láminas** de 3–5 cm de ancho, lisas, esparcido lepidotas con escamas pardas centralmente, liguladas, acuminadas o atenuadas, de color verde claro, poco manchadas de violáceo. **Pedúnculo** erecto, grueso, firme, 15–18 cm. **Brácteas del pedúnculo** cercanamente imbricadas, foliáceas con láminas elongadas, las porciones apicales casi siempre rojizas, pasando gradualmente a brácteas primarias. **Inflorescencia** cilíndrica terminal 13–20 cm y 10 cm de diámetro, pinnado compuesta. **Brácteas primarias** mucho más largas que las espigas, erectas, imbricadas, foliáceas, ampliamente ovadas con alargamiento, estrechamente triangular y de color rojizo. **Espigas** de 4.5–6 cm, erectas, subsésiles, elípticas, con (1–)2–4 flores. **Brácteas florales** de 3.5–4.2 cm, más largas, raramente casi tan largos como los sépalos, imbricadas, erectas, carinadas, lisas a ligeramente nervadas, glabras, subcoriáceas, lisas a ligeramente nervadas. **Flores** zigomórficas, tubulares, erectas, de 63 mm de longitud, con pedicelo hasta 1 mm. **Sépalos** de 3–3.4 cm, lisas, carinadas o engrosadas centralmente,

subcoriáceas a coriáceas, sublanceolados, obtusos, submembranosos, glabras, libres o breviconnatas. **Pétalos** lineares, corola tubular actinomórfica ascendente, de 6 –7. 2 cm de largo, morados, azulados o purpúreos. **Estambres** exsertos. **Anteras** sub-basifijas, erectas. **Filamentos** blancos y de igual longitud. **Pistilo** exserto y **estilo** blancos. **Estigma** morado. **Cápsula** elipsoideae, aguda, de 4 cm de largo. **Número cromosómico** 25 n. (Matuda, 1956; Matuda, 1979; Gardner, 1982, 1986a, 1986b; Padilla, 1986; McVaugh, 1989; Brown y Gilmartin, 1989; Davidse *et al*, 1994; Luther *et al*, 1994). [*Descripción compilada*].

Hiertz *et al*, (1994) describe a la epífita como una planta formadora de tanques grandes. Las hojas llegan a medir mas de cuarenta centímetros de largo, las hojas superiores a menudo son moradas o rojas. Eje floral recto, mas corto que las hojas, rígido con sus brácteas foliáceas de aproximadamente 5 cm, las brácteas cubren las espigas casi completamente, espigas elípticas aproximadamente seis centímetros de largo (**Fig. 1 y 2**). Si bien estos autores señalan la época de floración desde el mes de agosto al mes de enero y durante mayo, Padilla (1986) sólo la indica en primavera y otoño; en cambio otros autores como Gardner (1982) la delimitan únicamente entre los meses de diciembre y febrero. Mientras Chazaro (1987), la menciona de diciembre a marzo o incluso a abril (Chazaro,1988). Granados (2005), en cambio reporta la floración para el estado de Oaxaca entre los meses de abril a julio.

Las flores abren desde las primeras horas de la mañana al mediodía, el néctar es secretado de la base del estilo y un líquido viscoso es exudado entre las flores y a lo ancho; el polen tiene una viabilidad de un 98.5% y en cuanto a los polinizadores sólo se han observaron abejas en plantas cultivadas y no en su medio natural (Gardner, 1982, 1986a, 1986b). Puede producir híbridos con *Tillandsia deppeana* (Espejo *comp. pers*). En su ambiente natural se observan masas de semillas apiladas cerca de la cápsula y en el interior de la roseta. Antes de que la planta progenitora este madura se producen hijuelos cerca de la base de la roseta, sin embargo los coleccionistas mencionan su dificultad para cultivarla (Werner, 1979).

A



B

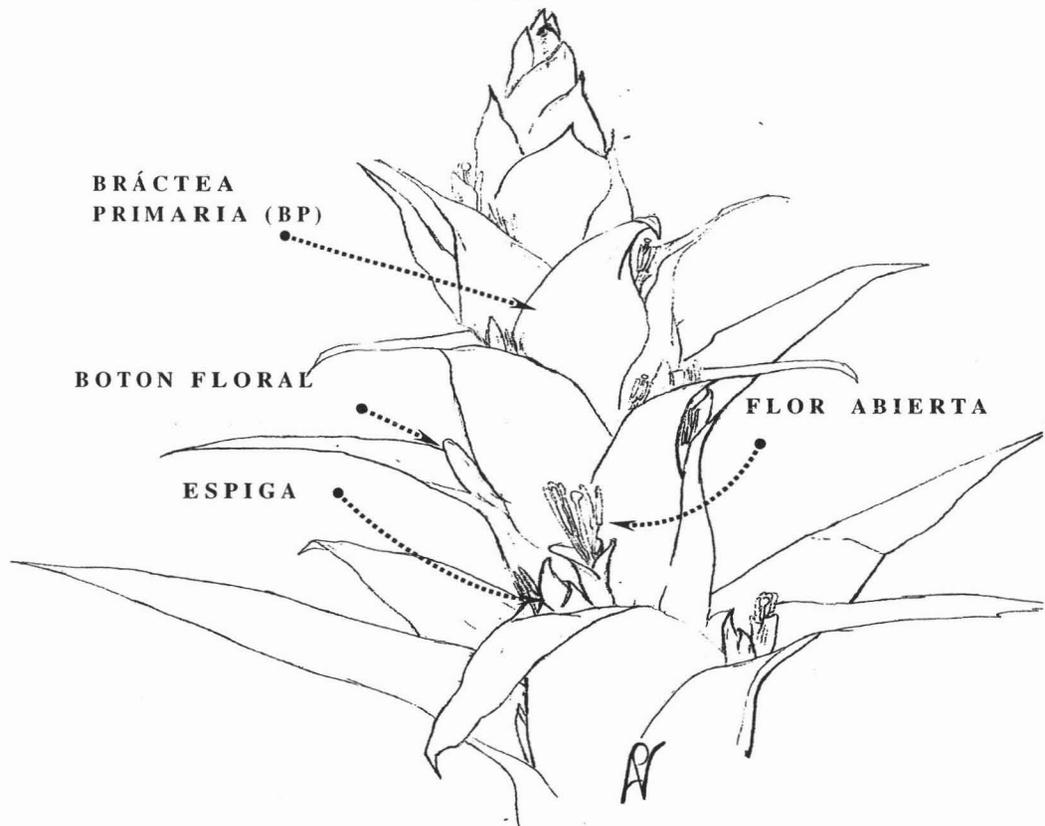


Fig. 1 A) Fotografía de *Tillandsia imperilis* [Cortesía de Frias y Vite].
B) Ilustración de las partes de la inflorescencia de esta especie.

Distribución

Tillandsia imperialis proviene de ambientes mesofíticos, habita bosques templados subhúmedos y húmedos, principalmente los bosques mesófilos, también se distribuye en algunos bosques caducifolios. Se desarrolla en lo alto de los árboles y es epífita de *Quercus*, *Pinus* y *Fagus*. Se ubica principalmente en la Sierra Madre Oriental. El límite inferior de *Tillandsia imperialis* es cerca de los 1800 m.s.n.m. es común a los 2000 m.s.n.m. Y desaparece al iniciar los 2400 m.s.n.m. (Werner, 1979). Sin embargo, en algunas colectas se le ha localizado a 2900 o 3000 m.s.n.m. (Richter, 1965; Hiertz y Hiertz-Seifort, 1994).

Su distribución ha sido registrada en los estados de Querétaro, Hidalgo, Puebla, Oaxaca y Veracruz. Sin embargo, Martínez (1979) menciona al estado de Chiapas y García-Franco (1987) indica a Nuevo León y Jalisco. No obstante no existen otros registros para estos lugares y se piensa que la especie señalada para Chiapas corresponde *T. ponderosa*. Esta información concuerda con la revisión de los ejemplares de herbario colectados para *T. imperialis* depositados en los herbarios MEXU, IZTA, UAM-IZ, ENCB, CHAP, IMSSM, en donde se señala su distribución para los estados de Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro y Veracruz, pero no para los estados de Chiapas, Jalisco y Nuevo León (J.A.Vite-Posadas *com. pers.*). Otros taxónomos la han reportado en países de Centroamérica como son Salvador y Honduras. Esta epífita comparte su distribución junto con otras bromelias muy semejantes, dichas especies son *T. ponderosa* y *T. yunckeri* (Smith *et al*, 1977; Werner, 1979; Martínez, 1979, Matuda, 1979; Benzing, 1980; Padilla, 1986; Mc Vaugh, 1989; Espejo y López-Ferrari, 1994, Granados, 2005).

Nombres comunes

- Suchil (Veracruz) Morren citado en Gardner, 1982;
- Xolotchín, (Veracruz) J.A.Vite-Posadas, *com. pers.*;
- Xoluchi (Veracruz) M. Ferruzca, y N. Castillo, *com. pers.*;
- Tencho (Puebla) Chino y Jácques, 1986;
- Tecolumate (San Cristóbal de las Casas, Chiapas) Martínez, 1979 (*).

* La distribución de *Tillandsia imperialis* no ha sido reportado por otros autores para este lugar, posiblemente la especie fue confundida con *T. ponderosa*

Usos de la especie

Durante la temporada decembrina en México (Richter, 1965) y parte de EUA se vende como planta de ornato. En el mercado de plantas, flores y frutos de Cuernavaca se venden principalmente durante los meses de diciembre y enero, el costo de un individuo puede ser desde \$25.00 M.N. pesos a \$200 M.N.; otros mercados ciudadanos la comercializan a \$8.00 M.N. (J.A.Vite-Posadas, *com. pers.*). En ocasiones, los comerciantes la venden durante la primavera y otoño (Padilla, 1986). En Oaxaca, el costo de un ejemplar llega a los \$3.00 M.N (Arellano, 2004) En los mercados de los estados de Oaxaca (Arellano, 2004) y Veracruz (Chazaro, 1987) son ofrecidas en venta, ocasionalmente entre las plantas de ornato y sobre todo durante la época navideña ya que pueden usarse para adornar nacimientos. Según Matuda (1979) las plantas comercializadas en el Estado de México provenían de los estados de Puebla y Veracruz. El empleo decorativo a nivel nacional e internacional y el uso ornamental intensivo durante la temporada navideña ha obligado a incluirla dentro de la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000, en la categoría de especie amenazada (SEMARNAT).

En las localidades de Coatepec y Teocelo (Hiertz y Hiertz-Seifort, 1994) y en ciertos lugares rurales (Chazaro, 1987) principalmente de la región de Xalapa-Coatepec, (A. Flores-Palacios, *com. pers.*) durante las festividades religiosas (santos patronos) se elaboran arreglos y marcos de madera de la misma altura y tamaño del portal de las iglesias; los marcos de madera son decorados con distintas especies de bromelias como son *Tillandsia imperialis*, *T. punctulata*, *T. deppeana*, *T. multicaulis*, *T. leiboldiana*, *T. viridiflora*. Para un solo marco se emplean cientos de bromelias en floración, las bromelias son utilizadas por el gran colorido de sus brácteas e inflorescencias y por que se marchitan lentamente (Hiertz y Hiertz-Seifort, 1994) Sin embargo, este uso masivo ha hecho de *T. imperialis* una especie rara y ha provocado su remplazo por otras especies de *Tillandsia*. Byrd (1992) alguna vez señaló: “ A *T. imperialis* se le usa por su brillante inflorescencia roja, pues asemeja una vela encendida la cual permanece centelleante durante algunos meses” Werner (1979) escribió: “es en verdad una vista imperial”. Y es cierto, la inflorescencia da un aspecto muy atractivo, debido a sus colores contrastantes, pero armoniosos; brácteas del escapo de color vino, brácteas primarias rojizas, pétalos violetas, estigmas morados y anteras amarillas (J.A. Vite-Posadas, *obs. pers.*).

Además, *Tillandsia imperialis* es una bromelia cuyo uso medicinal fue recientemente descrito en 1986, la planta es conocida con el nombre de “tencho” en la comunidad de Quimixtlán, Puebla. Sus pobladores emplean la parte aérea de ésta (hojas) para curar

enfermedades relacionadas con las vías respiratorias como la tos ferina y la tos. Para tratar la tos ferina se emplea un brebaje compuesto de hojas de tencho, jitomate y nogal, frutos de tomate, hojas y flores de gardenia, rosa blanca y tulipan. En cambio para el tratamiento de la tos, primero se raspa la concha del “tochil” o armadillo (*Dasypus novemcintus mexicanus*) y posteriormente se ponen a hervir hojas de tencho en un litro de agua junto con el polvo del “tochil” (Chino y Jáquez, 1986).

Enfermedades Respiratorias

La tos en la medicina tradicional

Para la medicina alópata la tos es una reacción defensiva del aparato respiratorio para expeler cuerpos extraños y microorganismos. La medicina tradicional considera que a pesar de ser un padecimiento benigno, requiere de atención pues se pueden originar enfermedades respiratorias, tales como la bronquitis, pulmonía; además, la tos puede constituir un signo de otras enfermedades, un ejemplo de ello es la gripe (Mata *et al*, 1994; Mellado *et al*, 1994). Las causas son variables dependiendo del tipo de enfermedad respiratoria (faringitis, laringitis, neumonía, tuberculosis), de la insuficiencia cardíaca o incluso de tic nervioso (Sosa, 1997).

Situación mundial

Varias publicaciones mencionan a las enfermedades respiratorias y diarreicas como las primeras causas de morbilidad y mortalidad en los países en vías de desarrollo (Solórzano-Santos y Miranda-Morales, 1998), más del 50% de las muertes infantiles son provocadas por estas infecciones (WHO, citado en Lévaro, 2000). En el 2002 las infecciones respiratorias agudas bajas fueron la sexta causa de mortalidad en mujeres mexicanas. Estados como Chiapas, Chihuahua, Estado de México, Puebla y Tlaxcala presentan las tasas más altas de mortalidad varonil (*Salud Pública Mex*, 2004).

Infecciones más frecuentes

Las afecciones de vías respiratorias superiores más frecuentes son la amigdalitis aguda y crónica; los agentes etiológicos causantes son *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pneumococcus* y *Diplococcus*. La laringitis es una inflamación ocasionada por bacterias como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Diplococcus* y *Hemophilus*. En la bronconeumonía los agentes biológicos son los *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pneumococcus*, *Proteus*, *Psuedomonas* y *Colibacilos* y cada vez se aprecia más la presencia de microorganismos

anaerobios (Lévaro, 2000). Los abscesos pulmonares son frecuentes en la neumonía, particularmente la causada por *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pneumococcus*.

El estreptococo B hemolítico grupo A o *Streptococcus pyogenes* es uno de los agentes causales de la faringitis, la frecuencia de esta enfermedad ocurre entre los cinco y quince años de edad. Una de sus complicaciones potenciales es la fiebre reumática, la cual afecta principalmente las articulaciones, el tejido celular subcutáneo y el corazón. La incidencia de fiebre reumática en países subdesarrollados llega a ser la causa de muerte por enfermedades cardíacas en personas menores de cuarenta y cinco años.

De entre las afecciones de vías superiores en donde se han presentado algún tipo de resistencia bacteriana se consideran las siguientes:

❏ Infecciones estafilocócicas:

El *Staphylococcus aureus*, coco gram positivo, puede ser sensible a las penicilinas de primera generación o bien resistente, obligando al uso de las penicilinas penicilinasas resistentes.

❏ Neumonía estafilocócica:

La neumonía o bronconeumonía estafilocócica, constituye muchas veces una grave complicación de la gripe, es producida generalmente por estafilococos resistentes a las penicilinas de primera generación, debiendo utilizarse las penicilinas penicilinasas resistentes como la meticilina sódica.

❏ Osteomielitis aguda:

En la osteomielitis aguda, infección producida generalmente por *Staphylococcus aureus* (80% de los casos) aunque a veces puede ser determinada por el *Streptococcus pyogenes* o el *Diplococcus pneumoniae*.

❏ La endocarditis subaguda bacteriana:

El *Staphylococcus aureus* se trata en la misma forma como la producida por el *Streptococcus viridians* o *faecalis*, según las normas descritas para las distintas susceptibilidades del germen son estafilococcus resistentes a la penicilina G. (Lévaro, 2000).

Farmacognosia

Aunque en el contexto científico es frecuente estudiar plantas a las cuales se les atribuyen propiedades medicinales, su estudio no es tan sencillo; para poder hacer una investigación completa y complementaria es necesaria la participación de diversos especialistas. Su estudio es un campo transdisciplinario el cual comprende el conocimiento que los grupos culturales

tienen, la interpretación del conocimiento etnobotánico, de taxónomos expertos en botánica, de estudios químicos para realizar el aislamiento y purificación de metabolitos secundarios y además, de la realización de trabajos farmacológicos (Estrada, 1992).

Una rama de la farmacología es la farmacognosia, su campo de investigación son las drogas (*) y sustancias medicamentosas de origen natural (Tyler *et al*, 1979; Bruneton, 1999; Kuklinski, 2000). Estudiar una planta, para la farmacognosia es definir su identidad estableciendo las características morfoanatómicas (como lo son las macroscópicas y las microscópicas), las organolépticas, las fisicoquímicas y las farmacodinámicas. Mediante la aplicación de la anatomía vegetal se logra la identificación y descripción de la droga (Tyler *et al*, 1979; Kuklinski, 2000).

Los ensayos botánicos de valoración microscópica, están dirigidos para controlar características histológicas y/o histoquímicas específicas, debido al uso múltiple empleado con las drogas (pulverizadas y no pulverizadas; ya sea enteras o fragmentadas). La clasificación adoptada por Trease y Evans, (1988) y Kuklinski (2000) para el estudio de características celulares se divide en dos grupos: estructuras celulares y contenidos celulares ergásticos. La identificación de las drogas vegetales es posible gracias a la existencia de algunos elementos celulares o de tejidos propios o característicos de cada droga; los cuales se determinan al estudiarlos al microscopio, pulverizado o micronizada (Kuklinski, 2000). Características como la forma, tamaño, estructura, distribución y su relación con las células epidérmicas, estomas y pelos epidérmicos; son estructuras celulares de importancia diagnóstica. De los contenidos celulares, los más importantes son aquellos identificables mediante el uso del microscopio o por medio de pruebas fisicoquímicas establecidas por la Organización Mundial de Salud (WHO, 1998; OMS, 2000) e incluidos en los lineamientos oficiales mexicanos (Secretaría de Salud, 2001). Estos contenidos comprenden proteínas, carbohidratos, grasas, glucósidos, taninos, alcaloides, flavonoides y cuerpos de sílice (Trease y Evans, 1988). Tanto la información estructural como el contenido químico permiten establecer parámetros cualitativos y cuantitativos que hacen de un fitofármaco (elaborado con material vegetal) un producto de calidad garantizando la autenticidad del mismo y la seguridad en la dosificación establecida.

* El termino droga, se refiere a la parte de la planta en donde se ha localizado y de donde se extrae el principio activo y no de una sustancia aislada como tal.

4. JUSTIFICACIÓN

Después de llevar a cabo una exhaustiva revisión bibliográfica, se encontró que la mayoría de los estudios relacionados con la especie *Tillandsia imperialis* han sido enfocados a la sistemática de la familia Bromeliaceae, pero ninguno enfocado a aspectos anatómicos, histoquímicos o etnofarmacológicos. Es por ello que surge la necesidad de hacer estudios multidisciplinarios los cuales complementen la información biológica para *Tillandsia imperialis*, una especie amenazada por la destrucción de su hábitat y con una fuerte presión humana por el saqueo y colecta intensiva. El estudio anatómico, histoquímico y morfométrico permite definir a la especie desde el punto de vista taxonómico como farmacognóstico y el trabajo farmacológico valida la información etnobotánica reportada por la Medicina Tradicional Mexicana.

4. OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL:

- ☞ Estudiar la anatomía, histoquímica y farmacología de *Tillandsia imperialis*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ☞ Identificar los caracteres estructurales foliares y palinológicos más significativos, contribuyendo a la delimitación taxonómica de la especie mediante la microscopía fotónica y el microscopio electrónico de barrido (MEB).
- ☞ Reconocer estructuralmente, los compuestos presentes en los tejidos vegetales de esta especie mediante técnicas histoquímicas.
- ☞ Aportar datos morfométricos como una fuente de información en la caracterización de la especie.
- ☞ Determinar la actividad biológica de los extractos obtenidos de hojas e inflorescencia mediante un análisis microbiológico.
- ☞ Corroborar el uso reportado por la medicina tradicional mexicana mediante el estudio farmacológico.

4. HIPOTESIS

Para curar ciertos padecimientos respiratorios ocasionados por microorganismos como las bacterias, la medicina tradicional emplea en un brebaje una serie de ingredientes biológicos, incluida *Tillandsia imperialis*; si dicha bromelia contribuye a reducir significativamente la infección posiblemente los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana presentes en esta planta serán capaces de inhibir el crecimiento microbiano, validando así el uso reportado por la etnobotánica.

5. MÉTODO

ESTUDIO ANATÓMICO Y MORFOMÉTRICO

I. Colecta:

El material manejado en este estudio procedió de plantas adultas compradas en la central de abastos, al oriente de la Ciudad de México, entre los meses de febrero y abril del 2003 y 2004; y provenientes del estado de Veracruz según la información proporcionada por los vendedores. El material fue identificado, confirmado y determinado por el especialista de la familia taxonómica, Adolfo Espejo. Un ejemplar fue depositado y registrado con el número de registro 55702 en el herbario de la UAM-Iztapalapa (UAMIZ).

II. Procesamiento del Material

Se tomaron fotografías del organismo completo como de las partes sexuales y de las vegetativas. Se retiraron hojas y brácteas de cinco individuos diferentes. El material fresco y fijado fue utilizado para los siguientes estudios:

- A. Caracterización morfológica;
- B. Caracterización microscópica;
- C. Morfometría foliar;

El material seco fue empleado para:

- D. Estudio farmacológico.

II. A. Caracterización Morfológica y /o Macroscópica.

II. A. i. Color y patrón de los pigmentos de hoja y bráctea.

Se observaron los colores presentes en muestras *in vivo* de hojas y brácteas de *Tillandsia imperialis*, se compararon y clasificaron con las tablas de la guía de colores estandarizados de Kornerup y Wanscher (1963) (*). Se examinó la distribución de los pigmentos de la hoja, tanto de la lámina como de la vaina y posteriormente se clasificó siguiendo la propuesta hecha por Benzings y Friedman (1981).

* La nomenclatura para cada color seleccionado fue escribiendo el número y letra establecida en las tablas coloridas dentro de un paréntesis.

II. A. ii. Sabor y Olor.

Se determinaron las propiedades organolépticas para hoja tanto *in vivo* como seca.

II. A. iii. Superficie.

Se observaron las características más significativas de la superficie foliar como la forma y textura. Se estimó la naturaleza foliar (hidrofilica o hidrofóbica), de acuerdo al método propuesto de Benzing *et al*, (1978).

II. B. Caracterización Microscópica

II. B. i. Anatomía foliar

Inclusión en paraplast

En el estudio anatómico se emplearon exclusivamente hojas y brácteas de plantas adultas en floración. De la bráctea y de la vaina foliar se realizaron observaciones principalmente de la región central-central (largo, ancho). La morfología foliar fue estudiada en tres áreas anatómicas: apical, media y basal (**Fig.2**). De todas las regiones analizadas se cortaron fragmentos de aproximadamente 5 mm² y se fijaron en FAA (formaldehído—ácido acético—etanol — agua) por un lapso mínimo de 24 hrs. Posteriormente se lavó con agua destilada haciendo cuatro cambios de media hora cada uno y se deshidrató con una serie gradual de etanol: 30%, 50%, 70%, 96% y 100%, de dos cambios por espacio de una hora cada uno. Después se preincluyó con concentraciones etanol-xilol 1:1, con cambios cada treinta minutos; xilol-paraplast 2:1 durante dos horas y xilol-paraplast 1:2 por doce horas. Finalmente las muestras se incluyeron en paraplast puro durante 48 horas. Los cortes se realizaron a 8 y 10 µm de grosor en un micrótopo de rotación *American Optical, modelo 820*.

Inclusión en polietilenglicol (PEG) peso molecular de 1500.

A partir del material preservado en FAA se tomaron muestras, las cuales se lavaron con agua destilada dejándolas en ésta durante dos horas. Las muestras se sumergieron en una solución acuosa de PEG al 20% durante 24 horas en la estufa. Posteriormente se infiltró en una solución de PEG al 100% durante 24 horas a 58 –60 °C. La inclusión se hizo con PEG 100%. Los bloques se colocaron en refrigeración y posteriormente se

obtuvieron cortes a 10-15 μm de grosor con el micrótomo de deslizamiento *LEICA*, modelo *Hn40*.

Preparaciones de material fresco

Se efectuaron cortes paraderrales y transversales a mano libre de hoja y bráctea, procedentes de material fresco.

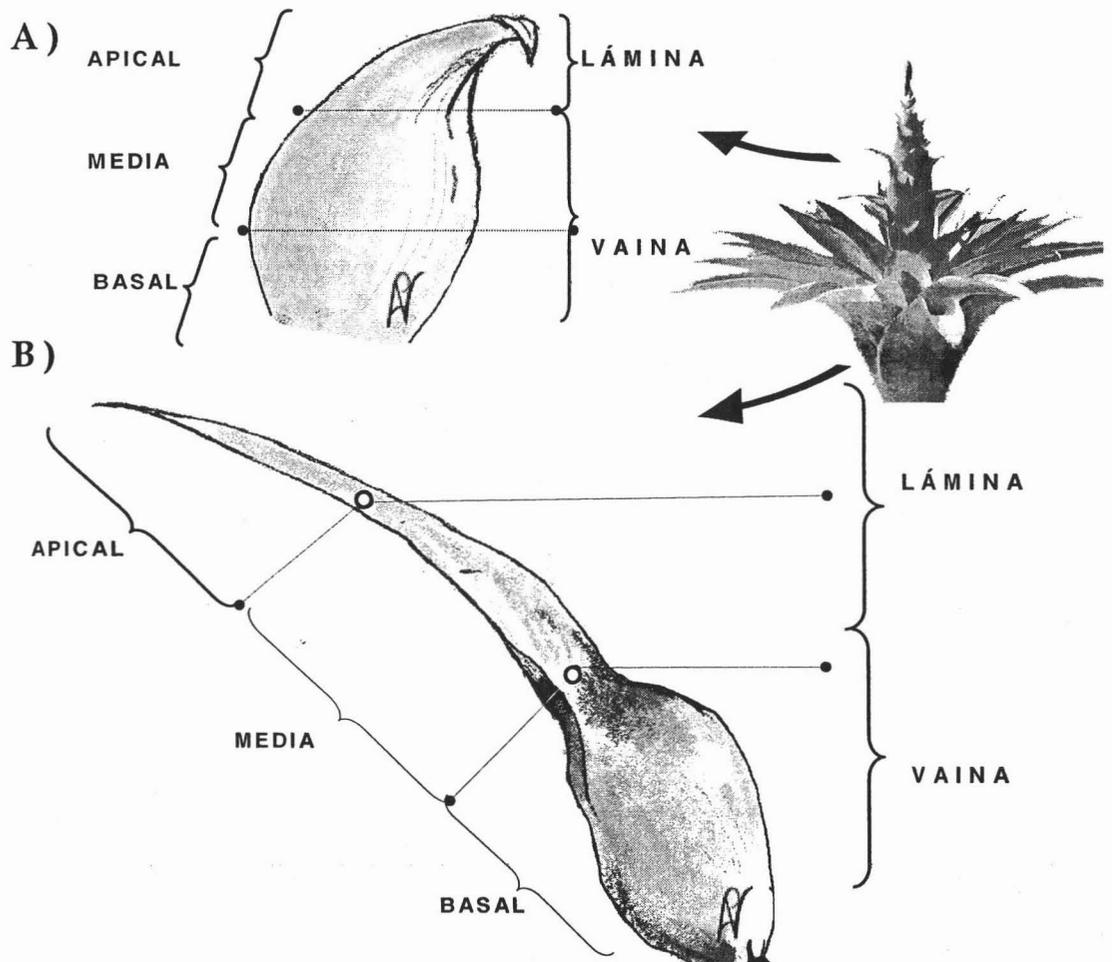


Fig. 2 Esquemas de equivalencias de las áreas anatómicas estudiadas para *Tillandsia imperialis* (apical, media y basal) con la morfología foliar bromeloide (lámina y vaina). A: Bráctea; B: Hoja.

Tinciones y pruebas histoquímicas

Para observar la estructura celular, los cortes de parafina y PEG se tiñieron con la técnica dicrómica safranina—verde rápido, azul toluidina y cuádruple de Johansen (Johansen, 1940). Al material procesado y al fresco se les aplicaron las siguientes

pruebas histoquímicas para la detección y localización de ciertos productos químicos en los diferentes tejidos:

- 1) Azul de anilina: tiñe de azul la celulosa y calosa;
- 2) Floroglucinol-HCl: Tiñe de rojo la lignina (Johansen, 1940);
- 3) Rojo de Rutenio: Tiñe de rosa a rojo las péctinas (Johansen 1940);
- 4) Cloruro férrico: Tiñe de negro-azulado o verde intenso los compuestos fenólicos (Johansen, 1940);
- 5) Vainillina-HCl: Tiñe de rojo ladrillo los taninos condensados (Engleman, *comp. pers.*);
- 6) Reactivo de lugol: tiñe de color morado intenso o azul el almidón (López-Curto *et al*, 1998);
- 7) Rojo O de aceite Tiñe de color rojo anaranjado la cutina, suberina y los lípidos insolubles (Engleman *comp. pers.*; Lopez-Curto *et al*, 1998);
- 8) Clorioduro de zinc: Tiñe de color azul la celulosa y hemicelulosa, y de amarillo o naranja la cutina y la suberina (Jensen, 1962);
- 9) Azul negro de naftol: tiñe de azul intenso las proteínas y de magenta los polisacáridos insolubles (López-Curto *et al*, 1998);
- 10) Acido peryódico-reactivo de Schiff (A.P.S.): Tiñe de color rosa o magenta intenso los polisacáridos insolubles (Engleman, *comp. pers.*);
- 11) Sudan III y Sudan IV: Tiñe de tonos naranjas y rojizos la suberina y los lípidos (Johansen, 1940).

Las observaciones de las laminillas se realizaron en un microscopio óptico Carl Zeiss a distintos aumentos. Se tomaron fotografías de las preparaciones por medio de un fotomicroscopio *Olympus Probis Ax70*.

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Se tomaron muestras foliares y se realizaron cortes paradermales y transversales gruesos a mano libre con navaja. Las muestras empleadas se deshidrataron en etanoles graduales hasta etanol absoluto. El material deshidratado se colocó en una rejilla y ésta se desecó a punto crítico en la desecadora *CPD-030 Baltek*. Las muestra se orientaron y montaron en cilindros portamuestras metálicos mediante una cinta conductiva de carbón de doble cara. Se llevó el cilindro a la cámara ionizadora *Denton Vacuum Desk II*, donde se sometieron a un baño fino de oro. Posteriormente se hicieron

observaciones y se tomaron fotografías en *placas TMAX-100* de 4x5 pulgadas en el microscopio electrónico de barrido (MEB) *JEOLJSM-5310LV*.

II. B. ii. Morfología palinológica.

Se colectaron anteras frescas de botones florales y de flores en antesis de *Tillandsia imperialis*. Se depositaron en tubos de ensayo y fueron sellados con parafilm, posterior a esto se siguió el método de acetólisis del grano de polen descrito por López-Curto *et al*, (1998). De las preparaciones se obtuvieron datos morfométricos y se realizó la descripción del polen con base en lo reportado por varios autores (Hoen, 2005; Ludlow *comp. pers*). Por otro lado se siguió el mismo procedimiento descrito para la observación al MEB del tejido foliar.

II. C. Morfometría Foliar

II. C. i. Área foliar

Se siguió el método propuesto por Ortega y García, (1986), el cuál consiste en realizar la copia o la impresión foliar sobre papel milimétrico, cortar la silueta dibujada y a continuación se usa el método gravimétrico. Éste consiste en comparar el peso de un área conocida del mismo papel con el peso de la silueta foliar. En este caso se cortó y pesó un cuadrado de 9 cm², de la misma forma se peso el área de la hoja seleccionada.

Para el método gravimétrico se aplicó la siguiente fórmula: $A= 9 [p2/ p1]$

Donde

A = área foliar.

9 = área en cm² del cuadrado utilizado.

p1 = peso del cuadrado de área conocida.

p2 = peso del papel en el cual se imprimió la hoja.

II. C. ii. Densidad de estomas y tricomas

Preparación de las impresiones epidérmicas.

Se desprendieron dos hojas maduras por cada uno de los tres individuos. A las superficies epidérmicas (adaxial y abaxial) de las áreas anatómicas: apical, media y basal, se les aplicó una capa de barniz. Se dejó secar y después de unos minutos se retiraron las películas barnizadas, obteniéndose así una suma de seis réplicas epidérmicas por cada hoja empleada; subsecuentemente éstas fueron montadas en portaobjetos. Por cada impresión epidérmica (apical-abaxial, apical- adaxial, media-abaxial, media-adaxial, basal-abaxial y basal-adaxial) se evaluaron cinco campos visuales con un total de treinta campos para cada región.

El conteo de estomas y tricomas (por mm^2 y en el área foliar) se efectuó mediante las impresiones obtenidas y realizado con la ayuda del objetivo 45 X de un microscopio *American Optical* el cual se calibró con un micrómetro objetivo. Con los datos obtenidos se calculó el número de tricomas y estomas específicamente para cada sección. De esta forma y siguiendo el método de Sevilla (1983) se contabilizó el número y porcentaje de estas estructuras.

II. C. iii. Longitud estomática y tricomática

Para determinar el tamaño del estoma se midió el eje longitudinal de las células guarda (**Fig. 3A**). En el caso del tricoma se midió la longitud máxima del escudo incluyendo a las células centrales, anulares y aladas (**Fig. 3B**). Se tomaron mediciones de cinco tricomas y estomas por cada campo visual, de seis campos visuales (un campo visual por cada impresión de una región epidérmica).

II. C. iv. Grosor epidérmico apical en las caras abaxial y adaxial

De las preparaciones procesadas en PEG se observaron aquellas que fueran de cortes transversales. Mediante un Microscopio *American Óptica* calibrado con el objetivo de 45 X, se hicieron las mediciones correspondientes al grosor de la epidermis. Para cada superficie, adaxial y abaxial, se obtuvieron treinta mediciones (**Fig. 3C**).

II. C. v. Longitud del tallo tricomático en la región basal

Los cortes transversales de preparaciones procesadas en PEG y correspondientes a la región basal foliar fueron observados y analizados. Mediante un Microscopio *American Óptica* calibrado con el objetivo de 45 X, se hicieron las mediciones correspondientes a la longitud del tallo tricomático (desde la base del pie a la cúpula. Para cada lado, adaxial y abaxial, se obtuvieron 30 mediciones (**Fig. 3D**).

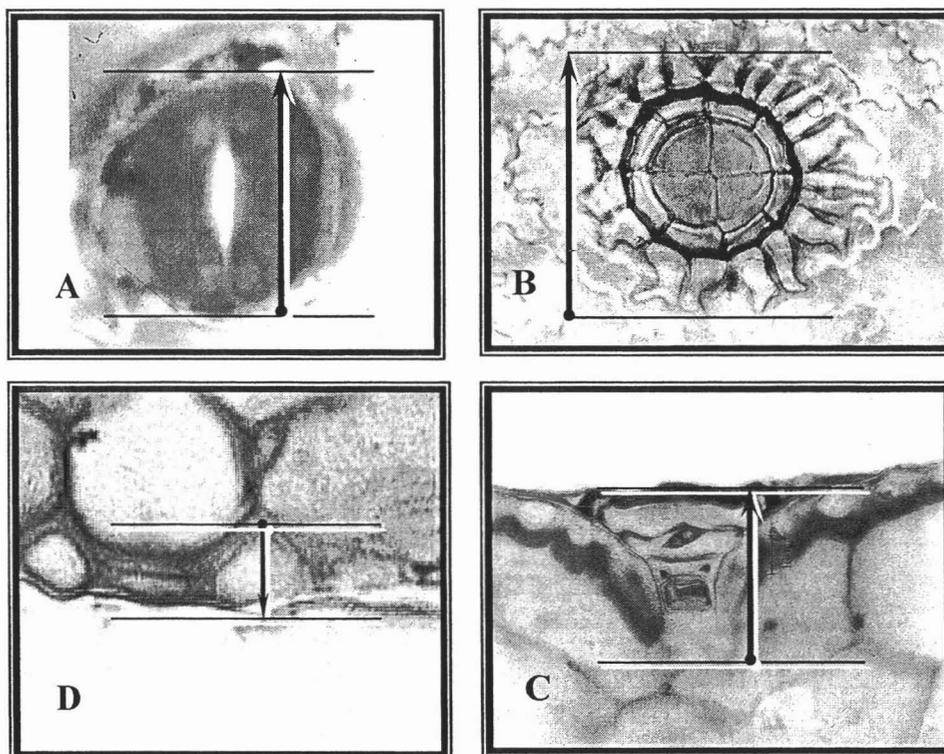


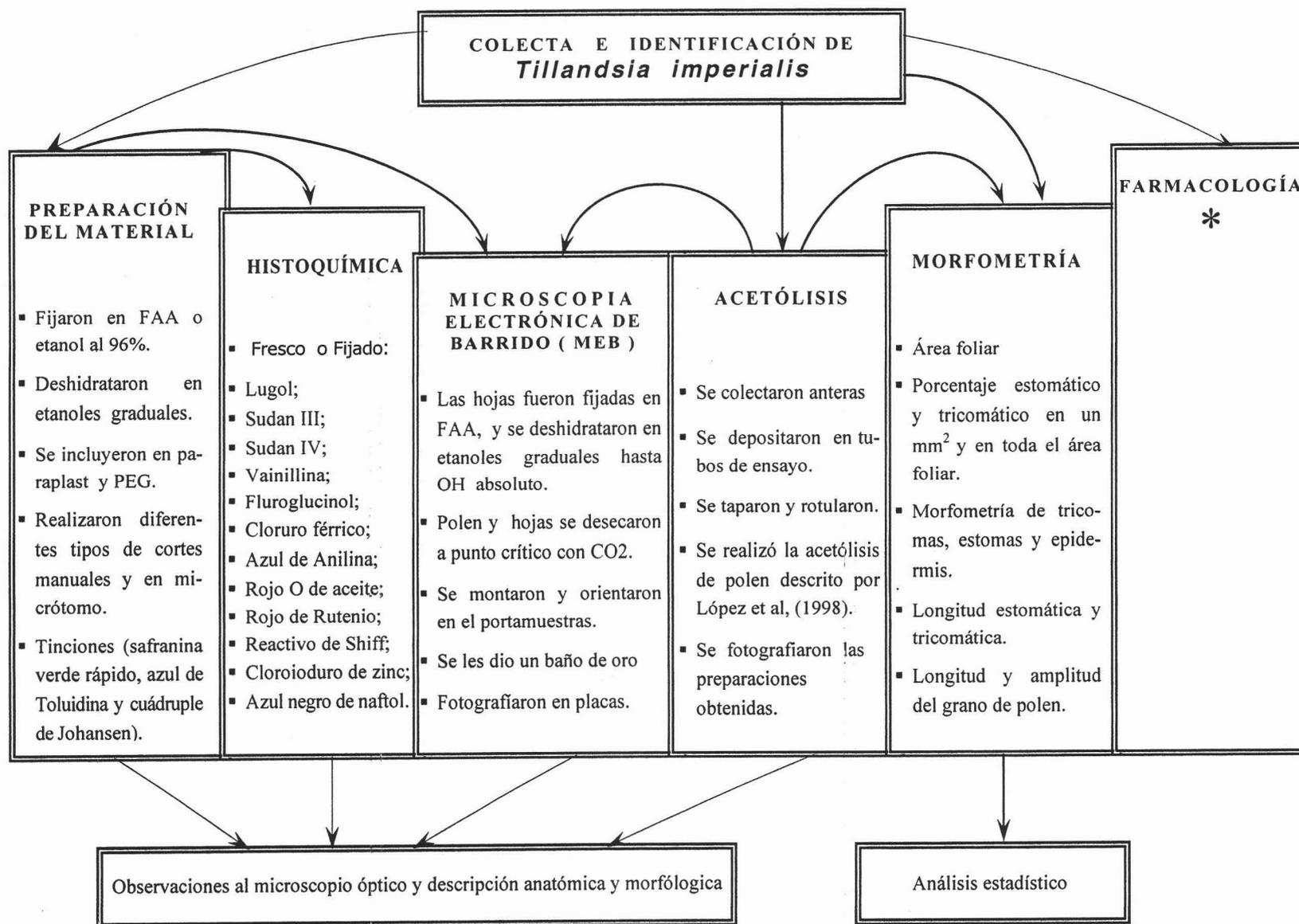
Fig. 3 A-B: Longitud estomática y tricomática. Las flechas ejemplifican este parámetro en los complejos celulares, A (células guarda del estoma) y B (tricoma). C: La flecha indica la longitud del tallo tricomático; D: la flecha señala el grosor epidérmico.

