



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PRUEBAS DE IDENTIDAD Y PUREZA PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE DOS DROGAS VEGETALES MEDICINALES: *Verbena carolina* L. (Verbenaceae) y *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake (Asteraceae).

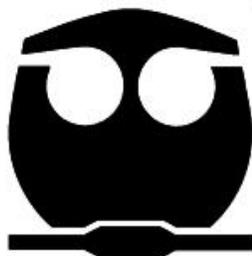
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MARCO ANTONIO AGUILA BORUNDA



MEXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	Dra. Yolanda Caballero Arroyo
VOCAL:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
SECRETARIO:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
PRIMER SUPLENTE:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
SEGUNDO SUPLENTE:	M.en C. Abraham Madariaga Mazón

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS:

Laboratorio 125 del Departamento de Farmacia, conjunto "E", División de Posgrado de la Facultad de Química; Laboratorio de Apoyo a la Investigación del Instituto de Biología en el Jardín Botánico y Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM, Ciudad Universitaria.

ASESOR

Dra. María Isabel Aguilar Laurents

SUPERVISOR TECNICO

Dra. Estela Sandoval Zapotitla

SUSTENTANTE

Marco Antonio Aguila Borunda

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó mediante el apoyo otorgado a través de las siguientes personas y lugares:

- A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por brindarme los medios necesarios para tener una formación integral así como los recursos necesarios para la realización de este proyecto.
 - A la Dirección General de Asuntos Personales (DGAPA) por el apoyo económico mediante el proyecto IN210709.
 - A la Dra. Estela Sandoval Zapotitla y a la Biól. Conchita Guzmán del Laboratorio de Apoyo a la Investigación del Jardín botánico, por el soporte técnico brindado en las técnicas histológicas e histoquímicas para la identificación anatómica microscópica del material vegetal, gracias por brindarme su amistad y consejos; así como a Barbarita y a Alicia.
 - A la M. en C. Rosa María Ramírez Gama y a la QFB. Ma. Guadalupe Tsuzuki Reyes del Laboratorio de Microbiología Experimental por su asesoría y apoyo técnico en la determinación de microorganismos en el material vegetal.
 - Al Profesor Alejandro Camacho del cepario de la Facultad de Química por aportar las cepas bacterianas de referencia.
 - Al personal académico de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI), M. en C. Georgina Duarte Lisci, Q. Margarita Guzmán Villanueva, M. en C. Rosa Isela del Villar Morales, QFB Marisela Gutiérrez, Q. Alejandrina Acosta Huerta y Dra. Nuria Esturau por el registro de los espectros para el análisis de espectroscopía.
 - A la Dra. Liliana Saldívar y María Teresa Rodríguez Salazar del Departamento de Química Analítica, por la determinación de metales pesados a través de los experimentos de absorción atómica.
-
-

-
-
- A las M. en C. Margarita Avilés y Macrina Fuentes del Herbario del Instituto Nacional de Antropología e Historia de Morelos. Por la identificación del material vegetal objeto de este estudio (*V. carolina*).
 - Al M. en C. Ramiro Ríos Gómez de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por la aportación e identificación botánica del material vegetal (*H. longipes*).
 - A la Dra. María Yolanda Ríos Gómez por la aportación de la muestra de referencia de afinina.
 - A los miembros del jurado por sus invaluable comentarios durante la revisión de esta tesis.
 - Un agradecimiento especial a la Dra. Isabel Aguilar Laurents, sin su apoyo y compromiso, la realización de este proyecto no hubiera sido posible. Gracias por el tiempo dedicado para la culminación de este proyecto y sobre todo, gracias por cada uno de sus consejos.
 - A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, quien a pesar de nunca haber sido mi profesora me abrió las puertas de su laboratorio y me brindo su amistad. También quiero darle las gracias a mis amigos de lab 114: Pau, Viry Zu, Fernando, Viry Lu, Sam y Viri Calzada.
 - Por último y no menos importante, quiero agradecer a cada uno de mis amigos y compañeros del laboratorio que hicieron mi estancia más agradable y quienes siempre me mostraron su apoyo: Dra. Elena Ramírez, Dr. Eugene Bratoeff, M. en C. Yazmín Arellano, Mariana, Alejandra, Alex, Félix, Iván, Alán, Ileana, Ana y José Alfredo. Mención especial tienen Marcela, Juan Carlos, Dulce, Iraís y Arturo, al llegar al laboratorio fueron las personas que más me apoyaron y brindaron su amistad desde un inicio.
-
-

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al final de esta etapa, llega el momento de hacer un balance y reconocer que no tengo más que agradecerle a la vida y a Dios por todo el amor que me rodea y porque tengo todo el potencial para ser y hacer lo que yo quiero.

Durante todo este camino, me he visto rodeado de muchas personas que me han amado y aportado conocimiento, pero nadie como mis padres. Cada uno de mis logros son también suyos, sin su apoyo incondicional y amor, yo no habría llegado a este momento. Ustedes son uno de mis más grandes motivos para sentirme orgulloso, gracias por enseñarme que la vida se gana poniendo siempre lo mejor de uno. Gracias porque no tengo duda que lo mejor de mi es gracias a ustedes. Los amo.

José Luis, mi hermano y mi amigo, gracias por ser mi primer compañero de juego y por todo lo que hemos vivido juntos, por cada uno de tus consejos y por compartirme tu modo de ver la vida, te admiro y te quiero.

Si bien ya no cuento con la presencia de mis abuelitos, ellos forman parte de mis más dulces recuerdos de mi niñez, nunca olvidaré las vacaciones que pasaba con ellos en Jalisco, es una de mis anclas en los momentos difíciles.

Gracias a todos mis tíos y primos por todo su apoyo y amor, en especial a mi Tía Lupita, es uno de mis grandes ejemplos de esfuerzo y responsabilidad, fue la primer persona que me regaló un libro y desde que yo soy pequeño ella siempre ha estado pendiente de mí y de mi hermano. La quiero mucho.

Gracias a mis amigos de la primaria, secundaria y bachillerato, en especial a Tania, Daniel, Patsy, Mario, Juliana, Norma y Gabo, ya que más que amigos son

mis hermanos, sé que el tiempo no será impedimento para que pueda contar con ustedes y ustedes conmigo.

Susy, tú bien sabes lo mucho que te quiero y admiro, gracias por tu apoyo incondicional y por confiar siempre en mí, gracias por cada una de las pláticas y risas compartidas, eres una de esas personas que me motivas a ser siempre mejor, no tengo duda que llegaste a mi vida para quedarte. También quiero aprovechar para agradecerles a tus papás por su amistad y por todos los detalles que han tenido hacia mí.

Pao, gracias por compartir toda la carrera universitaria conmigo, gracias por todo tu apoyo pero sobre todo gracias por tu amistad y por siempre tener una sonrisa que compartir, te quiero y admiro mucho.

Sandy, en la universidad no sólo encontré una amiga sino una hermana, gracias por todo el apoyo, por toda tu confianza y por permitirme haberte conocido, te quiero mucho.

Daniela, eres una de las personas que más me ha enseñado y un motivo para ser mejor persona, eres alguien a quien admiro y espero que la vida nos haga coincidir. Te quiero mucho.

Araceli, te has convertido en una gran amiga, gracias por toda la confianza, gracias por siempre tener una palabra de motivación y por tu apoyo incondicional. Te quiero mucho.

Paulina, te quiero y admiro mucho, he aprendido mucho de ti, gracias por todos los consejos y sobre todo por tu amistad.

Piby, gracias por enseñarme ese modo más relajado de ver la vida, gracias por cada una de las risas compartidas y no se te olvide que el apodo Bostik es gracias a ti y a Pau.

Dany Robles, eres una de las personas más auténticas que conozco, gracias por tu amistad y por enseñarme esa forma tan libre de ser, te quiero mucho.

Nata, gracias por ese peculiar modo de molestarme pero sobre todo gracias por tu amistad, de pronto llegaste y te has convertido en una de mis amigas más cercanas y una de las personas que más quiero.

Rosaurora, sabes que eres una de las personas que más agradezco el que estén en mi vida, me aportas siempre algo nuevo, gracias por compartirme tu modo de ver las cosas y gracias a eso me haces ser mejor persona. Te quiero mucho.

Marcela, tuve la fortuna de conocerte durante la realización de mi tesis, gracias por siempre estar dispuesta apoyarme, por escucharme en los momentos de crisis, por las risas compartidas y sobre todo por tu amistad.

Ana Montesano, gracias por siempre tener tiempo para compartir una buena charla, aprecio mucho cada uno de tus consejos, gracias por todo, te quiero mucho.

Carlos, este último año te has convertido en un gran amigo quien siempre está dispuesto a escucharme, gracias por las anécdotas y risas compartidas, gracias por la confianza que me has brindado.

Quiero aprovechar para agradecerle a un a grupo de amigos con lo que desde hace un par de años he compartido grandes momentos y se han convertido en una gran motivación, no tengo duda que al transcurso de los años seguiremos coincidiendo, gracias por todo su apoyo: Oscar, Iván, Anllely, Marisol, Adry, Paulette, Moni, Ángel y Mara.

Por último, no quisiera dejar de mencionar a algunas personas con las que coincidí en la carrera y de las que siempre recibí su apoyo y amistad: Lorena, Fernanda, Servando, Chiva, Yuri, Diana, Abraham, Memo, Oscar Ortiz, Oscar Lucio, Sujhey, Narda, Areli, Lau Sandoval, Marianita, Emma, Stephani, Carmen, Lucoca e Iván.

DEDICATORIAS

A mis padres, a mi hermano y a dos angelitos que han llenado de luz mi vida, mis sobrinos: Victoria y Karlo.

A la memoria de mi Tío Moisés y de mis primos Adrián y Fidel, por enseñarme que en la vida no hay otra manera de vivir que el día a día. Los recordaré siempre.

Ovidio - Carminum I, 11

*“...et spatio brevi spem longam
reseces. Dum loquimur, fugerit invida
aetas: carpe diem, quam minimum
credula postero”.*

*“...adapta al breve espacio de tu vida
una esperanza larga.
Mientras hablamos, huye el tiempo
envidioso. Vive el día de hoy.
Captúralo.
No te fíes del incierto mañana”.*

Horacio



ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ESQUEMAS	ix
LISTA DE ESPECTROS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
2.1 <i>Verbena carolina</i> L.	7
2.1.1 Familia Verbenaceae	7
2.1.2 Género Verbena	7
2.1.2.1 Distribución y hábitat	8
2.1.2.2 Composición química	8
2.1.3 Características de la especie vegetal <i>Verbena carolina</i> L.	11
2.1.3.1 Clasificación botánica	11
2.1.3.2 Sinonimia botánica	11
2.1.3.3 Sinonimia popular	11
2.1.3.4 Botánica y ecología	12
2.1.3.5 Etnobotánica y antropología	13
2.2 <i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray) S.F. Blake	14
2.2.1 Familia Asteraceae	14
2.2.2 Género Heliopsis	14
2.2.2.1 Distribución y habitat	15
2.2.3 Características de la especie vegetal <i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray) S.F. Blake	17
2.2.3.1 Clasificación botánica	17
2.2.3.2 Sinonimia popular	17
2.2.3.3 Botánica y ecología	17



2.2.3.4 Etnobotánica y antropología	18
2.2.3.5 Composición química	19
2.3 Control de calidad de plantas medicinales	21
2.4 Identificación microscópica por medio de técnicas histológicas e histoquímicas como herramienta para el control de calidad.	22
2.4.1 Técnicas histológicas	22
2.4.2 Técnicas histoquímicas	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1 Material vegetal	25
3.2 Material y equipo utilizado	25
3.3 Ensayos de identidad	27
3.3.1 Identificación microscópica	27
3.3.1.1 Tratamiento previo a las técnicas histológicas e histoquímicas	27
A. Técnica de ablandamiento	27
B. Técnica de fijación	28
C. Técnica de deshidratación e infiltración /inclusión	28
D. Técnica de corte de material embebido en parafina	31
E. Técnica de desparafinación e hidratación de las muestras	31
3.3.1.2 Histología	33
A. Técnica de tinción para histología	33
B. Limpieza y etiquetado de las preparaciones	34
3.3.1.3 Histoquímica	34
A. Identificación de polisacáridos y proteínas	34
B. Identificación de pectinas	35
C. Identificación de almidón	36
D. Identificación de pectatos de calcio	36
E. Identificación de lignina	37
F. Identificación de proteínas	37
G. Identificación de taninos	38



H. Identificación de aceites, grasas y cutina	39
3.3.2 Ensayos de identidad en cromatografía en capa fina	40
3.3.2.1 Ensayo de identidad para <i>Verbena carolina</i> L.	40
A. Aislamiento e identificación estructural del verbascósido	40
B. Obtención del extracto total clorofórmico/metanólico de <i>Verbena carolina</i> L.	42
C. Identificación por cromatografía en capa fina de tres compuestos mayoritarios del extracto clorofórmico/metanólico de <i>Verbena carolina</i> L. como prueba de identidad.	42
3.3.2.2 Ensayo de identidad para la raíz de <i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray) S.F. Blake.	43
A. Obtención del extracto total de <i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray) S.F. Blake.	43
B. Identificación por cromatografía en capa fina del componente mayoritario del extracto clorofórmico de la raíz de <i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray) S.F. Blake como prueba de identidad.	43
3.4 Ensayos de pureza	44
3.4.1 Determinación de materia extraña	44
3.4.2 Metales pesados	44
3.4.3 Determinación de cenizas	45
3.4.4 Material extraíble	46
3.4.5 Índice de hinchamiento	46
3.4.6 Determinación de la pérdida de agua y material volátil	48
3.4.7 Determinación de límite microbiano, ausencia o presencia de microorganismos objetables	48
3.4.7.1 Recuento de microorganismos mesófilos aerobios	48
3.4.7.2 Determinación e identificación de microorganismos objetables.	50