En la Fig. 4 se resume el método utilizado con material fresco y fijado.

Análisis estadístico

A los parámetros de longitud estomática, tricomática, longitud tricomática y grosor epidérmico; se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de probabilidad $\alpha = 0.05$, utilizando el programa STATISTICA (StatSoft Inc.,USA).

Fig. 4 Método utilizado para el material fresco de *Tillandsia imperialis*.



II. D. Estudio Farmacológico

II. D. i. Evaluación microbiológica

Procesamiento del material

El material se obtuvo de plantas adultas bien desarrolladas de los meses de febrero y abril del 2004, compradas en la central de abastos, Ciudad de México. El material fue determinado taxonómicamente y un espécimen fue registrado en el herbario de la UAM-Iztapalapa (UAMIZ) con el número 55702. Para preparar los extractos el material se limpió y secó a temperatura ambiente. Una vez seco se separó la parte aérea (hojas) e inflorescencia. Las diferentes partes de la planta se almacenaron en bolsas de polietileno color negro para proteger los compuestos fotosensibles a la luz. Una vez separadas y almacenadas, se procedió al inicio de molienda fina del material con la ayuda de un molino manual. El material obtenido se guardó en bolsas de papel de estraza y se les etiquetó (**Fig. 5**).

Obtención de los extractos

Del material seco y molido de hoja (10g) e inflorescencia (10g) se realizó la extracción en soxhlet con solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano y metanol) durante ocho horas (10g/300ml), tres extracciones de ocho horas con cada solvente. Al término de cada extracción de la misma muestra se evaporó en rotavapor a presión reducida. Los extractos secos, se pesaron y se les calculó su rendimiento.

Microorganismos utilizados.

Los microorganismos usados para la evaluación biológica fueron obtenidos del Laboratorio de microbiología, Centro de Investigaciones Biomédica del Sur, IMSS; que a su vez las adquirió del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Las cepas de microorganismos empleados fueron: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* OPS (aislado clínico), *Staphylococcus aureus* AHD (aislado clínico), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 08668), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Streptococcus faecalis* (ATCC 29212), *Salmonella typhi* (ATCC 06539), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) y *Candida albicans* (ATCC 10231).

Estudio antimicrobiano

Para la evaluación antimicrobiana de los extractos crudos se utilizó el método de doble dilución en agar como se describe en Rojas *et al*, (2001).

Las bacterias se cultivaron en cajas petri con agar tripticasa de soya (TSA) y la levadura en agar dextrosa de Sabourad (SDA). Los microorganismos se incubaron 24 horas a 37°C en cajas petri, se inocularon en caldo Muller-Hilton (MH) previamente esterilizado y se incubaron nuevamente durante 4 horas.

La turbidez del caldo se ajustó por comparación al estándar 0.5 Mc Farland lo que corresponde a 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC / ml). Este inóculo fue diluido 1:20 y aplicado en forma de gota, con micropipeta automática capaz de liberar 2µl sobre la superficie del agar en la caja petri, la gota tuvo una concentración final de microorganismos equivalente a 10^4 UFC/ml.

Cada extracto se disolvió en agua destilada con dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) *, preparándose diluciones seriadas dobles, las cuales se adicionaron al medio de cultivo en cajas petri de 3ml con las siguientes concentraciones finales: 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg/ml. Las placas fueron colocadas en una cámara de incubación por 24 horas a 37°C.

Los controles positivos de la prueba fueron preparados con Gentamicina (5 µg/ml) y Nistatina (10 µg/ml). La Gentamicina se utilizó por ser un bactericida de amplio espectro y la Nistatina por ser un antimicótico contra *Candida albicans*.

Como referencias negativas al realizar los ensayos se incubaron bacterias solas con el medio de cultivo, en el cual se observó un crecimiento normal.

Las observaciones fueron realizadas por duplicado y los resultados expresados como la más baja concentración del extracto vegetal que produjo una completa inhibición del crecimiento microbiano, a esto se le conoce como concentración mínima inhibitoria (CMI). (**Fig. 5**)

* Para facilitar la disolución del extracto se empleó un sonicador (AQUASONIC, modelo 75 HT)

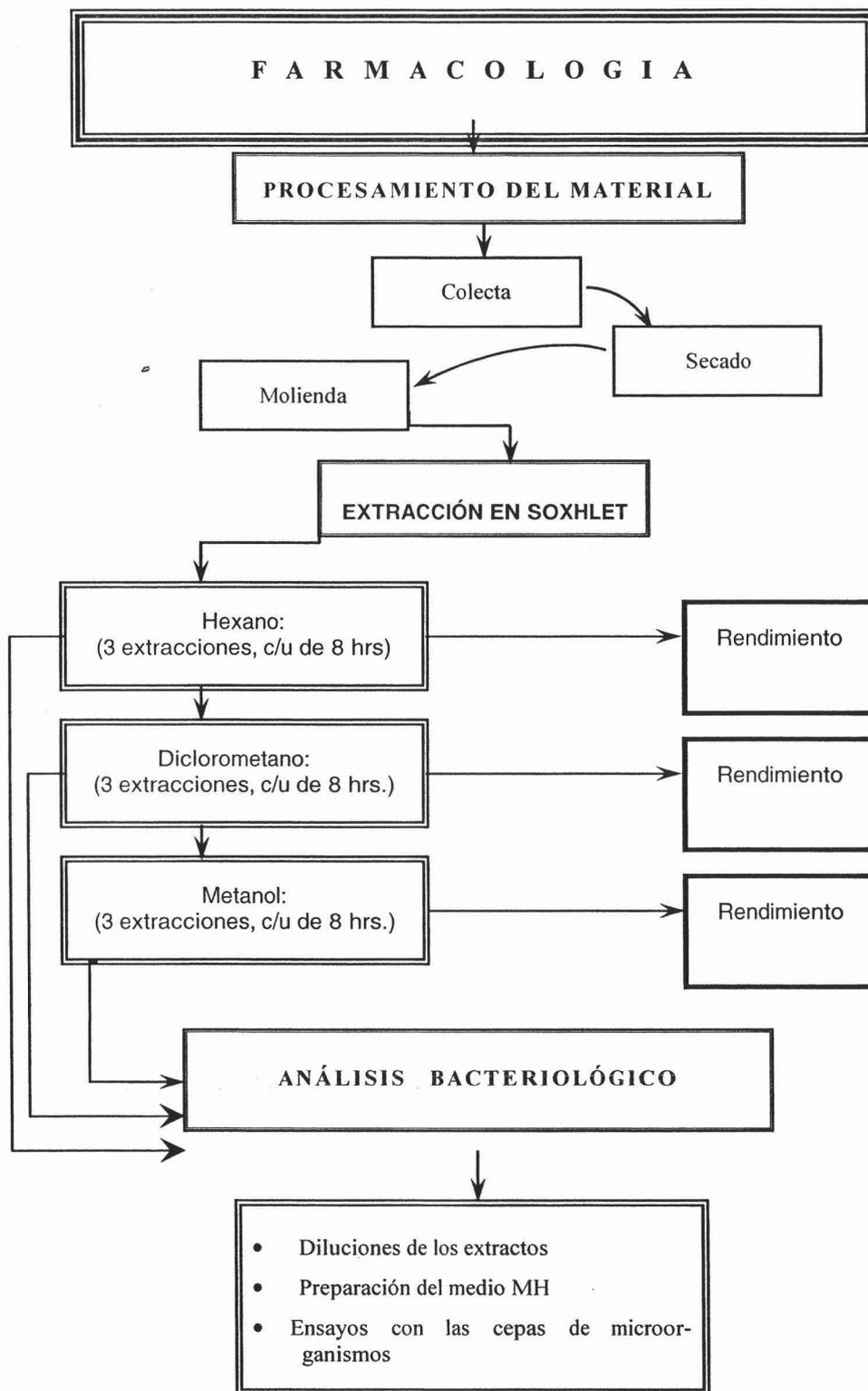


Fig.5 Método utilizado para el estudio farmacológico.

6. RESULTADOS

II. A. Caracterización Morfológica y /o Macroscópica.

II. A. i. Color y patrón de los pigmentos de hoja y bráctea.

La superficie de la hoja de *Tillandsia imperialis* no fue de coloración verde uniforme, pues presentó distintos patrones de pigmentación; desde zonas blancuzcas o decoloradas (vaina basal) a parches rojizos, morados o castaños oscuros en la lámina. Estos parches están distribuidos en la cobertura de la lámina, sin embargo, algunos pigmentos pueden encontrarse únicamente en ciertas porciones foliares, como la región apical, media y basal; así como en una sola cara, ya sea la adaxial o abaxial, o en ambas caras. A pesar de la variedad de patrones, podemos establecer como generalidades las siguientes: la parte apical fue la zona o región donde más se observaron los tonos rojizos, distribuidos en parches y en ocasiones de manera uniforme por toda la lámina. La parte media de la hoja en general fue clorofilica, es decir, de verde grisáceo (30D7) y verde oscuro (30D8), sólo en algunos casos se presentaron manchones rojizos. En la parte basal (vaina), próximo a la lámina basal se manifestaron pigmentos rojizos oscuros y morados distribuidos del centro hacia los márgenes de la lámina (**Fig.6. A – F**).

La hoja apical presentó colores similares a los descritos para la parte media: colores como el rojo vino (11E8), y castaño violáceo (11F8). El patrón de tinción, por lo general fue en forma de parches y en raras ocasiones uniforme. Por lo general ambas superficies se observaron pigmentadas, sin embargo los parches pigmentados no necesariamente correspondieron a la misma porción foliar en ambas superficies (abaxial y adaxial) (**Fig.6.A y Fig.6.D**).

Los pigmentos vino o castaño rojizo (9D8), rojo cardenal (10D8), café violáceo (10E8, 10F8), rojo (11D7) y rubí (12E8) se presentaron en forma de pequeños parches circulares distribuidos principalmente en la hoja media entre tejido clorofilico (30D7, 30D8) y en raras ocasiones el patrón fue uniforme (**Fig.6.B y Fig.6.E**).

La vaina, la región más próxima al tallo, presenta una zona decolorada aproximadamente de 1 a 3 cm de longitud, con tonos de un amarillo pálido (1A2, 2A2). En la superficie adaxial de la zona limítrofe entre la lámina y la vaina, aproximadamente a

partir de la vena central para los márgenes encontramos pigmentos en patrones lineares, paralelos a la venación. Los colores tienen tonos de rojizo cardenal (10D8), rubí oscuro (12E8), púrpura oscuro (14F5) y violeta oscuro (15F5). A estos tonos violáceos se les conoce como coloración ciánica. La intensidad de estos colores es menor en la cara abaxial que en la cara adaxial de *Tillandsia imperialis* (**Fig.6.C** y **Fig.6.F**).

De las brácteas primarias, la tonalidad más frecuente en la parte apical (lámina) fue el rubí (12E8)(**Fig.6G** y **Fig.6.I**), en la parte media (vaina) destacaron los rosas pálidos (8A3), el rojo escarlata (9A8), rojo castaño oscuro (9C8), vino o castaño rojizo (9D8), y violeta castaño (11D8). Todos estos pigmentos se presentan con mayor intensidad en la cara abaxial (**Fig.6.H** y **Fig.6.J**), distribuidos de manera uniforme desde la zona apical hasta la parte media y a veces a los bordes basales próximos a la parte media. Los colores más intensos como los rojizos se distribuyen en el ápice y su intensidad disminuye gradualmente, en cambio en la parte basal (vaina basal) el color dominante fue el amarillo pálido (1A2). Otros colores para esta región fueron los tonos de rosa pálido (8A3), rojo escarlata (9A8), y blanco amarillento o pálido (1A2), los cuales se presentaron en ambas superficies. Una diferencia entre las caras foliares, es que en la adaxial el patrón de coloración es menos intenso y se distribuye más hacia la parte apical (**Fig.6. G – J**). Por otra parte, los pétalos de las flores son de un tono violeta intenso y el estigma es morado.

Los resultados observados concuerdan con la clasificación de patrones de pigmentación realizada por Benzing y Friedman (1981), por lo que *Tillandsia imperialis* presentó una pigmentación efímera ciánica asociada con la antesis y pigmentación foliar basal. La primera, se presentó particularmente en las brácteas y en los pigmentos foliares apicales. La segunda se encuentra distribuida en las hojas basales de la roseta.

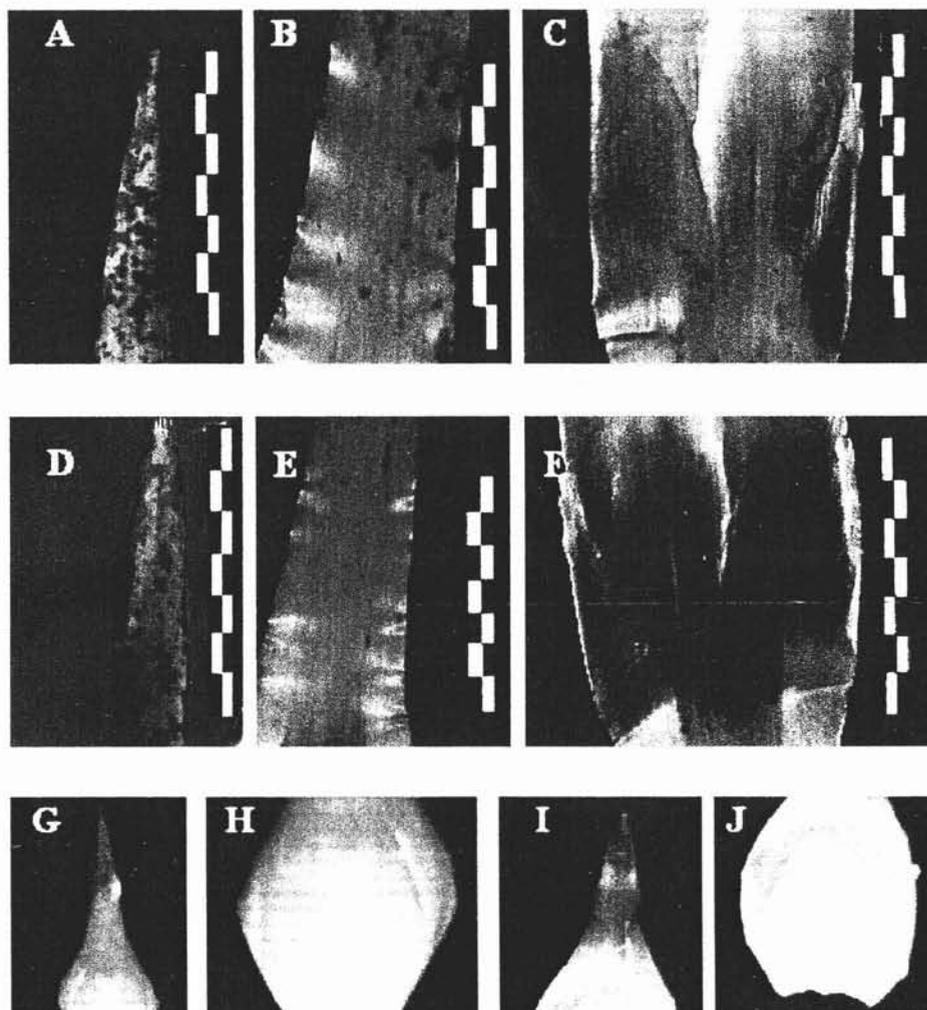


FIG. 6 Patrón de pigmentación en la hoja (A - F) y en la bráctea (G - J).

A, B, C, G, H: cara abaxial; D, E, F, I, J: cara adaxial.

Parte apical o lámina (A, D, G, I), media o lámina (B, E) y basal o vaina (C, F, H, J).

II. A. ii. Sabor y Olor:

El sabor no fue detectable. La planta in vivo carece de olor, pues no se detecta alguna fragancia. Sin embargo, las hojas y brácteas secas y molidas emiten un olor aromático y un olor ligeramente picante.

II. A. iii. Superficie

Las hojas fueron de borde entero, oblongas, anchas, liguladas, con forma de abrevadero, bases expandidas, textura foliar lisa y de acuerdo como lo señala el método de Benzing (1978). la naturaleza de la lámina foliar corresponde a la hidrofóbica.

II. B. Caracterización Microscópica

II. B. i. Anatomía foliar

Epidermis

Se reconocieron tres grupos principales de células: los tricomas, el complejo estomático y las células epidérmicas (**Fig.7**). Desde una perspectiva transversal la superficie epidérmica es una capa uniestratificada, de tamaño pequeño comparado con el de otras células; el lumen de éstas es escaso y su disminución es mayor conforme más próxima es su ubicación a la vaina, parte basal foliar. En la epidermis abaxial de la vaina existe un mayor engrosamiento de las paredes internas lo cual ocasiona una reducción notable del lumen y sobre todo en células vecinas a las invaginaciones (lugar donde los tricomas están insertados), incluso en éstas se almacenan fitolitos, también conocidos como cuerpos silíceos. Al observar a las células epidérmicas en cortes paradermales en fresco se apreció la forma irregular con paredes anticlinales ondulantes en forma de “U” o “V” y poco sinuosas (**Fig.8**). La longitud de éstas es paralela al eje longitudinal foliar como se menciona para otras superficies bromeliáceas (Smith y Downs, 1974) y son más elongadas las células epidérmicas que se encuentran sobre los haces vasculares.

A pesar de las generalidades descritas se advirtieron diferencias en la longitud, ancho y grosor de las células epidérmicas de la lámina y la vaina, así como en sus caras respectivas (abaxial y adaxial). Las células abaxiales de la lámina son uniformes y más elongadas con respecto a las células adaxiales; mientras éstas últimas son más bien buliformes, ovoides u ovales y se alternan con células elongadas semejantes a las abaxiales (**Fig.9**). Tanto la epidermis abaxial como la adaxial ostentan fitolitos (descritos posteriormente), pero se exhiben principalmente en la superficie abaxial. Únicamente las paredes periclinales externas dieron positivo (rojo) a la tinción con rojo “O” de aceite (**Fig.10**), en contraste todas las paredes epidérmicas tanto de vaina como de la lámina dieron una reacción negativa (negro) con Sudan III y IV. Asimismo, en la vaina se perciben características divergentes para cada cara, así la epidermis abaxial se caracteriza por paredes engrosadas en forma de “U”, pero en ocasiones el lumen es segregado a la porción central externa de la célula adquiriendo la forma de un abanico o cono invertido debido al gran espesor de las paredes anticlinales y periclinal interna tanto en la hoja como en la bráctea. Dichos engrosamientos modelan formas de “pezuña” y de “ladrillo” (**Fig.11**).

Las paredes periclinales internas son más cutinizadas y también contienen cuerpos de sílice en su interior. En contraste las paredes de las células adaxiales manifestaron paredes menos engrosadas; no obstante sí se distinguen fácilmente los engrosamientos de las paredes anticlinales y también se acrecentó la pared periclinal interna. La vaina es la región foliar y bráctea donde más se evidencia la presencia de fitolitos (**Fig.12**).

En general, el lumen de las células epidérmicas adaxiales y abaxiales acumula inclusiones fitolíticas, usualmente por cada célula epidérmica se deposita un cuerpo silíceo lustroso, esferoidal de superficie irregular, rugosa y espinulosa, de un tamaño de $3.4 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (**Fig.13**), sin embargo, al examinarlos mediante contraste de fases o con luz polarizada no se presentó refringencia. El sílice es el único tipo de material ergástico reportado para el tejido epidérmico de esta bromelia.

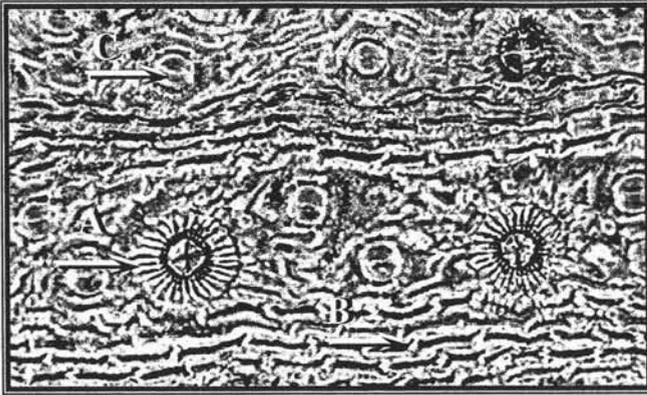


Fig. 7 Corte paradermal. Campo claro (66 X).
Epidermis abaxial.

- A.- *Tricoma, escama o pelo peltado;*
- B.- *Células epidérmicas;*
- C.- *Complejo estomático.*

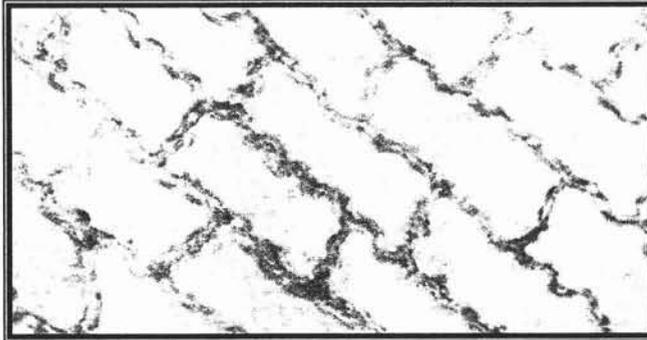


Fig. 8 Corte paradermal, Campo claro (330 X)
Epidermis adaxial.

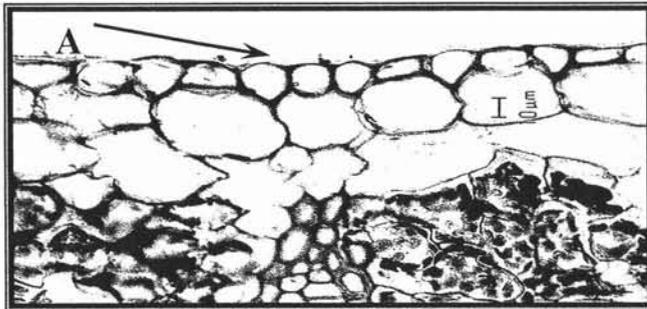


Fig.9 Corte transversal. Tinción: Safranina - verde rápido. Campo claro (100 X).

- A: *Células adaxiales buliformes;*
- B: *Células abaxiales elongadas.*

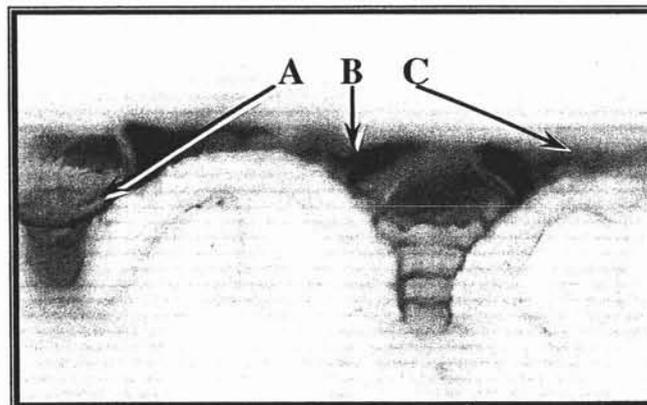
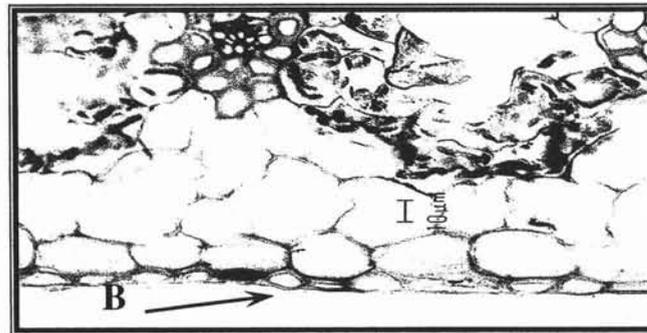


Fig.10 Corte transversal de la epidermis, campo claro (132X). Teñida con Rojo "O" de aceite.

- A. *Pared anticlinal de las células del tallo;*
- B. *Células anulares;*
- C. *Células aladas.*

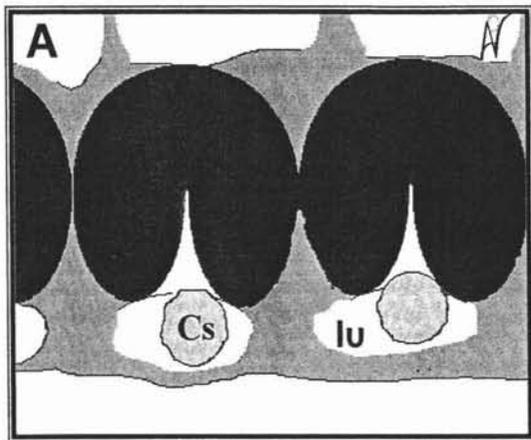
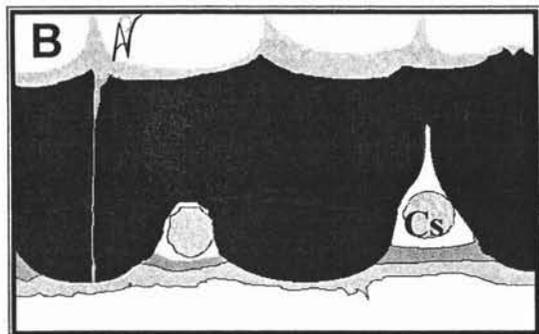


Fig.11 Esquema de un corte transversal epidérmico abaxial.

A.- Engrosamientos epidérmicos (color negro) en forma de “pezuña” [P];

Cs: *cuerpo de sílice;*
lu: *lumen.*



B.- Engrosamientos epidérmicos [color negro] en forma de “Ladrillo” [L].

L: *lumen*

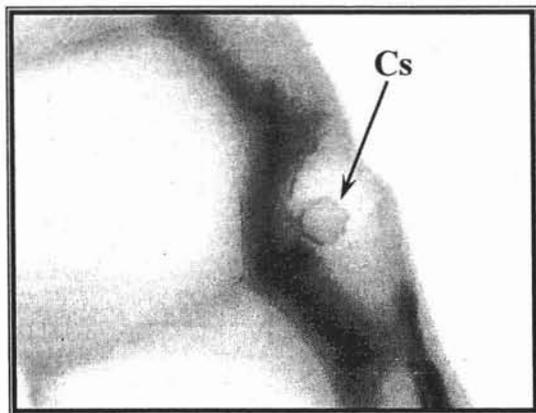


Fig.12 Corte transversal. Tinción de azul de toluidina..Campo claro (330 X).

Cs: *cuerpo de sílice rugoso.*

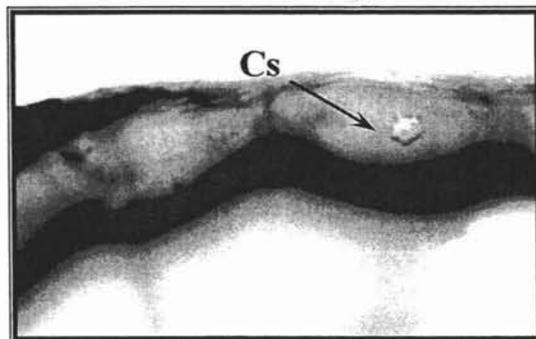


Fig.13 Corte transversal. Tinción de azul de toluidina. Campo claro (250 X).

Cs: *cuerpo de sílice lustroso e irregular*

Estomas y cámara estomática.

El estoma consiste de dos células oclusivas reniformes (forma arriñonada), de un tamaño promedio de $36.11 \pm 2.65 \mu m$ y en su citoplasma se alojan ciertos cloroplastos (**Fig.14**). La pared dorsal es más delgada, mientras su pared ventral es generalmente engrosada. El lumen de los estomas se caracteriza por ser angosto, carente de fitolitos y en forma de lente biconvexa debido a los bordes cutinizados de las células oclusivas el cual es más grueso en las paredes anticlinales, pero tanto las paredes internas como externas son gruesas. Visto desde un panorama paradermal se logra notar la semejanza de tamaños de los estomas con las células centrales de la cúpula tricomática* . Alrededor del estoma se encuentran cuatro células subsidiarias con forma triangulada distinta al de las otras células epidérmicas (**Fig.15**), debido a este arreglo pertenecen al tipo tetracítico. Además, las células subsidiarias polares y laterales son de tamaño semejante por lo cual corresponden al tipo c-tetra-monocíclico de acuerdo a la clasificación de Patel, 1979. No obstante, el número de células subsidiarias puede ser en ocasiones de cinco o seis células. Bajo las células guarda se presentan de tres a cuatro células subestomáticas con cloroplastos (**Fig.16**).

Bajo el M.E.B. se apreció un ligero hundimiento de los estomas con respecto a las células epidérmicas (**Fig.17**), junto con impregnaciones de cera epicuticular. En cortes transversales se observaron de seis a ocho células hipostomáticas delimitando la cámara estomática (**Fig.18**), éstas se diferencian del resto de las células hipodérmicas por ser más pequeñas y en la sección más ventral o adaxial de la cámara se distinguen dos células con lóbulos prolongados. Cada cámara estomática se localiza debajo del aerénquima.

* Las células centrales son la zona focal de la cúpula tricomática, y se observa como un círculo dividido en cuartos. Dicha región no incluye a las células anulares ni a las aladas.

Los haces vasculares no están adyacentes a la cámara estomática pues son aislados por capas de células parenquimatosas (**Fig.19**); como resultado de esto los estomas presentan una distribución intervascular y en cortes paradermales se avistan en hileras longitudinales irregulares (en grupos de dos o tres) entremezclados con tricomas los cuales se alinean paralelamente a los haces vasculares (**Fig.20**). La hoja es hipoestomática dado que los estomas se sitúan sobre la superficie abaxial y predominan más en la lámina foliar, su distribución fue irregular en las regiones estudiadas (apical, media y basal); y se observó un mayor gradiente en la región apical (lámina), de aquí disminuyó hacia la región basal (vaina). Fue poco frecuente hallar estomas cubiertos por escamas tricomas y más aún descubrirlos en la superficie adaxial debido a su escasez sobre esta cara.

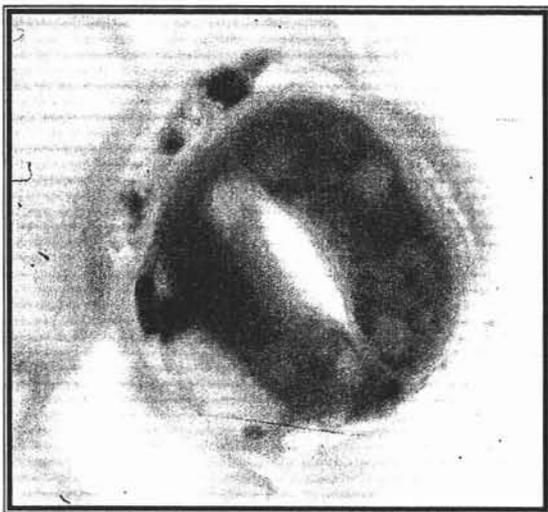


Fig.14 Corte paradermal. Estoma reniforme, teñido con A.P.S. Campo claro (132 X).

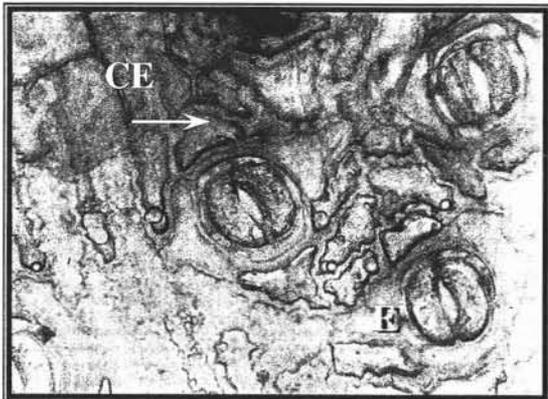


Fig.15 Corte paradermal abaxial. Tinción: azul negro de naftol. Campo claro (66 X).

E: Estoma;
CE: células subsidiarias.

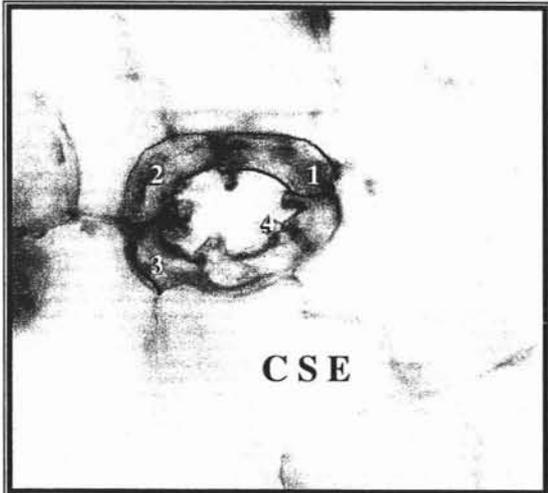


Fig.16 Corte paradermal abaxial teñido con A.P.S. Campo claro (132 X).

CSE: Células subestomáticas (1-4).

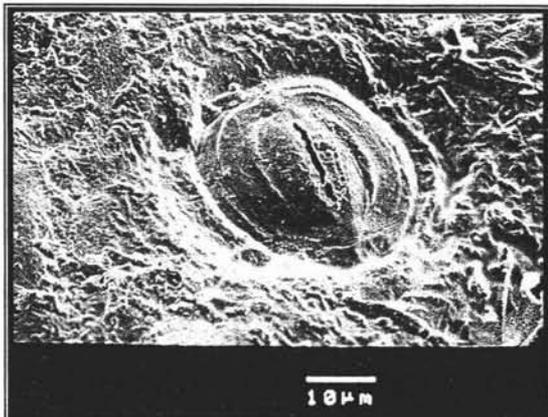


Fig.17 M.E.B., sección paradermal (1500 X).

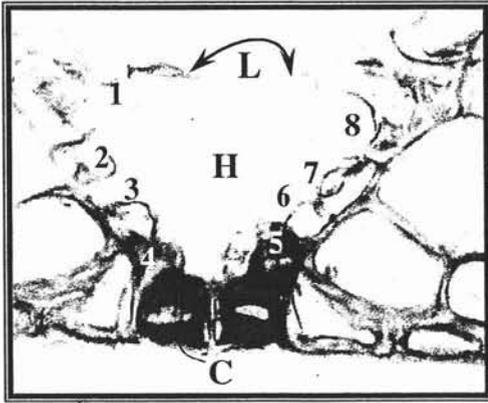


Fig.18 Corte transversal. Tinción: A.P.S. Campo claro (100 X).

- C:** *Células guarda;*
- H:** *Células hipoestomáticas (1-8);*
- L:** *Células lobuladas.*

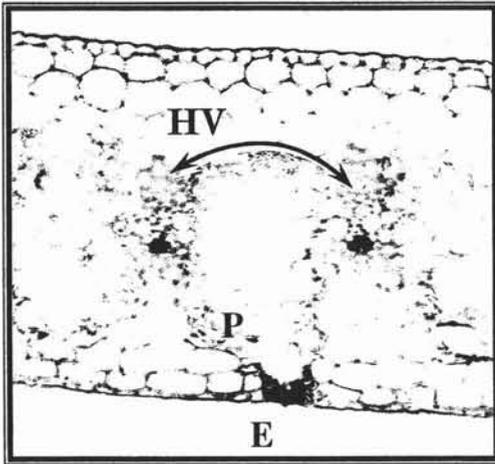


Fig.19 Corte transversal. Tinción: A.P.S. Campo claro (33 X).

- P:** *Parénquima;*
- HV:** *Haz vascular;*
- E:** *Estoma.*

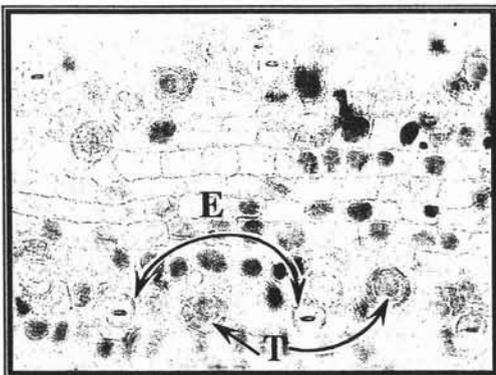


Fig.20 Corte paradermal abaxial teñido con azul de toluidina. Campo claro (75X)

- T:** *Tricoma;*
- E:** *Estoma.*

Tricomas

Las escamas ó tricomas de *Tillandsia imperialis* en secciones tangenciales semejan a un girasol, presentando un arreglo concéntrico, ordenado y uniforme, su tamaño promedio osciló en las $88.12 \pm 7.09 \mu m$ (**Fig. 21**). Las células del escudo (cúpula, domo o disco) son altamente geométricas con patrones de simetría radial; el escudo de los tricomas desde una vista frontal se constituye por cuatro células centrales de tamaño semejante, rodeadas por una serie circular de ocho células anulares o anilladas. Las paredes periclinales externas (dorsales) de estos dos tipos de células son altamente cutinizadas (**Fig.22**), pero las paredes anticlinales externas de las células anulares son peculiares por engrosamientos ricos en pectina (**Fig.23**). Subsecuentemente, en la periferia se tienen aproximadamente de 20 a 35 células aladas. Éstas se caracterizan por ser más elongadas y elípticas comparado con los otros tipos de células, sin embargo éstas son más cortas que las células aladas de las *Tillandsias* atmosféricas como lo reportan algunos autores (Benzing *et al*,1978; Gardner, 1982). Además, se observó con Sudan IV una coloración naranja-carmín en las paredes anticlinales de las células aladas y una tinción rojiza con rojo de rutenio. Este tipo de células son rígidas e inflexibles, pues no presentan movilidad, en cambio manifiestan una superficie lisa carente de irregularidades o verrugas. Asimismo tienen engrosamientos alrededor de las células anilladas (paredes anticlinales internas); gracias a las placas de M.E.B. se facilitó la interpretación de estos resultados (**Fig.24**). De la misma forma se observaron concavidades de las células aladas, en el extremo proximal con las células anulares. Las escamas son del tipo 4 +8 +32 celular (**Fig.25**) de acuerdo con la fórmula tricomática propuesta por Tomlinson (1969).

En corte transversal se visualiza a la escama peltada como una estructura marcadamente diferenciada por una cúpula, un tallo y un pie o células basales (**Fig.26**). Éstas dos últimas estructuras se ubican en depresiones epidérmicas en forma de cuna, aún cuando la cúpula esta por encima de éstas no sobrepasa a las células epidérmicas pues se halla en el mismo nivel (**Fig.27**). El tallo consiste de una cadena uniseriada de cuatro a cinco células vivas, sus paredes anticlinales son delgadas y cutinizadas, en contraste las paredes periclinales del tallo (adyacentes a cada célula) no están cutinizadas. Además, el tamaño de las células desciende al acercarse al pie tricomático (**Fig.28**). La célula del tallo

más próxima al escudo tiene un tamaño mayor, sus paredes anticlinales son más delgadas y está célula es rodeada o cubierta por las células del disco.