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
I. Modificaciones hechas al tratamiento previo a las técnicas histológicas e histoquímicas	52
Pruebas de identidad y pureza para <i>Verbena carolina</i> L.	54
4.1 Ensayos de identidad para <i>Verbena carolina</i>	54
4.1.1 Descripción microscópica de la anatomía y contenidos celulares de hoja y tallo de <i>Verbena carolina</i> .	54
4.1.1.1 Hoja	54
*Lámina	54
A. Tejido dérmico	54
B. Tejido fundamental	54
C. Tejido vascular	55
*Vena primaria o vena media	55
A. Tejido dérmico	55
B. Tejido fundamental	56
C. Tejido vascular	56
4.1.1.2 Tallo	56
A. Tejido dérmico	56
• Peridermis	56
B. Tejido fundamental	57
• Córtez	57
• Médula	57
C. Tejido vascular	57
4.1.2 Ensayo de indentidad en cromatografía capa fina de <i>Verbena carolina</i>	61
4.1.2.1 Aislamiento y elucidación estructural del verbascósido	62
4.1.2.2 Identificación por cromatografía en capa fina de tres compuestos mayoritarios del extracto clorofórmico/metanólico de <i>Verbena carolina</i> L. como prueba de identidad.	65
4.2 Ensayos de pureza para <i>Verbena carolina</i>	66



4.2.1 Determinación de materia extraña	66
4.2.2 Metales pesados	66
4.2.3 Determinación de cenizas	67
4.2.4 Material extraíble	69
4.2.5 Índice de hinchamiento	70
4.2.6 Determinación de la pérdida de agua y material volátil	71
4.2.7 Determinación de límite microbiano, ausencia o presencia de microorganismos patógenos	71
4.2.7.1 Recuento de microorganismos mesófilos aerobios	72
4.2.7.2 Determinación e identificación de microorganismos patógenos (microorganismos objetables)	74
Pruebas de identidad y pureza para <i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray) S. F. Blake	80
4.3 Ensayos de identidad para <i>Heliopsis longipes</i> .	80
4.3.1 Descripción microscópica de la anatomía y contenidos celulares de raíz de <i>Heliopsis longipes</i> .	80
A. Tejido dérmico	80
B. Tejido fundamental	80
C. Tejido vascular	80
4.3.2 Ensayo de identidad en cromatografía capa fina para <i>Heliopsis longipes</i>	82
4.3.2.1 Identificación por cromatografía en capa fina del componente mayoritario del extracto clorofórmico de <i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray) S.F. Blake como prueba de identidad	82
4.4 Ensayos de pureza para <i>Heliopsis longipes</i>	83
4.4.1 Determinación de materia extraña	83
4.4.2 Metales pesados	83
4.4.3 Determinación de cenizas	83
4.4.4 Índice de hinchamiento	84
5. CONCLUSIONES	85
6. BIBLIOGRAFÍA	87



ANEXOS	96
Anexo I. Preparación de soluciones, colorantes y reactivos para la realización de las técnicas de histoquímica e histología.	96
Anexo II. Preparación de soluciones y medios de cultivo para la realización de límites microbianos.	100
Anexo III: Tabla para la determinación del NMP	105
Anexo IV. Características morfológicas de las bacterias	106
Anexo V. Espectros	107



LISTA DE ABREVIATURAS

[]	Concentración
≈	Aproximadamente
±	Más/menos
°C	Grados Celsius
δ	Desplazamiento químico
%	Por ciento
ABT	Alcohol butílico terciario
AC	Agar Cetrimida
ATCC	American Type Culture Collection
BP	Agar Baird-Parker
CONABIO	Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad
CT	Caldo Tetrionato
d	Doblete
dd	Doble de dobles
EMB	Agar Levine-eosina-azul de metileno
FAA	Formaldehído-ácido acético-alcohol-agua
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
g	Gramo
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamiento
km	Kilómetros
Mod	Modelo
m	Multiplete
MC	Agar Mac Conkey
min	Minuto
mL	Mililitro
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
N	Normal
nm	Nanometro
NMP	Número más probable
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Segundos
Temp.	Temperatura
td	Triplete dobleteado
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VJ	Agar Vogel-Johnson
WHO	World Health Organization



LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación botánica de <i>Verbena carolina</i> L.	11
Tabla 2.	Especies conocidas de <i>Heliopsis</i> .	15
Tabla 3.	Clasificación botánica de <i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray) S.F. Blake	17
Tabla 4.	Metabolitos aislados de <i>Heliopsis longipes</i> .	20
Tabla 5	Técnica de ablandamiento y rehidratación para hoja, tallo y raíz	27
Tabla 6	Técnica de fijación para hoja, tallo y raíz	28
Tabla 7.	Serie de deshidratación con alcohol butílico terciario (ABT)	29
Tabla 8.	Cepas de Referencia.	50
Tabla 9	Desplazamiento químico de las señales (ppm) de RMN ¹³ C y RMN ¹ H del verbascósido en MeOD	64
Tabla 10	Determinación de metales pesados en las partes aéreas de <i>Verbena carolina</i>	67
Tabla 11	Cenizas totales de las partes aéreas de <i>Verbena carolina</i>	68
Tabla 12	Cenizas insolubles en ácido de las partes aéreas de <i>Verbena carolina</i>	68
Tabla 13	Peso y porcentajes de los extractos hexánicos, etanólicos y de etanol-agua 7:3 de <i>Verbena carolina</i> .	69
Tabla 14	Índice de hinchamiento de las partes aéreas de <i>Verbena carolina</i> L.	70
Tabla 15	Pérdida al secado en por ciento de <i>Verbena carolina</i>	71
Tabla 16	Recuento de bacterias mesófilas aerobias por el método de placa	72
Tabla 17	Recuento de bacterias mesófilas aerobias por el método del NMP	72
Tabla 18	Recuento de hongos por el método de placa	73
Tabla 19	Identificación de microorganismos objetables	76
Tabla 20	Determinación de metales pesados en las raíces de <i>Heliopsis longipes</i> .	83
Tabla 21	Cenizas totales de las raíces de <i>Heliopsis longipes</i>	84
Tabla 22	Índice de hinchamiento de las raíces de <i>Heliopsis longipes</i>	84



LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Metabolitos secundarios del género <i>Verbena</i>	9
Figura 2.	<i>Verbena carolina</i> L. (Verbenaceae)	12
Figura 3.	<i>Heliopsis longipes</i> (Asteraceae). a) Flor y tallo b) Raíz.	18
Figura 4.	Metabolitos secundarios mayoritarios de <i>Heliopsis longipes</i> .	20
Figura 5.	Ejemplo de etiqueta de identificación.	34
Figura 6.	Secciones transversales de hoja de <i>Verbena carolina</i> .	58
Figura 7.	Secciones transversales de venas de <i>Verbena carolina</i> .	59
Figura 8	Material vegetal molido de <i>Verbena carolina</i> .	59
Figura 9	Secciones transversales de tallo de <i>Verbena carolina</i> .	60
Figura 10	Elucidación estructural del verbascósido	64
Figura 11	Cromatografía en capa fina del extracto clorofórmico/metanólico comparándolo con los estándares de verbascósido, hastatósido y verbenalina.	65
Figura 12	Determinación de <i>Escherichia coli</i> en agar Mac Conkey.	77
Figura 13	Determinación de <i>Escherichia coli</i> en agar Levine-eosina-azul de metileno	77
Figura 14	Determinación de <i>Salmonella sp</i> en caldo tetrionato.	78
Figura 15	Determinación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agar Cetrimida	78
Figura 16	Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar Vogel-Johnson	79
Figura 17	Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar Baird-Parke	79
Figura 18	Secciones transversales de raíz de <i>Heliopsis longipes</i> .	81
Figura 19	Cromatoplaaca en capa fina del extracto clorofórmico comparándolo con el estándar de afinina	82

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Proceso de infiltración para hoja, raíz y tallo.	30
Esquema 2.	Técnica de corte de material embebido en parafina.	31
Esquema 3.	Proceso de desparafinación y rehidratación de las muestras.	32
Esquema 4.	Tinción con safranina "O" - verde rápido FC.	33
Esquema 5.	Identificación de polisacáridos y proteínas	35
Esquema 6.	Identificación de pectinas.	35
Esquema 7.	Identificación de almidón.	36
Esquema 8.	Identificación de pectatos de calcio.	36
Esquema 9.	Identificación de lignina.	37
Esquema 10.	Identificación de proteínas.	37
Esquema 11.	Identificación de taninos condensados y catequinas.	38



Esquema 12.	Identificación de taninos hidrolizables.	38
Esquema 13.	Identificación de aceites, grasas y cutina.	39
Esquema 14.	Aislamiento y elucidación del verbascósido.	41
Esquema 15.	Determinación de materia extraña.	44
Esquema 16.	Determinación de cenizas totales.	45
Esquema 17.	Determinación de cenizas insolubles en ácido.	46
Esquema 18.	Determinación de material extraíble.	47
Esquema 19.	Determinación del índice de hinchamiento.	47
Esquema 20.	Determinación de la pérdida de agua y material volátil.	48
Esquema 21.	Dilución de la muestra.	49
Esquema 22.	Recuento de bacterias mesófilas por el método en tubo (NMP)	49
Esquema 23.	Recuento de microorganismos mesófilos aerobios por el método en placa.	50
Esquema 24.	Determinación e identificación de microorganismos patógenos.	51

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1.	IR del verbascósido	107
Espectro 2.	RMN- ¹ H del verbascósido	108
Espectro 3.	COSY del verbascósido	109
Espectro 4.	HMBC del verbascósido	110
Espectro 5.	HSQC del verbascósido	111
Espectro 6.	RMN- ¹³ C del verbascósido	112



1. INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas medicinales y el desarrollo de la humanidad tienen una historia conjunta. Desde el inicio de la humanidad, el conocimiento y uso de los elementos vegetales de la naturaleza para aliviar los problemas de salud, constituyó una de las principales herramientas para lograr la supervivencia. Las plantas medicinales han sido tan trascendentes en la historia de la humanidad, que han pasado a formar parte de la cultura popular y su conocimiento ha sido transmitido de generación en generación, primero de forma oral y posteriormente escrita. Inicialmente el uso de las plantas medicinales se basó en criterios mágico-religiosos, pero con el tiempo se adquirió un conocimiento empírico basado en el ensayo-error.

La diversidad biológica y cultural de América fueron elementos que admiraron los europeos desde su llegada al continente, ya que constituyeron una verdadera explosión de nuevas posibilidades económicas y terapéuticas. La riqueza de recursos vegetales medicinales, así como el conocimiento que tenían sobre ellos las personas nativas, fue algo que causó un enorme interés, por lo que los países europeos adquirieron muchas de las plantas medicinales usadas por la población y se las llevaron a su continente con la intención de estudiarlas y poderlas emplear, este hecho marcó el desarrollo de la fitoterapia en el siglo XVI. Sin embargo, desde el siglo XIX se produjo el actual y continuo desarrollo de la química sintética, lo que tuvo como consecuencia la desvalorización de la fitoterapia (Ríos, 2000).

Alrededor de todo el mundo se ha observado un marcado incremento en el uso medicamentoso de preparados vegetales a partir de la segunda mitad del siglo XX. Esto puede conducir a un uso indiscriminado, en ocasiones sin sustento científico que podría perjudicar la salud. Popularmente, se cree que lo “natural” es inocuo, lo que también ha llevado a que se ignore la necesidad de realizar controles de calidad en el material vegetal.



Actualmente, las plantas medicinales son usadas con diferentes propósitos tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados; en algunos casos como remedios caseros, como material de venta libre o como materia prima para la industria farmacéutica. En el mercado mundial de medicamentos representan una proporción importante (WHO, 2000).

Considerando todo lo anterior, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha mostrado un creciente interés en implementar medidas con el fin de reglamentar y controlar los productos elaborados a partir de plantas medicinales para establecer y mantener estándares adecuados.

La Asamblea Mundial de la Salud en sus resoluciones hechas de 1978 a 1989, enfatizó la necesidad de garantizar la calidad de los productos de plantas medicinales por medio de técnicas modernas de control y la aplicación de estándares adecuados (WHO,1998). Es así como en 1998 la OMS genera un manual titulado “Quality control methods for medicinal plant materials”, que como tal, no es una farmacopea herbolaria, sino es una colección de procedimientos para apoyar el desarrollo de estándares nacionales basados en las condiciones del mercado local, con el debido respeto a la legislación nacional existente y a las normas nacionales y regionales.

Como resultado de un gran esfuerzo de los países miembros de la OMS por crear una guía para favorecer el conocimiento de las plantas medicinales y su control de calidad, en 1999 se publicaron los primeros dos volúmenes de monografías de plantas medicinales selectas, el primer volumen incluyó 28 monografías y el segundo 30 más (WHO, 2007 b). Desde un inicio, las monografías han jugado un papel importante como referencia en el control de calidad de las plantas medicinales, además han favorecido la creación de monografías propias en cada país. En el 2007 se dio a conocer el tercer volumen de monografías de plantas medicinales selectas, lo que es un claro ejemplo de cómo a través del tiempo la importancia de dichas monografías se ha visto incrementada.



Según la OMS, alrededor del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para atender las necesidades primarias de asistencia médica, y existe una marcada tendencia a lo natural lo cual afecta el uso de los recursos vegetales como terapia alternativa para una infinidad de dolencias (Castillo y Martínez, 2007). Con la clara intención de favorecer el crecimiento de la medicina tradicional y sobre todo garantizar la seguridad de quienes recurren a ella, en el 2002 la OMS dio a conocer su primera estrategia global sobre medicina tradicional titulada “Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005”. Uno de los principales objetivos de esta estrategia fue:

*Fomentar la seguridad, la eficacia y la calidad de la Medicina Tradicional, conservando y difundiendo sus beneficios básicos y ofreciendo directrices sobre la creación de normas y estándares para el aseguramiento de la calidad (WHO, 2002).