Finalmente, el pie tricomático se forma de una a dos células denominadas células basales colocadas en el interior de las invaginaciones epidérmicas. Una diferencia importante de las células de la cúpula con respecto al resto del tricoma radica en la presencia de núcleos tanto en las células basales como en las del tallo; algunas veces es posible evidenciar núcleos en las células aladas, pero esto es muy raro. Siguiendo la clasificación propuesta por Benzing, (2000) los tricomas peltados de *Tillandsia imperialis* corresponden al tipo cuatro.

Aún cuando las escamas son ampliamente distribuidas en las superficies adaxiales y abaxiales, éstas se sitúan preferentemente en la epidermis abaxial de la vaina y su número se reduce en la lámina y más aún en la parte apical de ésta. Debido a la proliferación tricomática en la superficie abaxial de la vaina, la disposición tricomática se hace profusa e irregular (**Fig.29**).

Hipodermis

Debajo de la epidermis está la hipodermis, capa paralela no esclerótica, de paredes delgadas celulósicas (**Fig.30 y 31**), la cual dio positivo al azul negro de naftol (azul) y una coloración verdosa con la tinción safranina verde rápido. Poseen vacuolas grandes en donde se acumulan pigmentos naranjas, rojizos y morados (**Fig.32, y Fig.33**). El colorido de estos pigmentos se disponen de forma heterogénea a lo largo de la hoja, así en la parte basal abaxial se presentan coloraciones moradas o ciánicas, en la parte media y apical se observan pigmentos de tonos rojizos a rosados en ambas caras de la hoja (**Fig.34**). La hipodermis adaxial se compone de células grandes, redondeadas, incoloras y más profundas. Una característica importante para diferenciar a las hipodermis, quizá sea la forma celular; mientras la hipodermis abaxial se caracteriza por ser de forma elongada o rectangular y más definida, las adaxiales son circulares o redondeadas. El contenido celular de las células hipodérmicas dio una coloración positiva (rojo) a la vainillina, mostrando la presencia de catequinas o de taninos condensados (**Fig.35**).

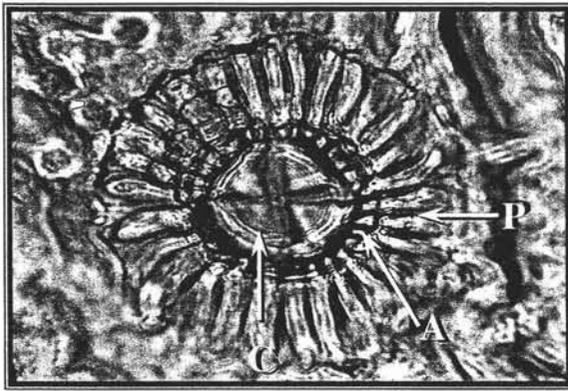


Fig.21 Réplica epidérmica. Campo claro (132 X). Tricoma

C: *Células centrales;*
A: *Células anulares;*
P: *Células aladas.*



Fig.22 Corte transversal de un tricoma. Tinción: Cuádruple de Johansen. Campo claro (75 X).

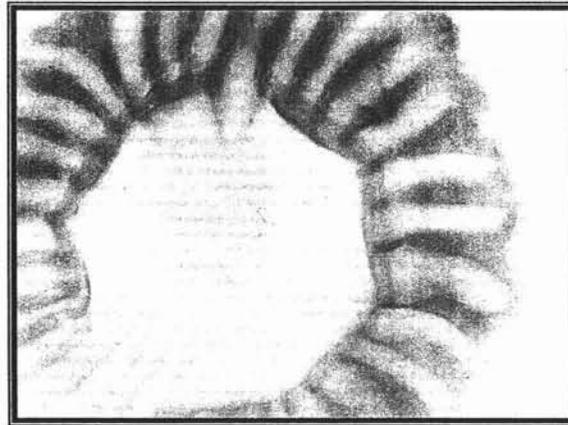


Fig.23 Corte paradermal del escudo tricomático. Tinción: Rojo de rutenio. Campo claro (330 X).

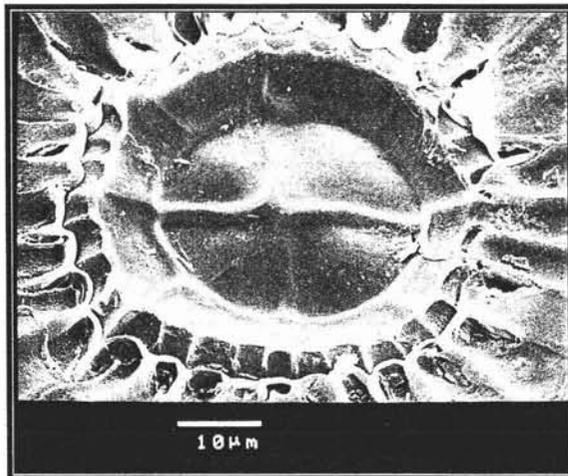


Fig.24 M.E.B. Sección paradermal de un tricoma. (2000 X).

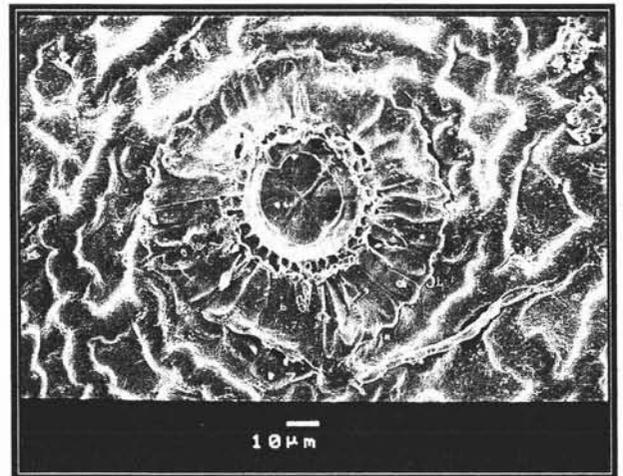


Fig.25 M.E.B. Vista paradermal de un tricoma (1500 X).

Fig.26 Corte transversal (101 X).

C: *Cúpula;*
T: *Tallo;*
P: *Pie.*

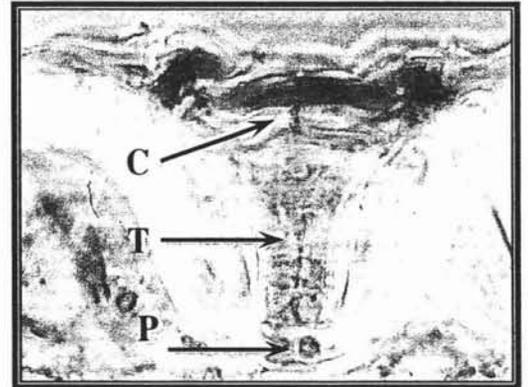


Fig.27 M.E.B. en vista transversal (1500 X).

C: *Cúpula;*
T: *Tallo;*
P: *Pie.*

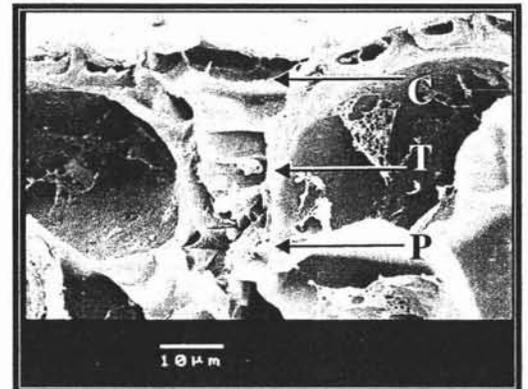


Fig.28. Corte transversal. Tinción azul de toluidina. Campo claro (330 X).

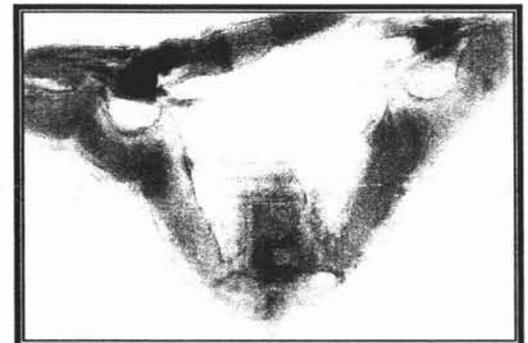
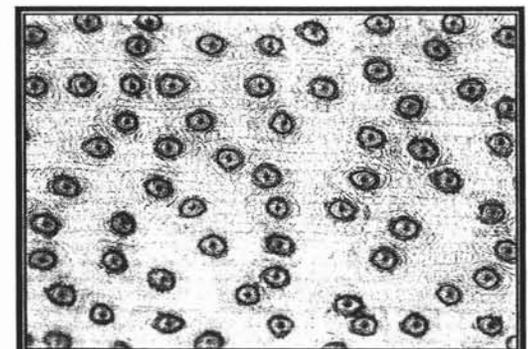


Fig.29 Corte paradermal. Tinción azul de toluidina. Campo claro (25 X).



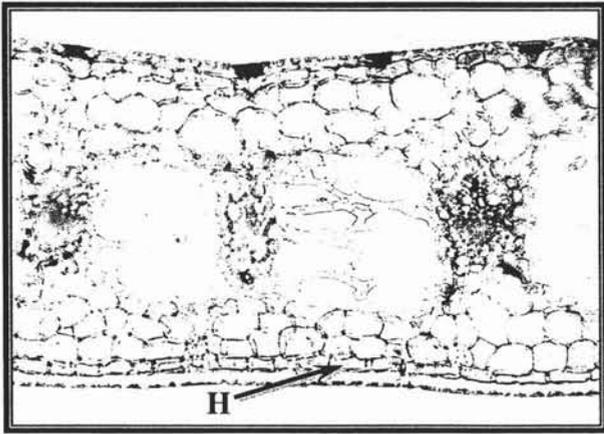


Fig.30 Corte transversal, campo claro (25 X). Hipodermis

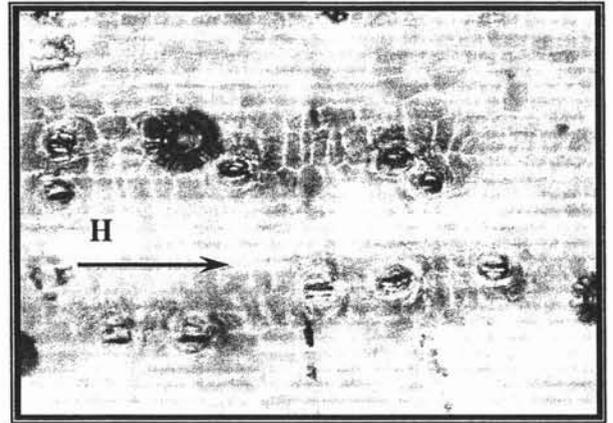


Fig. 31 Corte paradermal abaxial . Campo claro (33 X). Hipodermis

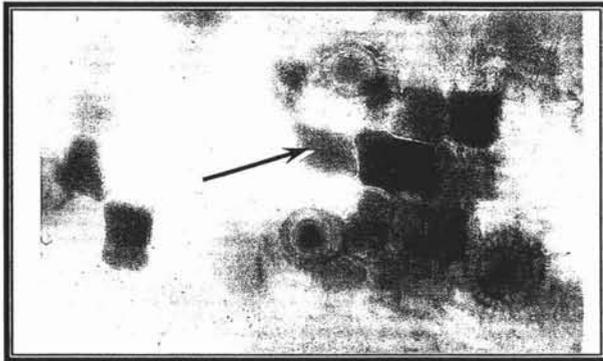


Fig.32 Corte paradermal, campo claro (66 X). Hipodermis

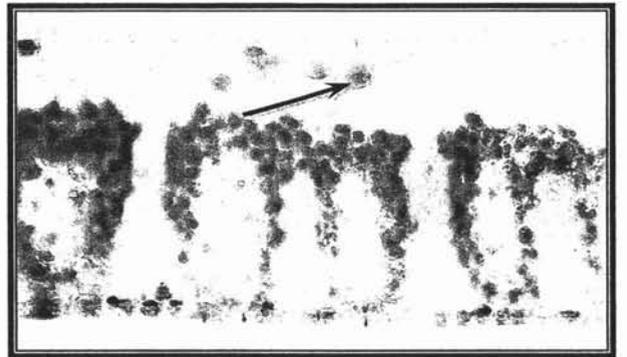


Fig.33 Corte transversal. Tinción: azul de toluidina. Campo claro (37.5X) Hipodermis.

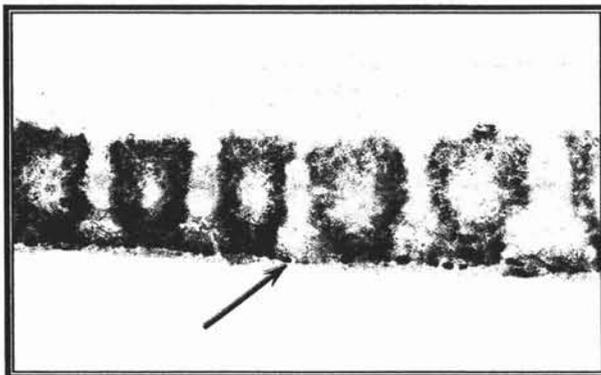


Fig.34 Corte transversal foliar. Campo claro (25 X).

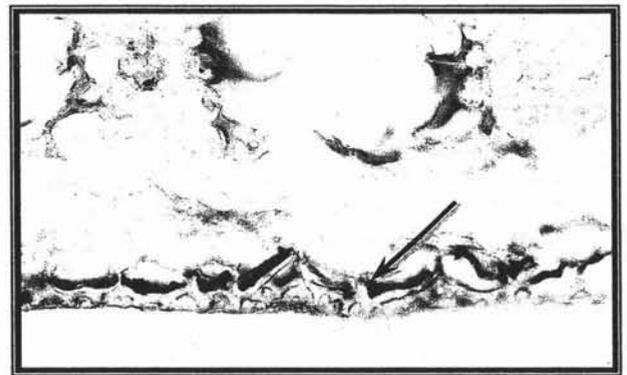


Fig.35 Corte transversal. Tinción con vainillina. Campo claro (66 X). Hipodermis .

Haces vasculares

Los haces vasculares se disponen centralmente (**Fig.36**), a la mitad de la superficie adaxial y abaxial, son solitarios, de arreglo colateral, el protoxilema ocupa una distribución central superior y en cambio el metaxilema tiene una posición media o lateral (**Fig.37**). Se aprecian dos tipos de haces vasculares, unos son más angostos y otros más ensanchados (**Fig.38**); el grosor de los haces es alternado (uno grueso, el otro angosto), además, entre cada haz se presenta un espacio promedio de $172.37 \pm 40\mu$ m. Asimismo, los haces están inmersos en un conjunto de fibras, parte de éstas separan a las células de floema de las del xilema, dichas fibras dieron una reacción positiva (roja) a la cutícula con rojo "O" de aceite (**Fig.39**) así como con Sudan IV. Las paredes de celulosa del floema se tiñen de azul con azul de anilina (**Fig.40**) y rojizas con Sudan IV, mientras con clorioduro de zinc se colorean de azul. Los vasos xilemáticos presentan engrosamientos secundarios del tipo anular (**Fig.41**).

Las fibras esclerenquimáticas van de un tamaño pequeño a grande y generalmente las más pequeñas son las más contiguas al floema. Las células fibrosas se ensanchan más en las porciones basales de la hoja adquiriendo forma hexagonal irregular, mientras las fibras apicales son redondeadas, pentagonales o hexagonales; incluso en las regiones apicales se tiene una banda de fibras alrededor del haz, en las partes basales se presentan dos bandas y tres en los extremos polares. Las paredes de las fibras dan una reacción positiva para lignina (roja) con floroglucinol y HCl (**Fig.42**), siendo más intenso el color en las fibras envainantes del xilema y las divisorias del floema y xilema. No hay fibras fasciculares y la venación es paralelinervia.



Fig.36 Corte transversal. Teñido con azul de toluidina. Campo claro (37.5X).
Haces vasculares.

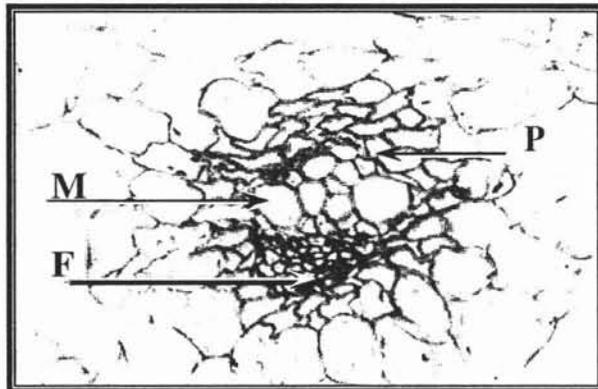


Fig.37 Corte transversal teñido con la técnica Cuádruple de Johansen. Campo claro (100 X).
Haz vascular

M: *Metaxilema;*
P: *Protoxilema;*
F: *Floema.*

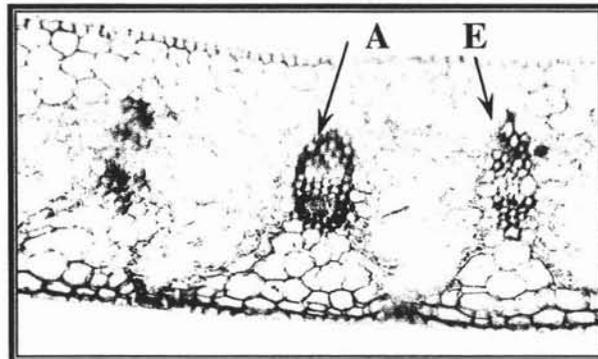


Fig.38 Corte transversal foliar teñido con azul negro de naftol. Campo claro (33 X).

A: *Haz vascular ancho;*
B: *Haz vascular angosto.*

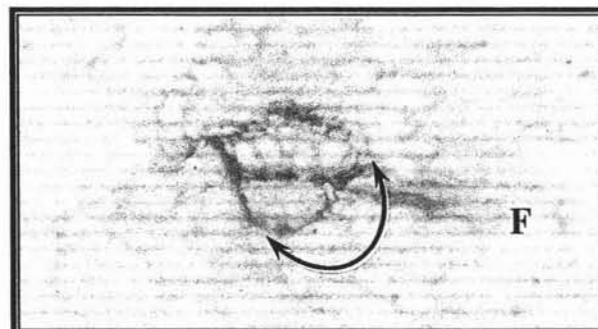


Fig.39 Corte transversal, tinción con Rojo "O" de aceite. Campo claro (66 X).

F: *Fibras alrededor del haz vascular*

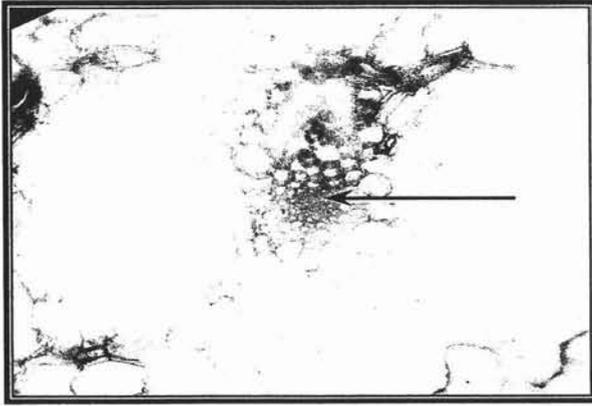


Fig.40 Corte longitudinal. Teñido con azul de anilina. Campo claro (33 X). Floema del haz vascular.

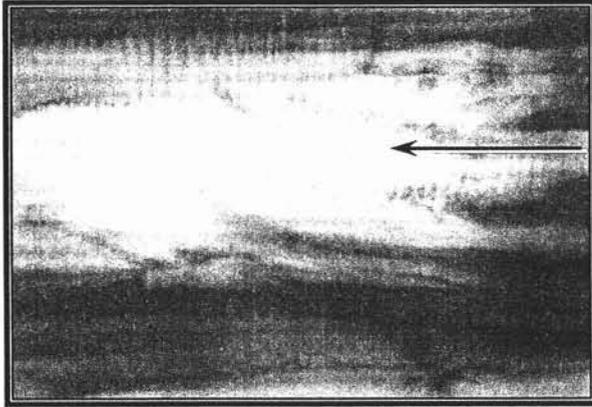


Fig.41 Corte longitudinal. Teñido con azul de toluidina. Campo claro (132 X). Vasos xilemáticos.