La medicina tradicional mexicana es una importante manifestación cultural, característica de la vida del país, sus prácticas y recursos se encuentran profundamente arraigados en la sociedad. Las culturas indígenas de México, herederas de una larga tradición prehispánica, han preservado formas y procedimientos eficaces para resolver problemas de salud de la población.

El libro más importante sobre la medicina de épocas prehispánicas es el Códice Badiano, escrito en el 1552 en náhuatl por Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano; contiene la descripción sobre el uso de 184 plantas medicinales de aquella época, acompañado con ilustraciones a color de las mismas.

Las plantas medicinales son el recurso terapéutico por excelencia de la medicina tradicional mexicana, su uso tan extendido en diferentes grupos étnicos del país representa la única fuente de información con la que se cuenta para conocer la manera en que la que estos pobladores solucionan sus problemas de salud, sobre todo en aquellas zonas donde el acceso a la medicina alopática es difícil. Sin embargo, a pesar de la tradición tan arraigada y la vasta utilización que el pueblo



mexicano hace de las plantas medicinales, la información al respecto no está disponible, ya que en la mayoría de los casos el conocimiento se transmite verbalmente de una generación a otra, por otra parte el mayor cúmulo de conocimiento ha quedado en manos de curanderos.

Actualmente en México, las especies vegetales se expenden bajo la forma de drogas crudas o como preparados procesados industrialmente o de manera casera, en ambos casos con los más diversos niveles de calidad. En general estos productos carecen de un control de calidad y no se encuentran registrados como medicamentos o como remedios herbolarios. Por tal motivo y con las recomendaciones hechas por la OMS, la Secretaría de Salud promovió la creación de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) cuya primera edición fue en el 2001.

La creación de la FHEUM evidenció que no se contaba con la información necesaria para incluir las monografías de especies nativas o ésta era limitada en cantidad y calidad. Por lo tanto fue necesario iniciar un proceso de integración de monografías tipo OMS, emanadas de un proceso sistemático de investigación, de aquellas especies de mayor uso en la medicina tradicional de nuestro país.

Una de las dos partes de las que consta una monografía se refiere a la identificación y control de calidad (aspectos botánicos, pruebas de identificación, pureza, análisis químico, principales constituyentes).

La importancia de realizar diversas pruebas para el control de calidad en especies vegetales medicinales radica en que tradicionalmente la evaluación de la calidad de éstas se basa simplemente en la inspección visual. Dicha inspección puede resultar insuficiente si a simple vista no se diferencian claramente las especies de un mismo género, más si se considera que la eficacia de gran número de plantas varía ampliamente en las especies del mismo género e incluso diferentes partes de las plantas pueden tener un valor medicinal diferente (Wills, et al., 2000)



El objetivo general del presente trabajo de investigación es generar la información sobre algunas pruebas específicas de identidad y pureza que demuestren la calidad de las hojas y tallo de *Verbena carolina* L., así como de la raíz de *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake, como drogas que cumplen con las especificaciones generales establecidas en la FHEUM.

Si bien se trata de dos especies diferentes entre sí, ambas especies vegetales tienen un amplio uso en la medicina tradicional. La elección de las estructuras vegetales a estudiar es debido a que éstas son las usadas en la medicina tradicional, además de estudios químicos que han demostrado la presencia de componentes con alguna actividad biológica en estas estructuras (Argueta, et al., 1994; Favari, et al., 2007; Ríos, et al., 2007).

Se espera que los resultados obtenidos sean parte de la información necesaria para elaborar las monografías de estas dos plantas medicinales, las cuales eventualmente se incorporen a la FHEUM.

Para el cumplimiento del objetivo general se contemplan los siguientes objetivos particulares:

- Realizar la búsqueda bibliográfica de los antecedentes de estudios químicos y biológicos realizados con *Verbena carolina* y *Heliopsis longipes*.
- Obtener las hojas y tallos de *Verbena carolina* y la raíz de *Heliopsis longipes* botánicamente indentificadas, deshidratadas y fragmentadas.
- Determinar las siguientes pruebas de identidad a los materiales vegetales:
 - Obtener preparaciones histológicas de las diferentes estructuras vegetales seleccionadas.
 - Realizar pruebas histoquímicas que nos brinden información acerca de algunas de las sustancias de almacenamiento de los materiales vegetales objeto de este estudio.
 - Describir microscópicamente los materiales vegetales.



- Realizar pruebas de pureza mediante las siguientes determinaciones:
 - Límite microbiano, ausencia o presencia de microorganismos objetables.
 - Materia Extraña.
 - Índice de hinchamiento.
 - Metales pesados (Plomo, Cadmio y Mercurio).
 - Cenizas totales e insolubles en ácido.
 - Material extraíble (hexano, etanol y una mezcla etanol-agua).
 - Pérdida al secado.
- Como prueba de identidad, identificar por cromatografía en capa fina a tres de los compuestos mayoritarios en el extracto clorofórmico/metanólico de *Verbena carolina*. Para ello es necesario:
 - Realizar el extracto clorofórmico/metanólico de *Verbena carolina* L.
 - Aislar e identificación estructural del compuesto mayoritario de la fracción 70-76 previamente obtenida (Morales, 2009) mediante sus análisis espectroscópicos (RMN ^{13}C y RMN ^1H), así como la realización de los correspondientes experimentos COSY, HMBC y HSQC, para poderlo emplear como estándar en el ensayo de identidad en cromatografía en capa fina.
 - Optimizar el sistema cromatográfico para identificar tres compuestos mayoritarios en el extracto acetónico de *Verbena carolina*.
- Como prueba de identidad, identificar por cromatografía en capa fina un componente mayoritario del extracto clorofórmico de *Heliopsis longipes*. Para ello es necesario:
 - Realizar el extracto clorofórmico de *Heliopsis longipes*.
 - Optimizar el sistema cromatográfico para identificar a la afinina en el extracto clorofórmico de *Heiopsis longipes*.



2. ANTECEDENTES

2.1 *Verbena carolina* L.

2.1.1 Familia Verbenaceae

Rzedowski y Rzedowski (2002) en sus trabajos con la flora mexicana, describen a la familia Verbenaceae como un grupo de taxonomía sumamente complicada, en donde la circunscripción, tanto en la propia familia, como de muchos de sus géneros y especies es incierta. Siguiendo el criterio moderno, aceptado en el trabajo de Thorne, la familia queda ajustada a unos 35 géneros y poco más de 100 especies distribuidas en regiones templadas y cálidas de ambos hemisferios, mayormente en América.

2.1.2 Género *Verbena*

El género *Verbena* L. (Verbenaceae) fue fundado por Linnaeus (1753) abarcando 14 especies, de las cuales 6 actualmente pertenecen a *Verbena* (*V. bonariensis*, *V. hastata*, *V. officinalis*, *V. spuria*, *V. supina* y *V. urticaefolia*); las restantes fueron transferidas a otros géneros. Comprende hierbas o sufrútices, algunas de ellas importantes como ornamentales y otras como malezas. *Verbena* se distribuye principalmente en América, de donde el género sería originario (Lewis y Oliver, 1961). Varias de las especies poseen distribución cosmopolita, como *V. rigida* Spreng., *V. litoralis* Kunth y *V. bonariensis* L.

El género *Verbena* L. se ha dividido tradicionalmente en secciones, series o en grupos informales principalmente sobre la base de caracteres morfológicos, de caracteres anatómicos y de distribución geográfica. O'Leary y colaboradores (2007) reconocen para el género *Verbena* 45 especies y 10 variedades, agrupadas en 2 series: *Verbena* y *Pachystachyae*, la primera integrada por tres grupos informales: *Verbena*, *Hastae* y *Bracteosae*; la segunda por dos subseries: *Pachystachyae* y *Pseudoracemosae*. Estudios filogenéticos previos indican que *Verbena* es monofilética y su grupo hermano es *Glanduria*.



Hasta el momento, los trabajos en *Verbena* distan de clarificar las complejas relaciones dentro del género y únicamente se cuenta con estudios a nivel regional o catálogos (O'Leary, et al., 2007).

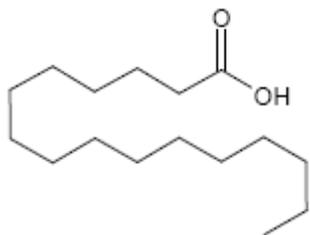
2.1.2.1 Distribución y hábitat

El género *Verbena* de origen americano, actualmente se extiende por América tropical y templada, norte de África, Asia, Europa y Australia; crece desde el nivel del mar hasta casi 4000 m.s.n.m., en la región andina de Ecuador, Bolivia y Perú. Existen tres centros de diversidad específica, uno en zonas templado-cálidas del noreste Argentino y sur de Brasil, taxones principalmente pertenecientes a la serie *Pachystachyae*; el segundo en el sudoeste de Estados Unidos de América y norte de México, con algunas especies en la zona Pacífica y montañosa; el tercero en la zona templada del este de Estados Unidos de América y sur de Canadá; estos dos últimos centros representados principalmente por taxones pertenecientes a la serie *Verbena* (O'Leary, et al., 2007).

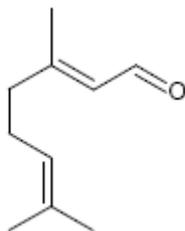
2.1.2.2 Composición química

El género *Verbena* biosintetiza diversos tipos de compuestos, como iridoides glicosilados, feniletanoides, flavonoides, triterpenos, esteroides, etc., los cuales han mostrado tener alguna actividad farmacológica. Dentro de las actividades farmacológicas mencionadas en la literatura para algunos de estos metabolitos o para extractos de *Verbena*, se encuentra reportado un efecto analgésico y antiinflamatorio (Deepak y Handa, 2000 a), un posible efecto hepatoprotector (Favari, et al., 2007), actividad antioxidante (Rehecho, et al., 2010), actividad antimicrobiana (Casanova, et al., 2008) , así como actividad promotora del sueño (Makino, et al., 2009) .

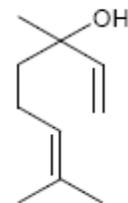
En la Figura 1 se enlistan los metabolitos secundarios mayoritarios del género *Verbena*.



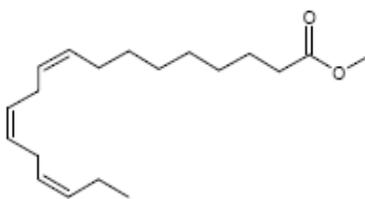
Ácido hexadecanoico¹
Verbena officinalis
(a)



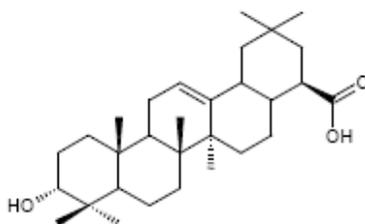
Geranial¹
Verbena officinalis
(b)



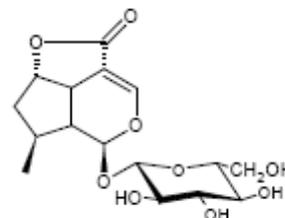
Linalol¹
Verbena officinalis
(c)



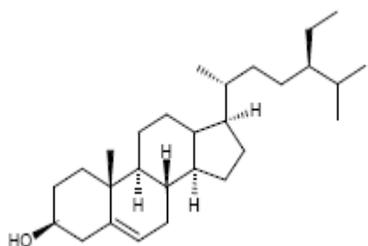
Éster metílico del ácido
linolénico¹
Verbena officinalis
(d)



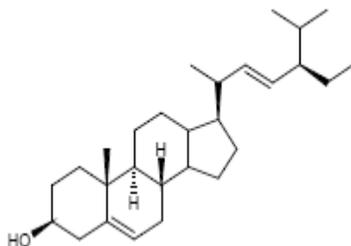
Ácido oleanoico²
Verbena littoralis
(e)



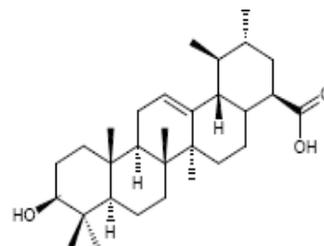
Brasósido³
Verbena littoralis
(f)



β -Sitosterol²
Verbena littoralis
(g)



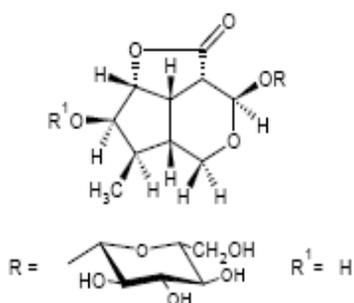
Estigmasterol²
Verbena littoralis
(h)