Fig.42 Corte transversal teñido con floroglucinol - HCl. Campo claro (33 X). Fibras y haz vascular.

Parénquima

El mesofilo es indiferenciado y se compone de tres tipos de parénquima: el clorofílico, el aerífero y el acuífero (**Fig.43**). Las células del parénquima clorofílico se organizan en varias capas de células, se caracterizan por ser redondeadas, de paredes finas celulósicas, con muchos cloroplastos elípticos, los cuales se distribuyen alrededor de las paredes (**Fig.44**). Este tejido se distribuye entre los haces vasculares y su densidad es más alta en la parte apical (lámina), aunque disminuye ligeramente en la región media y es escaso en la parte basal foliar (vaina). Ocupa una posición más adaxial o dorsal y el parénquima aerífero se ubica debajo del clorofílico. Las células esteladas del parénquima aerífero se componen de dos a cinco brazos largos con pocos cloroplastos (**Fig.45**), de paredes delgadas de celulosa, se ubican anexos a la cámara estomática. En la vaina, el parénquima aerífero sustituye al clorofílico, dominando el espacio intervascular por células elongadas (esteladas), pero éstas no son numerosas dejando espacios intercelulares muy grandes (**Fig.46**). Estas células fueron difíciles de visualizar por medio de cortes procesados sólo fue posible mediante cortes en fresco y en menor medida a través del M.E.B (**Fig.47**).

Debajo de la hipodermis en transcorte se observa al parénquima acuífero, incoloro, de células redondeadas o irregulares y de paredes delgadas de celulosa. El parénquima acuífero adaxial se compone de tres a cuatro capas, formando hileras paralelas, en contraste el abaxial se apila en un mismo número de capas, pero en forma piramidal (**Fig.48**).

Granos de almidón esféricos u ovalados, solitarios y en agregados de más de tres proliferan en las células parenquimatosas de la vaina, tanto en bráctea como en la hoja (**Fig.49**). Los granos de almidón abundan más en la hipodermis abaxial y las dos o tres capas celulares anexas a ésta (**Fig.50**), aunque es posible la observación de éstos en la hipodermis adaxial, pero en menor cantidad. También se disponen alrededor de los haces vasculares. La detección de este material fue mediante lugol, ácido peryódico-reactivo de Schiff (A.P.S.), y la cruz de malta fue visualizada con luz polarizada.

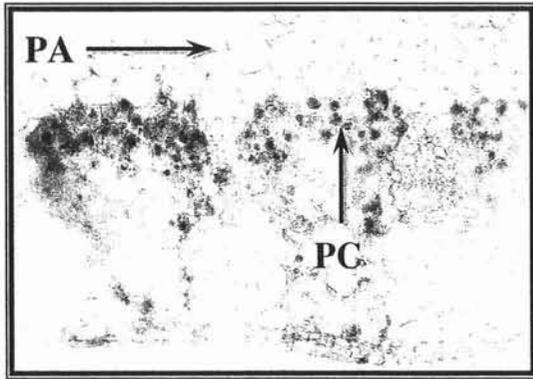


Fig.43 Corte transversal de hoja teñido con azul de toluidina. Campo claro (50 X).

PA: *Parénquima acuífero.*

PC: *Parénquima clorofílico.*



Fig.44 Corte longitudinal de hoja, tinción con safranina verde rápido. Campo claro (50 X).

PC: *Parénquima clorofílico.*

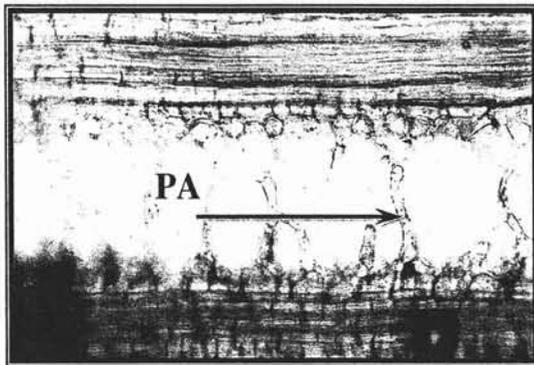


Fig.45 Corte longitudinal de hoja, teñido con azul de toluidina. Campo claro (50 X).

PA: *Parénquima aerífero.*

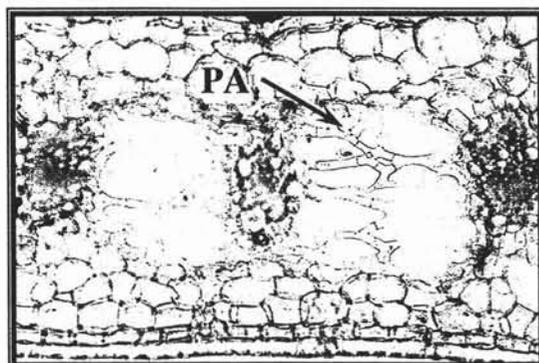


Fig.46 Corte transversal foliar. Campo claro (25 X).

PA: *Parénquima aerífero.*

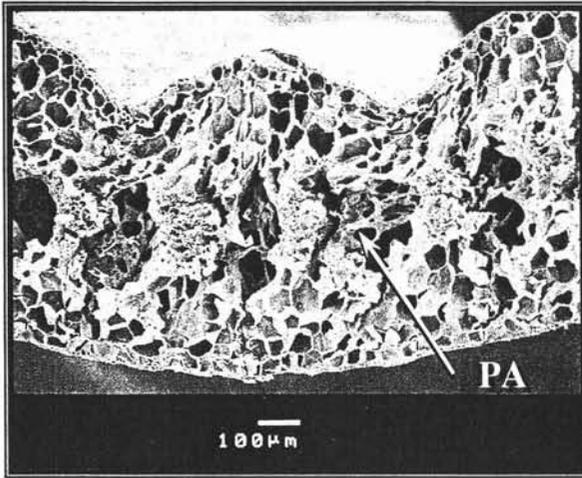


Fig.47 M.E.B. corte transversal de hoja (100X)

PA: *Parénquima aerífero.*

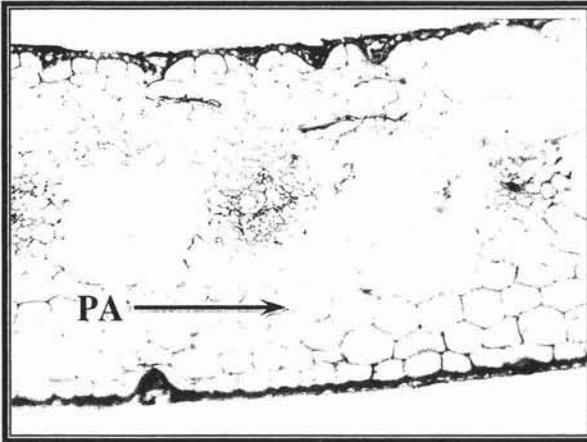


Fig.48 Corte transversal de hoja. Tinción: azul de toluidina. Campo claro(45x)

PA: *Parénquima acuífero abaxial.*

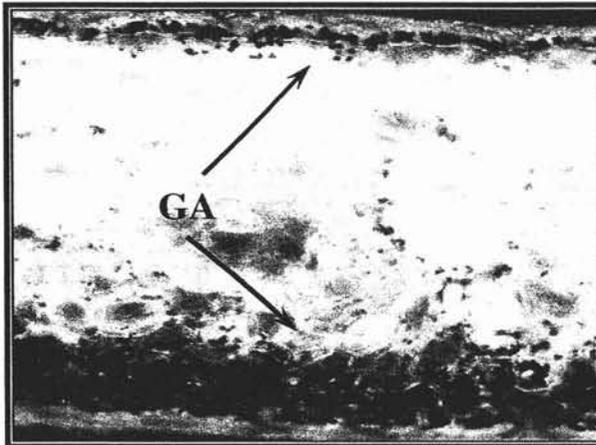


Fig.49 Corte transversal de hoja. Campo claro(66x).

GA: *Granos de almidón*

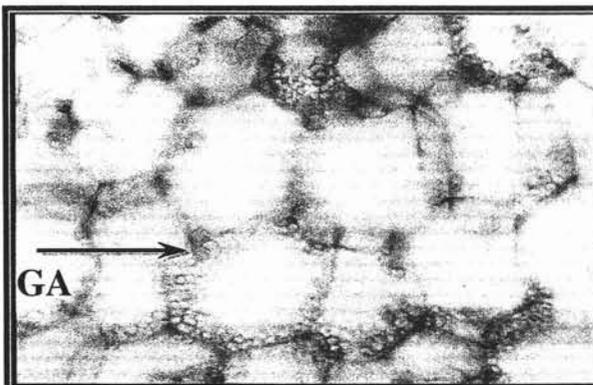


Fig. 50 Corte transversal de la parte basal de la hoja (vaina) teñida con lugol. Contraste de fases (33 X).

GA: *Granos de almidón*

II. B. ii. Morfología palinológica

Grano de polen.

Polen monosulcado (**Fig.51**). La longitud del eje polar mayor fue de $78\mu\text{ m}$ en vista polar distal y de $46\mu\text{ m}$ para el diámetro ecuatorial en vista polar. Prolado (**Fig.52 y 53**), la relación eje polar—diámetro ecuatorial fue de 1.70. Tectado (**Fig.54**), exina reticulada con lúmenes de tamaño variable con rango de $1\text{--}4\mu\text{ m}$, gránulos en la superficie del polen con rango de $0.3\text{--}3\mu\text{ m}$ (**Fig.55**) y muros simplicolumelados (**Fig.56**); extremos ecuatoriales con reticula con rango de $1\text{--}2\mu\text{ m}$ (**Fig.57**).

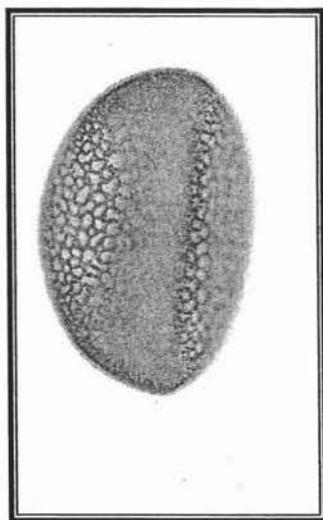


Fig.51 Campo claro, vista polar, (132 x).

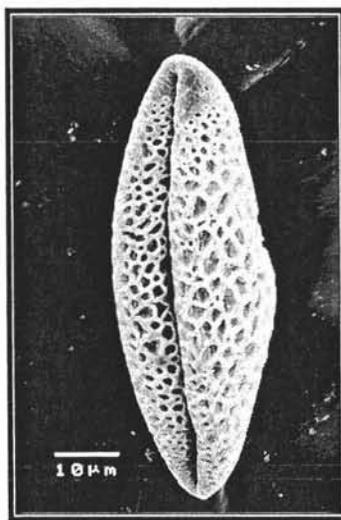


Fig.52 MEB. Vista polar distal, (1500 x).

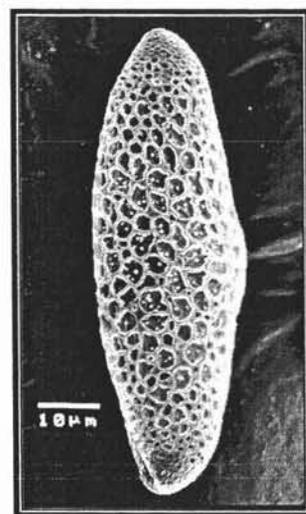


Fig.53 MEB. Vista polar proximal (1500 x).

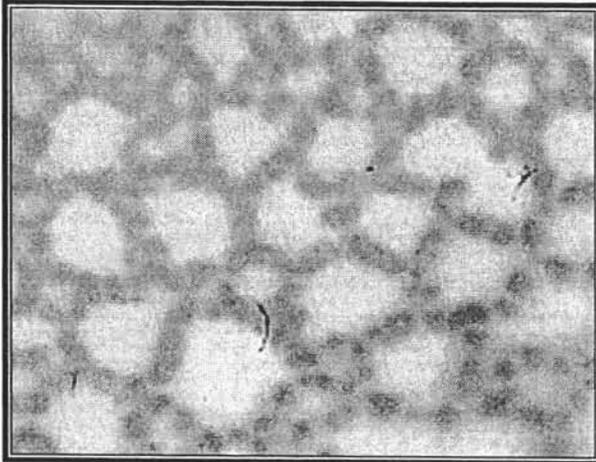


Fig.54 Superficie tectada, campo claro (330 x).

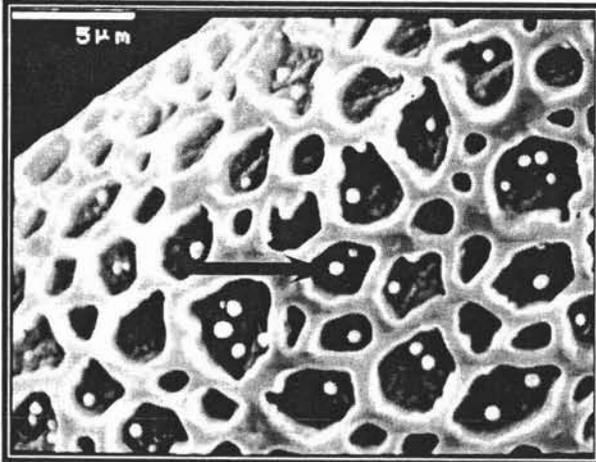


Fig.55 MEB, Superficie del polen (5000 x).

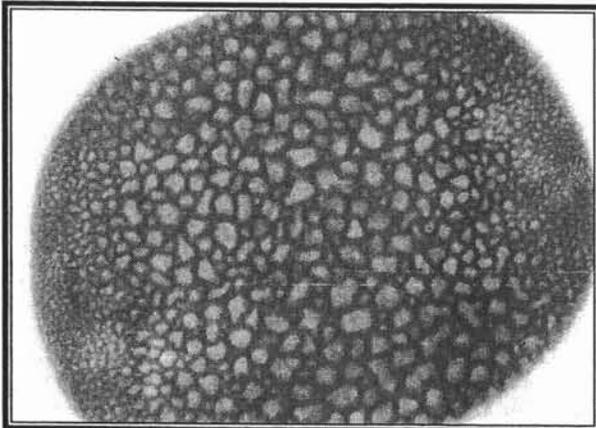


Fig.56 Polen, campo claro (330 x).

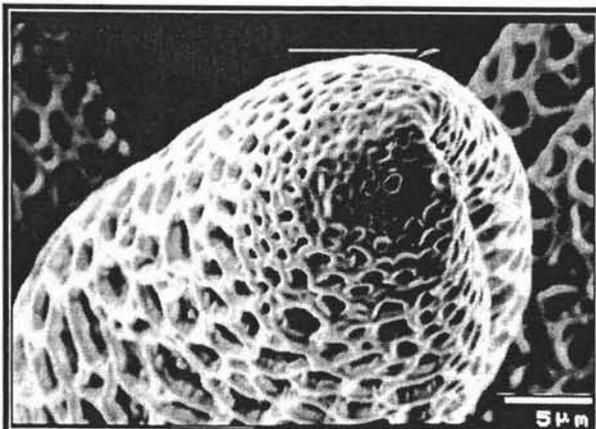


Fig.57 MEB, vista ecuatorial de un grane polen (3500 x).

II. C. Morfometría Foliar

II. C. i. Área foliar

El área foliar obtenida fue de 73.48 cm² y el área de la bráctea fue de 42.62 cm².

II. C. ii. Densidad de estomas y tricomas

Se encontraron diferencias significativas en la densidad estomática y tricomática pues la cobertura foliar mostró tener un gradiente inverso; así regiones donde la proliferación estomática fue mayor la densidad tricomática fue nula o poca y viceversa. La distribución de los tricomas fue creciente en la parte basal de la hoja (vaina) y esto se presentó en ambas caras (**Fig.58A**). Además, se observó una diferencia ligeramente mayor en la cantidad tricomática de la cara abaxial (3.2 ± 2.3) con respecto a la adaxial (2.3 ± 2.2) (**Fig.58B**) y se evidenció un gradiente significativamente mayor en la región basal respecto a las regiones media y apical, ya que dichas regiones presentaron una cantidad reducida de tricomas en comparación con la zona basal (**Fig.58C**).

La disposición estomática fue igualmente heterogénea, los estomas únicamente estuvieron presentes en la cara abaxial y su densidad fue significativamente mayor en la región apical respecto a las regiones media y basal, donde llegó a ser escasa (**Fig.59A**). El porcentaje estomático y tricomático por mm² y en el área foliar se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1.

Número, porcentaje y ocupación estomática y tricomática.

| | En 1 mm ² | | En el área foliar (cm ²) | |
|-------------------------|----------------------|---------|--------------------------------------|---------|
| | Adaxial | Abaxial | Adaxial | Abaxial |
| % Ocupación estomática | 0.00 | 2.84 | 0.00 | 2.84 |
| % Ocupación tricomática | 10.00 | 15.13 | 10.00 | 15.13 |

II. C. iii. Longitud estomática y tricomática

En ninguna de las caras (adaxial y abaxial) y regiones foliares (apical, media y basal) se encontraron diferencias significativas en la longitud estomática y tricomática. Debido a la homogeneidad de los datos. Ver Tabla 2.

TABLA 2.

Longitud tricomática y estomática.

| | Cara Abaxial | | | Cara Adaxial | | |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Apical | Media | Basal | Apical | Media | Basal |
| | (media ± SD) |
| Longitud Tricomática | 90.65 ± 5.13 | 92.10 ± 5.63 | 88.10 ± 7.35 | 82.65 ± 5.63 | 88.65 ± 7.91 | 86.65 ± 6.89 |
| Longitud estomática | 36.1 ± 2.48 | 36.88 ± 2.30 | 35.32 ± 2.98 | * | * | * |

* Para la cara adaxial no se observaron estomas.

II. C. iv. Grosor epidérmico apical en las caras abaxial y adaxial

Se establecieron diferencias significativas en el grosor de la epidermis, así el espesor epidérmico fue mayor en la cara adaxial (Fig.59.B).

II. C. v. Longitud del tallo tricomático en la parte basal

La longitud del tallo tricomático fue mayor en la cara adaxial en comparación con la cara abaxial (Fig.59.C).