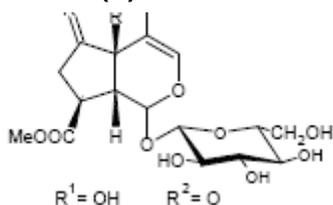
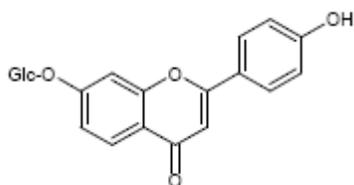
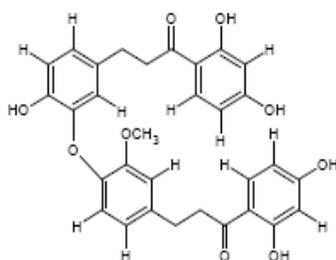
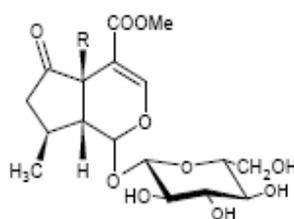
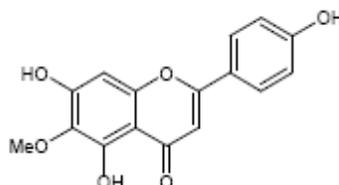
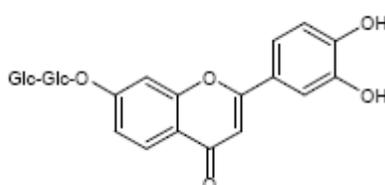
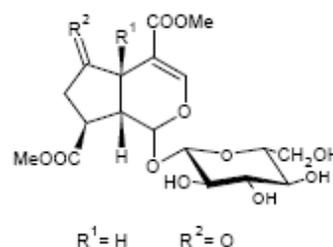
Ácido ursólico⁴
Verbena officinalis
(j)

Notas: ¹ Ardakani, et al., 2003., ² Gamboa y Castro, 2004., ³ Umaña y Castro, 1990., ⁴ Deepak y Handa, 2000 b.

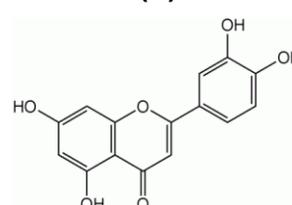
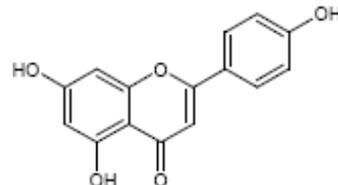
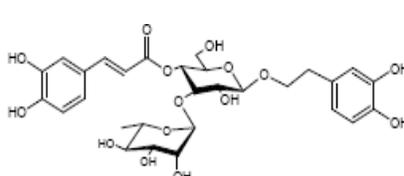
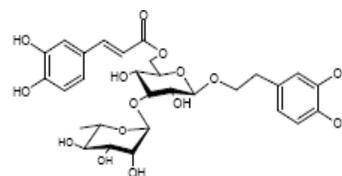
Figura 1. Metabolitos secundarios mayoritarios del género *Verbena*

Vebrásido⁵*Verbena brasiliensis*

(k)

Aralidiósido⁷ (o)*Verbena brasiliensis*Apigenina 7-glucurónido⁹*Verbena officinalis* (r)Verbenachalcona¹¹*Verbena littoralis* (v)Verbenalina⁶ R= H (l)Hastatósido⁶ R= OH (m)*Verbena officinalis*Hispidulina⁸ (p)*Verbena citriodora*Luteolina 7-glucurónido⁹*Verbena officinalis* (s)Griselinósido⁷*Verbena brasiliensis*

(n)

Luteolina⁸ (q)*Verbena citriodora*Apigenina¹⁰ (t)*Verbena officinalis*Verbascósido⁴*Verbena officinalis* (w)Isoverbascósido¹²*Verbena officinalis* (x)

Notas: ⁴ Deepak y Handa, 2000 b., ⁵ Franke y Rimpler, 1987., ⁶ Müller, et al., 2004., ⁷ Ono, et al., 2006., ⁸ Valento, et al., 1999., ⁹ Casanova, et al., 2008., ¹⁰ Calvo, et al., 1997., ¹¹ Li, et al., 2001., ¹² Bilia, et al., 2007.

Figura 1. Metabolitos secundarios mayoritarios del género *Verbena* (continuación)



2.1.3 Características de la especie vegetal *Verbena carolina* L.

2.1.3.1 Clasificación botánica

En la Tabla 1 se enlista la clasificación botánica obtenida de *Integrated Taxonomic Information System* disponible en <http://www.itis.gov/>.

Tabla 1. Clasificación botánica de *Verbena carolina* L.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Verbenaceae
Género	Verbena
Especie	<i>Verbena carolina</i> L.

2.1.3.2 Sinonimia botánica (Argueta, et al., 1994)

- *Verbena biserrata* Kunth
- *Verbena caroliniana* Willd
- *Verbena polystachya* Kunth
- *Verbena varonicaefolia* Kunth

2.1.3.3 Sinonimia popular (Rzedowski y Rzedowski, 2001)

- Verbena
- Ajenjo grande
- Hierba de San José
- Hierba de San Juan
- Hierba lengua de perro
- Nardo de campo
- Santa María
- Verbena del perro
- Verbena corriente
- Poleo negro
- Chilillo chino
- Wahichuri (Tarahumara)
- Axixipatli (Náhuatl)



2.1.3.4 Botánica y ecología

Verbena carolina L. (Fig. 2) es una planta herbácea anual o perenne, erecta o ascendente, usualmente ramificada; el tallo va de áspero a piloso, de 30 a 75 cm de alto, por lo general solitario con pelos comúnmente de menos de 1 mm de largo; hojas opuestas, subsésiles o bien con peciolo, oblongas, oblongo-lanceoladas o algunas veces elípticas, de 2.7 a 8 cm de longitud por 0.8 a 3 cm de ancho, ápice agudo u obtuso, serrada en el margen, cuneada en la base, con pelos concentrados a lo largo de las nervaduras. Sus flores se disponen en espigas de color morado.

Planta originaria de Arizona, México y Centro América, presente en climas cálido, semicálido, semiseco y templado desde el nivel del mar hasta los 3 900 msm. Crece en terrenos de cultivo y comúnmente en sitios perturbados con vegetación acuática de *Oenothera* y *Cyperus*, bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio y perennifolio, matorral xerófilo subtropical, pastizal, bosque espinoso, mesófilo de montaña, de encino, de pino y mixto de pino-encino (Rzedowski y Rzedowski, 2002).



Figura 2. *Verbena carolina* L. (Verbenaceae)



2.1.3.5 Etnobotánica y antropología (Rzedowski y Rzedowski, 2001)

En los estados de Aguascalientes, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Puebla y Veracruz se indica en padecimientos de tipo digestivo como vómito, diarrea, calor de estómago, disentería, granos en la boca, además de emplearse como purgante.

Pero es para derrames de bilis la enfermedad para la que más se menciona, la manera más común para curarla es con la infusión de la verbena suministrada en forma de té, donde todas las partes de la planta son utilizadas, se toma por las mañanas.

En uso externo la verbena suele emplearse en baños de asiento, es decir, de la cintura para abajo, un manojo de la planta se hierve y con ésta decocción se efectúa el tratamiento. Con el mismo preparado, pero en forma de lavados, se emplea para aliviar las punzadas de la cabeza, evitar la caída de pelo, caspa, orzuela, salpullido, golpes, infecciones de la piel y contra los piojos. Para curar los granos y heridas se hace una infusión con la raíz y con el líquido se lava diariamente la parte afectada.

Se usa en diversos padecimientos renales: inflamación de los riñones, para disolver piedras en la vejiga, como diurético y cuando se tiene dificultad al orinar. También cuando hay problemas hepáticos como "secreción del hígado".