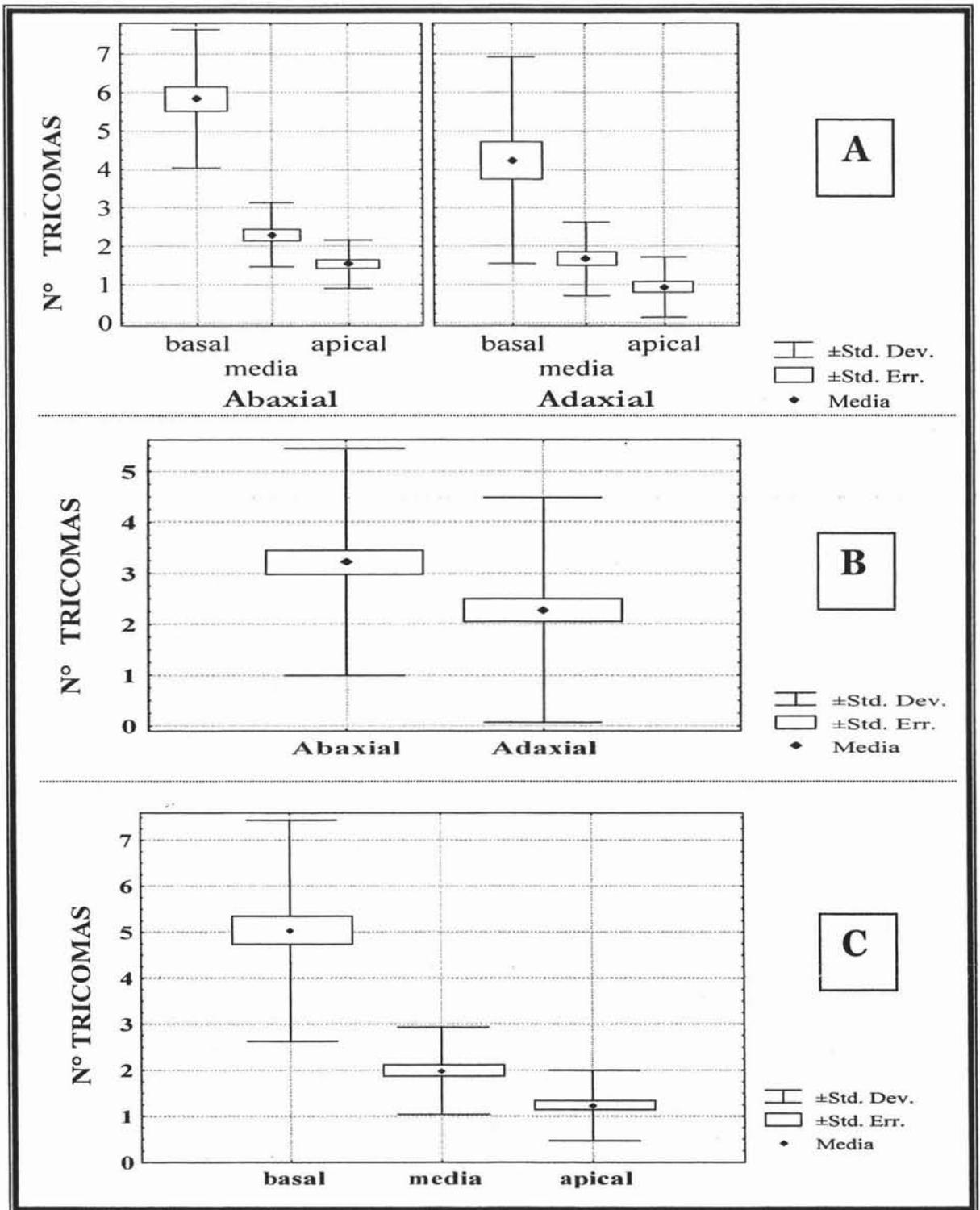


Fig. 58 Densidad de tricomas. La línea vertical indica el número de escamas o tricomas encontrados en el campo visual. A.) densidad tricomática foliar; B) densidad tricomática por c / cara; C) densidad tricomática por c / región foliar.

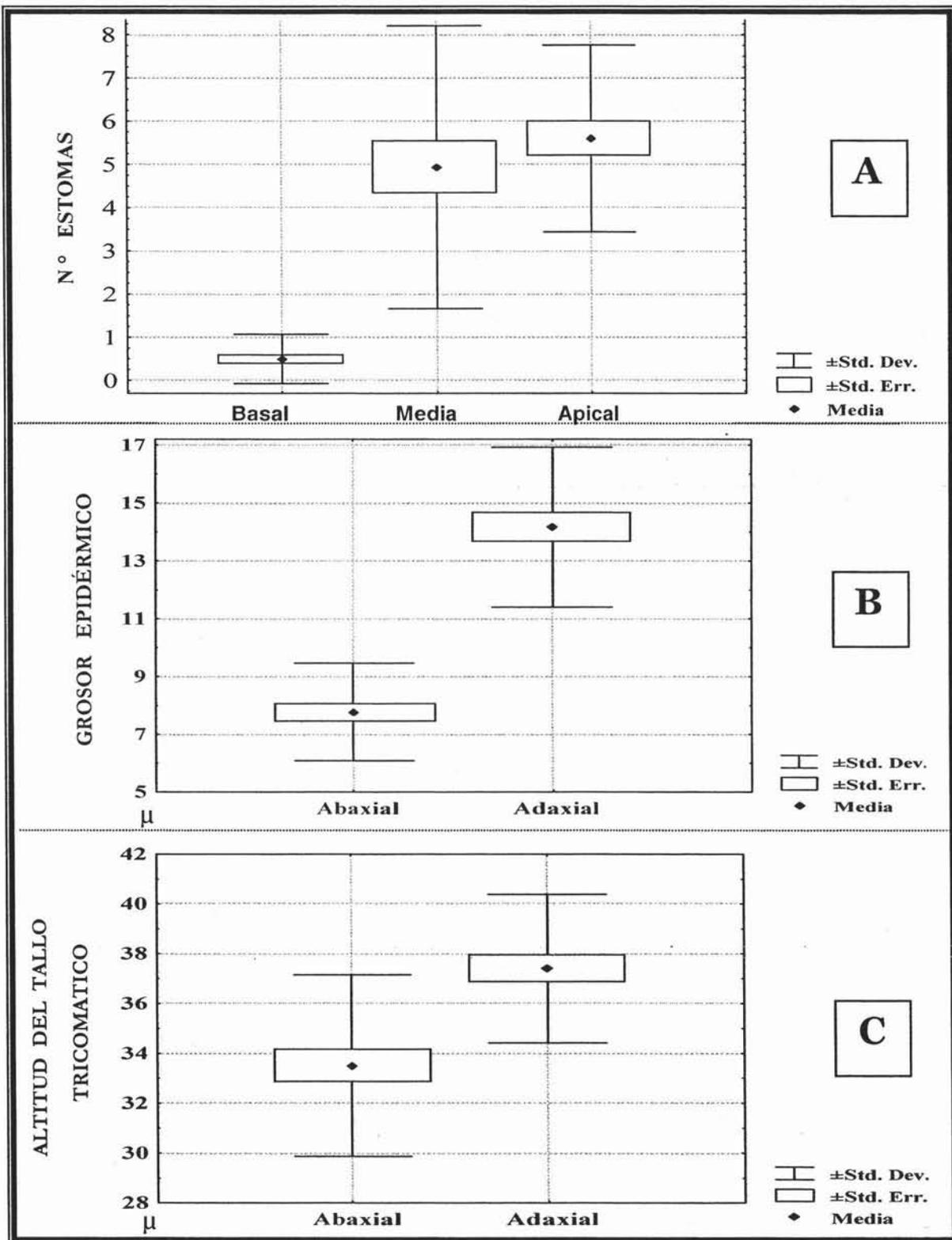


Fig. 59 Aspectos morfométricos. A.) Densidad estomática foliar [La línea vertical indica el número de estomas observados en el campo visual]; B) grosor epidérmico; C) longitud del tallo tricomático.

II. D. Estudio Farmacológico

II. D. i. Evaluación microbiológica

En la Tabla 3 se muestran los valores del rendimiento de cada uno de los extractos y los resultados de la evaluación antimicrobiana. El mayor rendimiento se obtuvo con el extracto metanólico, no obstante, los extractos de menor polaridad (hexano y diclorometano) fueron los de menor rendimiento, pero presentaron mayor actividad inhibitoria. De un total de seis extractos crudos para la exploración antimicrobiana, cinco tuvieron algún efecto inhibitor en uno o más cultivos bacterianos, sin embargo, ninguno mostró una actividad antifúngica en contra de *Candida albicans* y antibacterial para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* OPS (cepa de aislado clínico).

De las especies microbianas estudiadas la más sensible resultó ser *Staphylococcus aureus*, una bacteria Gram (+), la cual manifestó los valores más bajos de concentración mínima inhibitoria (CMI) con el extracto de hexano y de diclorometano de inflorescencia (CMI 0.5 mg/ml). No obstante, una buena actividad antibacteriana para *S. aureus* fue observada en la extracción hexánica foliar (CMI 4 mg/ml). La inhibición de *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* AHD (aislado clínico), bacterias Gram (+) fue provocada con el extracto hexánico de inflorescencia (CMI 8mg /ml). En contraste, las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi* ambas del tipo Gram (–) fueron las más susceptibles a la inhibición frente al extracto metanólico foliar y de inflorescencia (CMI 8mg /ml).

TABLA 3.Actividad antimicrobiana de los extractos de *Tillandsia imperialis*.

| Microorganismos | | Hojas | | | Inflorescencia | | |
|-----------------------------------|----|---------------------|------------------|----------------------|---------------------|------------------|----------------------|
| | | Hexano ^a | DCM ^b | Metanol ^c | Hexano ^a | DCM ^b | Metanol ^c |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | G+ | 4 | >8 | >8 | 0.5 | 0.5 | >8 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> -AHD | G+ | >8 | >8 | >8 | 8 | >8 | >8 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> -OPS | G+ | >8 | >8 | >8 | >8 | >8 | >8 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | G+ | >8 | >8 | >8 | 8 | >8 | >8 |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | G+ | >8 | >8 | >8 | 8 | >8 | >8 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | G- | >8 | >8 | 8 | >8 | >8 | 8 |
| <i>Salmonella typhi</i> | G- | >8 | >8 | 8 | >8 | >8 | 8 |
| <i>Escherichia coli</i> | G- | >8 | >8 | >8 | >8 | >8 | >8 |
| <i>Candida albicans</i> | | >8 | >8 | >8 | >8 | >8 | >8 |
| Rendimiento (%) | | 14.78 | 29.57 | 34.54 | 6.50 | 6.85 | 35.08 |

^a CH₃(CH₂)₄CH₃; ^b CHCl₂ (Diclorometano); ^c CH₃OH.

G+ = Gram positivo

G- = Gram negativo

DISCUSIONES

Los apéndices epidérmicos son diversos en las monocotiledóneas, pero los tricomas de las bromelias son los más fáciles de distinguir por su peculiar arreglo, forma y composición celular; la reunión de todas estas características constituyen atributos anatómicos esenciales en la delimitación y circunscripción de este taxa como lo señalan Tomlinson (1969) y Gardner (1982). Además estos caracteres presentan fácil disponibilidad para su estudio y se encuentran en todas las hojas bromeloides. Sin embargo, no son los únicos caracteres en proporcionar información útil para la taxonomía, la filogenia o la farmacognosia.

Aunque, sí se hallaron escamas asimétricas en la región basal (vaina), la proporción de éstas fue mínima comparada con los tricomas de arreglo simétrico. En *Tillandsia imperialis*, los tricomas peltados de la lámina y de la vaina coinciden con la simetría radial y con la disposición celular 4+8+32 descrita por Tomlinson (1969) para géneros bromeliáceos como *Catopsis*, *Glomeropitcairnia*, *Guzmania*, *Tillandsia* y *Vriesea*. En cuanto a los resultados morfométricos obtenidos, como son la densidad de tricomas y estomas por mm², éstos corresponden al de una bromelia tanque de acuerdo con el rango establecido por Benzing *et al*, (1978). Igualmente la anatomía de esta planta sigue el patrón descrito por varios autores para bromelias del tipo méxico. Sin embargo, la homogeneidad en la longitud tricomática (*) registrada en toda la cobertura foliar difiere con lo reportado para otras bromelias (Gardner, 1982) en donde la longitud y el arreglo de las células se modifica según la región foliar evaluada; en consecuencia y con base en los resultados obtenidos en este estudio, éste parámetro (longitud tricomática) podría permitir diferenciar a esta especie de otras del mismo género.

El estudio de las hojas mostró una distribución de las escamas tricomas a lo largo de la hoja, pero, ésta presentó una variación numérica de región a región (apical, media y basal), haciendo una disposición no uniforme sino regionalizada (heterogénea), pues las escamas proliferan más en la parte basal (vaina). De la misma forma ocurre con la densidad de estomas, pero éstos se ubican principalmente en la parte apical de la hoja (lámina) mientras un gradiente mayor de tricomas se exhibe en la parte basal (vaina). Esto significa que existe una

relación inversa: a mayor número de tricomas menor número de estomas y viceversa. Esto puede tener un significado fisiológico pues los estomas y el parénquima clorofílico se hayan ubicados en las zonas más expuestas a la radiación solar (region apical) donde pueden hacer un intercambio gaseoso óptimo pues en condiciones anegadas y oscuras no se favorece la apertura estomática y por lo tanto la entrada de CO₂ que se utiliza en la fotosíntesis.

En contraste los tricomas se localizan en las regiones basales donde el agua escurre de las partes apical y media para acumularse en los “tinacos foliares” donde además de agua se presentan sedimentos, los cuales son absorbidos por las escamas haciendo la función de la raíz.

El patrón estomático, tricomático y los demás estudios morfométricos establecidos para *T. imperialis* posiblemente no pueden ser generalizados para todas las poblaciones de esta especie pues las investigaciones de Gilmartin (1973), Castells y Najera, (1974), Gardner (1982), Martin *et al*,(1985) y Huidobro (1988) sugieren a las bromelias como especies susceptibles a variar algunos rasgos anatómicos por la influencia de factores ambientales como la radiación solar y la salinidad. No obstante, los datos morfométricos y anatómicos obtenidos en este estudio probablemente pueden definir a los individuos colectados procedentes del estado de Veracruz.

Así como los caracteres superficiales de la hoja son considerados útiles, de igual manera lo son las características estructurales encontradas en los cortes transversales, pues proveen numerosa información con valor taxonómico (Randford *et al*, 1974; Stace, 1980 y 1984 citados por Sanchez, 2000). Granos de almidón, cuerpos de sílice, catequinas, taninos condensados, e incluso antocianinas (**) son el material ergástico encontrado en *Tillandsia imperialis*. Cada uno de éstos se localiza en regiones muy específicas: así los cuerpos de sílice se hallaron principalmente en la epidermis abaxial contrastando con los depósitos hipodérmicos reportados para *T. andicola* (Baumert, 1907 citado en Prychid *et al*, 2004) y en cambio las antocianinas se distribuyen únicamente en la hipodermis (adaxial y abaxial). Además las antocianinas de las brácteas pueden distinguirse fácilmente de las apreciadas en

* La longitud tricomática es conocida también como diametro del escudo.

** Grupo de metabolitos secundarios perteneciente a los flavonoides.

las hojas debido al color, la intensidad, al patrón de pigmentación y a su ubicación morfológica-anatómica o largo de la hoja. Mientras los pigmentos de las brácteas poseen un patrón abaxial, uniforme y degradado, los foliares están constituidos por manchones distribuidos en ambas caras, pero sólo en ocasiones se forma un patrón ciánico homogéneo dispuesto en toda la cobertura foliar. Por lo tanto resultan igualmente importantes en la diagnosis de esta especie y de la familia tanto el tipo de compuesto químico presente como la distribución anatómica de éstos. Ciertos autores (Lee *et al*, 1979; Lee y Collins, 2001; Lee, 2002) emplean la disposición anatómica de los flavonoides para realizar estudios filogenéticos con diversas familias del trópico, de la misma manera Whang *et al*, (1998) y Prychid *et al*, (2004) usan a los fitolitos para la taxonomía de las monocotiledóneas con especial interés en Poaceae.

Los trabajos palinológicos hechos para la familia Bromeliaceae son escasos, pero los pocos realizados son muy detallados (Erdtman y Pragłowski, 1974; Habritter, 1992). Sin embargo, las características descritas en éstos son raramente utilizados como caracteres dentro del análisis cladístico a pesar de que taxónomos como Proença y Sajo, (2004) señalan la necesidad de estudios detallados del polen, pues puede ser un carácter con alto valor taxonómico para esta familia. En contraste, el polen de las familias Annonaceae, Magnoliaceae y Winteraceae (Walker, 1972), sí se emplea como herramienta útil para la construcción de árboles filogenéticos. Es por ello que las características palinológicas observadas mediante la acetólisis y el análisis de las microfotografías de M.E.B. constituyen elementos anatómicos importantes en la validación de la especie desde el punto de vista farmacognóstico y sistemático. Aunque es la primera vez en realizarse una descripción del polen para esta especie, la información recabada permite corroborar su posición taxonómica pues concuerda con la palinología descrita por Habritter, (1992) para especies relacionadas del subgrupo *Tillandsia*.

Pocos son los trabajos enfocados en comprobar la autenticidad de las bromelias, sin embargo, es necesario realizar ensayos botánicos de valoración macromorfológica y micromorfológica para evitar la falsificación de cualquier material vegetal de uso medicinal como sucede en ciertos tianguis o mercados (Centeno, 2005). La descripción microscópica realizada mediante estudios anatómicos como los realizados por Alcántara (2002), Zárate

(2002) y Zlotnik (1993) han permitido la caracterización de las partes vegetales de algunas especies empleadas en la medicina tradicional mexicana garantizando así el grado de pureza y autenticidad de éstas. Es por ello que los resultados obtenidos en este trabajo sirven de referencia para la idoneidad de la especie ya sea total o parcial, pues los estudios estructurales, histoquímicos y los macroscópicos permiten establecer parámetros cualitativos y cuantitativos siguiendo las normas establecidas por la OMS y la Secretaría de Salud (2001). No obstante, se aprecian diferencias anatómicas dependiendo de la región foliar estudiada, por ejemplo el parénquima clorofílico y estomas se presentan en la parte apical, las fibras vasculares se engruesan al acercarse a la vaina; por lo cual es indispensable la exploración estructural completa de las partes medicinales estudiadas y no sólo de pequeñas muestras (apical o basal, pecíolo, lámina, cortex), porque no representan la totalidad del estudio y los resultados parciales pueden provocar errores en la identificación pues en muchas ocasiones la venta de las plantas medicinales es fragmentada, pulverizada o parcial.

Los estudios fitoquímicos y farmacológicos del género *Tillandsia* son escasos (Cantillo-Ciau *et al*, 2001; Vasconcelos *et al*, 2004) y no existen en la literatura reportes etnofarmacológicos relacionados con esta especie. No obstante, la mayor parte de las investigaciones fitoquímicas realizadas con bromelias se centran en el género *Ananas* y *Bromelia* en donde los principales compuestos y metabolitos secundarios aislados son alcaloides, enzimas proteolíticas como la bromelina, flavonoides como las antocianinas, triterpenos y esteroides (Córdoba *et al*, 2000).

El estudio farmacológico mostró que la actividad biológica depende tanto de la parte vegetal como del tipo de disolvente empleado. Observamos que dependiendo de la parte vegetal utilizada la actividad farmacológica es distinta; mientras los extractos foliares resultaron ser en su mayoría inocuos, los extractos de la inflorescencia resultaron ser los más activos frente a las bacterias. Quizá la actividad antimicrobiana resultante de la inflorescencia se debe a metabolitos secundarios no presentes en la hoja. Investigaciones de las primeras décadas del siglo XX (Gertz, 1906 y Lawrence, 1938; citados en Smith y Downs, 1974) señalaban metabolitos secundarios como las antocianinas localizadas y sintetizadas únicamente en ciertas partes de la planta como lo son brácteas y hojas.

Aunque los extractos metanólicos (mayor polaridad) presentaron el mayor rendimiento, ninguno exhibió un efecto antimicrobiano significativo; los extractos hexánico (polaridad baja) y diclorometánico (polaridad intermedia), sí tuvieron una marcada actividad inhibitoria en contra de *Staphylococcus aureus*, una bacteria Gram (+). Por lo tanto, la obtención de los principios responsables del efecto biológico depende en gran medida del disolvente seleccionado y, por consiguiente, los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana presentes en *T. imperialis* fueron aislados mediante los solventes de hexano y diclorometano. Esta especie puede considerarse como una fuente de compuestos con actividad antibacteriana.

El hecho de que extractos crudos de polaridad baja hayan tenido una fuerte acción inhibitoria específica para *Staphylococcus aureus* (CMI de 0.5 mg/ml), resulta muy importante al considerar que esta especie de bacteria es la más virulenta de su género y el agente patógeno principal del ser humano causal de una amplia gama de enfermedades en las vías respiratorias como la neumonía, enfermedades endovasculares, infecciones dérmicas como la celulitis, articulaciones y del envenenamiento de alimentos. Además ocasiona la mayor parte de las enfermedades nosocomiales (Melles *et al*, 2004). En este sentido resulta de especial importancia el hecho de que el extracto de la inflorescencia haya sido capaz de inhibir a la cepa aislada en la clínica.

El estudio farmacológico realizado corrobora el uso etnobotánico de la medicina tradicional mexicana reportado por Chino y Jacquez (1986) donde se le menciona para el tratamiento de enfermedades relacionadas con las vías respiratorias como la tos y la tos ferina; éste último usado en un brebaje compuesto. La planta constituye una posible alternativa terapéutica frente a las enfermedades respiratorias, en especial las causadas por *S. aureus*; bacteria que posee cepas resistentes a ciertos fármacos.

Resultaría interesante hacer estudios farmacológicos de los múltiples ingredientes del brebaje mencionado por Chino y Jacquez (1986), y así conocer si la acción terapéutica para curar las afecciones respiratorias se debe a los principios activos de algún ingrediente o si el efecto producido es resultado de la sinergia compleja de las diversas sustancias empleadas.

CONCLUSIONES

- De todo el conjunto de atributos estructurales estudiados para *T. imperialis*, los elementos anatómicos más importantes que permiten definir la identidad foliar fueron:
 - I. El material ergástico presente (taninos, antocianinas, granos de almidón);
 - II. Una hipodermis no esclerótica;
 - III. Cuerpos silíceos;
 - IV. Estomas;
 - V. Tricomas.

- Los tricomas son de alto potencial para la identificación de la especie por distribuirse en toda la cobertura foliar. Por lo que los diversos parámetros obtenidos para este carácter (el arreglo 4+8+32, la longitud tricomática y la longitud del tallo tricomático así como la distribución) son de gran utilidad en la caracterización del material vegetal.

- El estudio farmacológico mostró que los extractos crudos con una actividad inhibitoria mayor fueron los de inflorescencia.

- El estudio antimicrobiano reveló la existencia de una actividad inhibitoria mayor sólo para *Staphylococcus aureus* con los extractos diclorometánico y hexánico (CMI 0.5 mg/ml). Sin embargo, se obtuvieron buenos resultados inhibitorios (CMI 8 mg/ml) para bacterias Gram (+) como *Staphylococcus aureus* AHD (aislado clínico), *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus faecalis*.

- Debido a que *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* son frecuentes agentes causales de enfermedades respiratorias, el estudio farmacológico valida el conocimiento de la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de afecciones respiratorias. Por lo tanto *Tillandsia imperialis* sí posee actividad biológica propia dentro de los ingredientes presentes en el brebaje utilizado para curar afecciones respiratorias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams III., W y Martin, C. 1986. Morphological changes accompanying the transition from juvenile (atmospheric) to adult (tank) forms in the mexican epiphyte *Tillandsia deppeana* (Bromeliaceae) *American Journal of Botany* 73(8):1207-1214
- Adrian-Romero, Maricela, Blunden, Gerald. (2001) Betaine distribution in the Bromeliaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* (29) 305-311.
- Aguirre-León, E. 1992. Vascular epiphytes of Mexico: a preliminary inventory. *Selbyana* 13: 72-76.
- Alcántara, F. E. 2002. Estructura e histoquímica de las partes vegetales usadas en medicina tradicional de *Talauma mexicana*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 40 pp.
- Arambarri, A. M. y Mandrile, E. L. 1999. *Tillandsia* L.(Bromeliaceae): Anatomy and ethnopharmacology. *Acta Horticulturae*. (ISHS) 503:133-140.
- Arellano M, J. 2004. Las bromeliaceae del estado de Oaxaca uso y comercialización en los mercados. *Memorias XVI Congreso Mexicano de Botánica*, Oaxaca, Oaxaca Octubre 17-22.
- Argueta, V. A., Cano, A. J. y Rodante, M. 1994. *Atlas de las Plantas medicinales tradicionales mexicanas*. Instituto Nacional Indigenista, México, 1786 pp.
- Barba de Piña, C. 2002. Diabetes y medicina tradicional en México. *Ciencia*. 53 (3): 18-23.
- Benzing, D. 1976. Bromeliad trichomes: structure, function, and ecological significance. *Selbyana*, 1: 330-348
- Benzing, D. 1980. *The biology of the bromeliads*. Edit: Mad River Press. Eureka. EUA. California, pp:305.
- Benzing, D. 2000. *Bromeliaceae. Profile of an adaptive radiation*. Cambridge University Press. 690 pp.
- Benzing, D.H. y Friedman, W.E.. 1981. Patterns of foliar pigmentation in Bromeliaceae and their adaptive significance. *Selbyana* 5 (3-4): 224-240.
- Benzing, D., Seemann, J. y Renfrow, A. 1978. The foliar epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and its role in habit selection. *American Journal of Botany*. 65(3):359-365.

- Beutelspacher, C. 1971. La especie *Aechmea bracteata* (Swartz) Griseb, (Bromeliaceae) considerada como ecosistema. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 123 pp.
- Billings, F. 1904. A study of *Tillandsia usnoides*. *Botanical Gazette* 38(1-3): 99-121
- Brown, G. y Gilmartin, A. G. 1989. Chromosome numbers in Bromeliaceae. *American Journal of Botany*. 76(5):657-665.
- Bruneton, J. 1999. *Pharmacognosy: phytochemistry medicinal plants*. Lavoisier Publishing USA, 1119 pp.
- Byrd, A. 1992. *Tropica. Color Cyclopedia of exotic plants and trees*. 4 ed. Roehrs company. EUA. 1155 pp.
- Camacho-Hernández, I., Chávez-Velazquez, J., Uribe-Beltrán, M., Ríos-Morgan, A. y Delgado-Vargas, F. 2002. Antifungal activity of fruit pulp extract from *Bromelia pinguin*. *Fitoterapia*. 73: 411-413.
- Cantillo-Ciau, Z., Brito-Loeza, W. Y Quijano, L. 2001. Triterpenoids from *Tillandsia fasciculata*. *Journal of Natural Products* 64, 953-955.
- Castañeda-Aguillo, Del Castillo, M., Cruz, M., Chaves, E., Soriano, M., y Garduño R. 1974. Proteinases de plantas mexicanas II- Puntos isoeléctricos y caracterización de formas moleculares múltiples de enzimas bromeliaceae. *Revista Latinoamerica de Química*, 5, 243.
- Castells, A y Najera, M. 1974. Anatomía de las especies argentinas del género *Bromelia* (Bromeliaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. Vol XVI (1-2):66-78.
- Centeno, B.L., León, G.C., Laguna, H., Brechú, A. 2004. Caracterización histológica de la madera de muestras de guayacán de cuatro mercados del D.F. *Memorias XVI Congreso Mexicano de Botánica*, Oaxaca, Oaxaca Octubre 17-22.
- Córdoba, F., Pérez-Campos, E y Magaña, P. 2000, "Bromeliaceae" en Avalos, J y Marbach, H.(comps.), *Dermatologic Botany. Dermatology: clinical and basic science*. CRS Press. EUA. pp: 34-363.
- Chazaro, M. 1987. Notas sobre algunas bromeliaceas del centro de Veracruz y zona limitrofe de Puebla. *Cactáceas Suculentas Mexicanas* XXXII (2): 27-37.
- Chazaro, M. 1988. *On the bromeliads of central Veracruz and adjacent parts of Puebla, México*. *Journal of Bromeliad Society* 38 (2): 195-199, 205-209

- Chino, V. y Jácquez, R. 1986. Contribución al conocimiento de la flora medicinal de Quimixtlán, Puebla. Tesis de licenciatura. ENEP-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 344 pp.
- Dahlgren, R. M. Clifford, H. T. y Yeo, P. F. 1985. *The families of the monocotyledons: structure, evolution and taxonomy*. Springer- Verlag-Berling. 520 pp.
- Davidse, G., Sousa, S. y Chater, A. 1994. *Flora Mesoamericana*. Volumen 6. Alismataceae a Cyperaceae. UNAM.
- Erdtman, G. y Praglowski, J. 1974. A note on pollen morphology. *En: Smith, L. B., Downs, R.J. Bromeliaceae. Flora Neotropica*, Harfner Press, Nueva York, Monogr. 14 (1): 28-33.
- Espejo, A. & A. R. López-Ferrari. 1994. Las Monocotiledóneas Mexicanas, una sinopsis florística. 1. *Lista de Referencia, parte III. Bromeliaceae, Burmanniaceae, Calochortaceae y Cannaceae*. Consejo Nacional de la Flora de México, A. C., Universidad Autónoma Metropolitana y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. 74 p.
- Espejo, A. & A. R. López-Ferrari 1998. Current floristic and phytogeographic knowledge of Mexican Bromeliaceae. *Revista de Biología tropical* 46: 3.
- Espejo, A. & A. R. López-Ferrari. 1999. Mexican Bromeliaceae: diversity and notes on their conservation. *Harvard Papers in Botany*,. 4 (1): 119- 128.
- Estrada, E. 1992. Perpéctiva interdisciplinaria en la investigación etnobotánica a partir del servicio: Plantas medicinales. *En: Plantas medicinales de México. Introducción a su estudio*. UACH, 566 pp.
- Evans, T. y Brown, G. 1989. Stomata in *Tillandsia bryoides*. *Journal of Bromeliad Society*. 39(2):58-61.
- Flores, C. Ma. 1998. Flora genérica de la familia Bromeliaceae en el Estado de México. Manual para la identificación de las especies de la familia Bromeliaceae presentes en el estado. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 186 pp.
- Flores, V. Eugenia. 1971. Estudio comparativo de la anatomía foliar de dos especies de Bromeliaceae: *Hechtia glomerata* Zucc. y *Aechmea mexicana* Baker. Facultad de Ciencias y Letras, Universidad de Costa Rica. Costa Rica, 63pp.
- García, E. I. 2002. *Catálogo de plantas medicinales de un mercado de la ciudad de Puebla*. Gobierno del estado de Puebla. México, 211pp.

- García-Franco, J. 1987. *Las bromelias de México. Revisión bibliográfica y de herbario*. INIREB, Xalapa, 96 pp.
- Gardner, C. S. 1982. *A systematic study of Tillandsia subgenus Tillandsia*. Ph. D. Thesis. Texas A & M. University , Corpus Cristi, pp 305.
- Gardner, C. S. 1986a. Inferences about pollination in *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Selbyana* 9(1): 76-87.
- Gardner, C. S. 1986b. Preliminary classification of *Tillandsia* (Bromeliaceae) based on floral characters. *Selbyana* 9(1): 130–146.
- Gilmartin, A. J. 1973. Transandean distribution of Bromeliaceae in Ecuador. *Ecology* 54:1389- 1393.
- Granados, M. C. 2005. Estudio taxonómico del género *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) en la Sierra de Juárez (Oaxaca, México). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 122 pp.
- Guié-Natividad, M., Guzmán, F. C., Camacho, M. R., Cruz, F., Miguel, L.E., Díaz, H. J., Albavera, M. R. y Vela, O.I. 1999. *Manual, riesgos y beneficios en el uso de plantas medicinales del rincón zapoteca*. Fundación mexicana para la salud, México. 124 pp
- Habritter H. 1992. Morphologie und systematische des pollens der Bromeliaceae. *Grana* 31: 197-212.
- Hiertz, P y Hiertz-Seifort, U. 1994. *Epífitas de Veracruz. Guía ilustrada para las regiones de Xalapa y los Tuxtlas, Ver.* Instituto de Ecología, México, 236 pp.
- Hoen, P. 2005. *Glossary of Pollen and Spore Terminology*, 2º edición. Holanda. <<http://www.bio.uu.nl/~palaeo/glossary/>> [Consulta 12 de Enero del 2005].
- Huidobro, S. M. E. 1988. El género *Tillandsia* (Bromeliaceae) en el Estado de México. Tesis de licenciatura. FES– Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 103 pp.
- Jensen, W. A. 1962. *Botanical Histochemistry, principles and practice*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. Mc Graw-Hill, Book company. Inc Nueva York y Londres.

- Kornerup, A. y Wanscher, J. H. 1963. *Methuen Handbook of colour*. Ed. Eyre Methuen. Londres, 252 pp.
- Krauss, B. 1948. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. *Botanical Gazette* 110 (2): 159-217.
- Kuklinski, C. 2000. *Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Omega, España, 515 pp.
- Lee, D. W., Lowry, J. B. y Stone, B.C. 1979. Abaxial anthocyanin layer in leaves of tropical rain forest plants: enhancer of light capture in deep shade. *Biotropica* 11(1): 70-77.
- Lee, D. W. y Collins, T. M. 2001. Phylogenetic and ontogenetic influences of the distribution of anthocyanins and betacyanins of tropical plants. *International Journal of Plant Science* 162 (5):1141-1153.
- Lee, D. W. 2002. Anthocyanins in Leaves: distribution, phylogeny and Development. En: Gould, K. S. y Lee, D. W. (Eds). *Advances in Botanical Research*. Incorporating advances in plant pathology. Vol. 37 .Academic Press, Inglaterra, pp 37- 53.
- Lévaro, E. J. 2000. Determinación de la actividad antimicrobiana de algunas especies utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de afecciones respiratorias. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, 58 pp.
- Longley, D. 1996. Bromeliad leaf forms. *Journal of Bromeliad Society* 46 (1): 16-18
- López-Curto, Ma., Márquez, J. y Murguía, G. 1998. *Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas*. Libro de laboratorio. Facultad de Ciencias, UNAM. México 116 pp.
- Luther, H.E. and E. Sieff. 1994. De rebus Bromeliacearum I. *Selbyana* 15(1): 9-93.
- Martin, C., McLeod, K., Eades, C., y Pitzer, A. 1985. Morphological and physiological responses to irradiance in the cam epiphyte *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae). *Botanical Gazette* 146(4):489-494
- Martínez, M. 1979. *Catalogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. FCE. México. pp: 1220.
- Matuda, E. 1979. Las Bromeliáceas. En : *Flora del Estado de México*. Comisión Botánica Exploradora del Estado. Tomo III. Biblioteca Enciclopédica del Estado de México, pp 46-91.

- Mata, P; Méndez, G., Marmalejo, M., Tascón, M., Zurita, E., Galindo, M., y Lozano, M. 1994. *Diccionario enciclopédico de la medicina tradicional mexicana*, Tomo II. INI.
- Matuda, E. 1956. Iconografía de las Bromeliáceas mexicanas. *Cactáceas Suculentas Mexicanas ICA*. 7: 77-78.
- McGaw, L. J., Jäger, A. K., y van Stauden, J. 2000. Antibacterial, anthelmintic and anti-amoebic activity in South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 72 (1,2)247-263.
- McLaughlin, J. y Witheraup, K. 1995. Identification of 3-Hydroxy-3-methylglutaric acid (HMG) as a hypoglycemic principle of spanish moss (*Tillandsia usneoides*). *Journal of Natural Products* 58 (8):1285-1290.
- Mc Vaugh, R. 1989. *Flora Novo Galiciana: a descriptive account of the vascular plants of western Mexico*. Vol. 15. Bromeliaceae To Dioscoriaceae. Arbor, EUA, 398 pp.
- Mellado, V., Sánchez, R., Femia, P., Navarro, M., Erosa, S., Contreras, B. y Domínguez, H. 1994. *La medicina tradicional de los pueblos indígenas*. Tomo II. INI. Pp: 525,560-561, 642-643.
- Melles, D., Gorkink, F.J., Boelens, A.M., Snijders, S. V., Peeters, J. K. Moorhouse, M., Spek, Peter J. van der., Leeuwen, Willem B. van, Simons, G., Verbrugh, H., Belkum1, Alex van. 2004. Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*. 114 (12): 1732-1740.
- Morales, F. y Cooper, A. W. 1999. *Bromelias de Costa Rica*. INBio/NORAD. Costa Rica. Ed. Mundo Gráfico. 176 pp.
- Nigenda, G., Mora-Flores, G., Aldama-Lopez, S., y Orozco-Nuñez, E. 2001. La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre la regulación y tolerancia. *Salud Pública de México*, 43: 41-51.
- Organización Mundial de la Salud. 2000. *Situación Reglamentaria de los Medicamentos: Una Reseña Mundial*. OMS. Genova, 60 pp.
- Organización Mundial de la Salud. 2002. *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005*. Ginebra, OMS, 65 pp.
- Ortega, E., y García, R. 1986. *Manual de prácticas de Laboratorio de Fisiología Vegetal*. Editorial Pueblo y educación. Cuba, 196 pp.
- Padilla, V. 1986. *Bromeliads a descriptive listing of the various genera and species most often found in cultivation*. Crow Publishers. EUA.

- Patel, J. D. 1979. A new morphological classification of stomatal complexes. *Phytomorphology* 29(3-4): 218-229.
- Pierce, S., Maxwell, K., Griffiths, H., y Winter, K. 2001. Hydrophobic Trichome layers and epicuticular wax powders in Bromeliaceae. *American Journal of Botany* 88 (8): 1371- 1389.
- Proença, L.S., y Sajo, M. 2004. Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav.(Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 18 (2): 319-331.
- Prychid, C., Rudall, P., y Gregory, M. 2004. Systematics and biology of silica bodies in monocotyledons. *The Botanical Review* 69(4):377-440.
- Richter, W. 1965. Zimmerpflanzen von heute und morgen Bromeliaceen. Ed. J.Neumann.Neudamm, 380 pp.
- Rojas, G., Lévaro, J., Tortoriello, J., y Navarro, V. 2001. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 74 (2001) 97-101.
- *Salud Pública de México*. 2004. 46(2): 169-186.
- Sanchez Dirzo, M. 2000. Estudio químico, botánico y actividad antibacteriana de dos cultivos de *Rosmarinus officinalis* L. Tesis de maestría (Biología). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Secretaria de Salud. 2001. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Secretaria de Salud, México.
- SEMARNAT. Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000. <<http://www.semarnat.gob.mx/pfr>> [Consulta 2 de Mayo del 2004].
- Sevilla, R. L.1983. Resistencia a la sequía, índice estomático, forma, tamaño y distribución de estomas en cuatro cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 105pp.
- Smith, L.B. y Downs, R. J. 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). En: *Flora Neotropica*, Hafner Press, Nueva York. Monogr. 14 (1):1-662.
- Smith, L.B. y Downs, R. J. 1977. Tillansioideae (Bromeliaceae). En: *Flora Neotropica*, Hafner Press, Nueva York. Monogr. 14 (2): 663-1492
- Smith, L.B. y Downs, R. J. 1979. Bromelioideae (Bromeliaceae). En: *Flora Neotropica*, Hafner Press, Nueva York. Monogr. 14 (3): 1493-2142.

- Smith, L.B. y Till, W. 1998. Bromeliaceae En: Kubitzki, K., Huber, H., Rudall, P.S. y Stützel, T. *The families and genera of vascular plants*. Ed. Springer. Alemania, 511 pp.
- Solórzano-Santos, F y Miranda-Morales, M. C. 1998. Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos. *Salud pública de México*. 40(6): 510-516.
- Sosa, G. R. 1997. *El poder medicinal de las plantas*. APA. México. 384 pp.
- WHO. The World Health Report, 1998. *Live in the 21st Century a vision for all world*. Health Organization, Genova, France.
- Tomlinson, P.B. 1969. *Anatomy of the monocotyledons III. Commelinales-Zingiberales*. Clarendon Press, Oxford. U.K. 446 pp.
- Trease, G. E. y Evans, W.C. 1988. *Tratado de Farmacognosia*. Interamericana, México. 846.
- Tyler, V. E., Brady, L y Robbers, J. 1979. *Farmacognosia*. El ateneo, Argentina, 459 pp.
- Vasconcelos, L. E., de Queiroga, M., de Andrade, L. M., Chagas, F. K., de Fatima, A. Ma., Sobral, M., Barbosa-Filho, J. 2004. Chemical constituents from *Tillandsia recurvata*. *Fitoterapia* 75(2004) 423-425.
- Villaseñor, J. L. 2004. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 105-135.
- Werner, R. 1979. *Bromeliads for home, garden and greenhouse*. Blandford Press. Inglaterra.
- Whang, S., Kim, K. y Hess, W. 1998. Variation of silica bodies in leaf epidermal long cells within and among seventeen species of *Oriza* (Poaceae). *American Journal of Botany*, 85(4): 461-466.
- World Health Organization, 1998. *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*. WHO Geneva (35 Swiss Francs).
- Zárate, R. E. 2002. Caracterización histológica de la flor de manita *Chirathodendron pentadactylon* Laur (Sterculiaceae) usada en la medicina tradicional. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Zlotnik, E. A. 1993. Anatomía de las plantas medicinales. Parque Ecológico de Xochimilco En: *Primer seminario internacional de Investigadores de Xochimilco*, Tomo II. Ed (Stephen-Otto)787 pp.