Se utiliza para otras enfermedades como: el chincual, dolor de muelas, paludismo, tiricia, para calmar los nervios, en baños de niños, amigdalitis, sordera, gota, reumas y para bajar la calentura.

Los médicos tradicionales la ocupan también en la curación de la enfermedad causada por la mirada fuerte de algunos individuos (llamado mal de ojo).



2.2 *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake

2.2.1 Familia Asteraceae

La familia de las asteráceas (Asteraceae), también denominadas compuestas (Compositae), reúne más de 23,000 especies por lo que son la familia de angiospermas con mayor riqueza y diversidad biológica (CONABIO, 2008). La familia está caracterizada por presentar flores dispuestas en una inflorescencia compuesta denominada capítulo la cual se halla rodeada de una o más filas de brácteas. El nombre de Asteraceae deriva del género tipo de la familia Aster, término que a su vez proviene del griego que significa estrella y hace alusión a la forma de la inflorescencia. Por otro lado, el nombre “compuestas”, más antiguo pero válido, hace referencia al tipo peculiar de inflorescencia compuesta que caracteriza a la familia y que sólo se halla en muy pocas familias de Angiospermas. Las compuestas presentan una considerable importancia ecológica y económica. Los miembros de esta familia se distribuyen desde las regiones polares hasta los trópicos, conquistando todos los hábitats disponibles, desde los desiertos secos hasta los pantanos y desde las selvas hasta los picos montañosos (García-Chávez, et al., 2004).

2.2.2 Género *Heliopsis*

Los estudios taxonómicos realizados sobre *Heliopsis* han sido escasos, lo que ha provocado inseguridad en la interpretación de algunos de sus taxa. Dichos estudios se han basado en las características morfológicas. Las especies de este género son plantas herbáceas perennes o anuales; hojas opuestas o a veces alternas, subenteras a dentadas; cabezuelas terminales o axilares; involucreo hemisférico a anchamente campanulado, sus brácteas de tamaño subigual, las exteriores a menudo herbáceas; receptáculo convexo a cónico, provisto de páleas persistentes; flores liguladas fértiles, sus corolas sésiles (carentes de tubo), persistentes, amarillas, rojas o moradas; flores del disco hermafroditas aunque a veces mayormente estériles, sus corolas tubulosas, amarillas, amarillo-cafés o moradas; anteras con las bases brevemente aflechadas; ramas del estilo de las



flores hermafroditas lineares, aplanadas, provistas de apéndice corto; aquenios gruesos, 3 a 4-angulares, vilano ausente (Rzedowski, 2001).

Este género está representado por 14 especies conocidas (*H. filifolia*, *H. longipes*, *H. sinaloensis*, *H. annua*, *H. anómala*, *H. novogaliciana*, *H. parviceps*, *H. procumbens*, *H. bupthalmoides*, *H. parviflora*, *H. decumbens*, *H. gracilis*, *H. helianthoides*, *H. lanceolata*), aunque tal número varía con el criterio de los diferentes autores. La mayor parte de los representantes de *Heliopsis* son plantas perennes con la excepción de cinco especies anuales (*H. filifolia*, *H. sinaloensis*, *H. annua*, *H. anómala* y *H. parviceps*) endémicas de México (García-Chávez, 2004).

2.2.2.1 Distribución y hábitat (García-Chávez, et al., 2004).

Aunque restringida al hemisferio occidental, la distribución de este género es amplia, abarcando desde la región de las grandes planicies y el oriente de Estados Unidos, hasta Bolivia. Los hábitats donde viven sus especies son variados, desde regiones áridas hasta las francamente húmedas y desde las cálidas hasta las de clima templado; la abundancia de varias es favorecida por el disturbio y al menos una se comporta como maleza. Está representado por 14 especies conocidas, aunque tal número varía con el criterio de los diferentes autores. De estas especies, diez se encuentran en nuestro país y ocho lo son de manera endémica (Tabla 2).

Tabla 2. Especies conocidas de *Heliopsis*.

ESPECIE	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
De distribución restringida	Localizadas en un área geográfica reducida, se encuentran delimitadas por sistemas orográficos aislados, como lo son pequeñas sierras, mesetas o valles aislados e incluso cuencas endorreicas.
<i>H. filifolia</i> S. Wats.	Cuatro ciénegas, Carneros y Pto. Colorado (Coahuila)
<i>H. longipes</i> (Gray) Blake	Sierra Gorda (Guanajuato, San Luis Potosí y Querétaro)
<i>H. sinaloensis</i> B.L. Turner	Imala (Sinaloa).

Tabla 2. Especies conocidas de *Heliopsis* (continuación).

ESPECIE	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
De distribución regional	Localizadas a lo largo de varios estados del país, pero sin exceder los límites nacionales.
<i>H. annua</i> Hemsl.	Altiplano Mexicano principalmente en la región del Bajío. Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Michoacán, Estado de México, Distrito Federal, Morelos, Tlaxcala, Puebla, Hidalgo, San Luis Potosí, Zacatecas, Aguascalientes, Durango, Chihuahua y Coahuila.
<i>H. anomala</i> (M.E. Jones) B.L. Turner	Región de montañas y cañones costeros del Golfo de California (Baja California, Baja California Sur y Sonora)
<i>H. novogaliciana</i> B.L. Turner	Sierra Madre Occidental. Jalisco, Nayarit, Sinaloa, Chihuahua y Durango.
<i>H. parviceps</i> Blake	Vertiente pacífica de México. Sinaloa, Michoacán, Guerrero y Estado de México.
<i>H. procumbens</i> Hemsl.	Eje volcánico transversal. Jalisco, Michoacán, Estado de México, Distrito Federal, Hidalgo, Morelos, Tlaxcala Puebla y Veracruz.
De distribución amplia	La distribución de estas especies excede los límites nacionales
<i>H. buphthalmoides</i> (Jacq.) Dunal	La especie de más amplia distribución geográfica del género. Sierra Madre Occidental, Sierra Madre del Sur, Cordillera Centroamericana y los Andes.
<i>H. parviflora</i> Gray	Zonas áridas y semiráridas del norte de México y sur de Estados Unidos.
Extraterritoriales	Distribución solamente afuera de México
<i>H. decumbens</i> Blake	Cajamaraca, Perú.
<i>H. gracilis</i> (Gray) Nutt	Del suroeste de Georgia, norte y centro de Florida.
<i>H. helianthoides</i> (L.) Sweet	Oriente de Estados Unidos.
<i>H. lanceolata</i> Blake	Santander, Colombia.



2.2.3 Características de la especie vegetal *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake

2.2.3.1 Clasificación botánica

En la Tabla 1 se enlista la clasificación botánica obtenida de *Integrated Taxonomic Information System* disponible en <http://www.itis.gov/>.

Tabla 3. Clasificación botánica de *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Heliopsis
Especie	<i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray) S.F. Blake

2.2.3.2 Sinonimia popular

- Chilcuague o chilcuán (Náhuatl) (Molina-Torres, 2001)
- Chilmecatl (Náhuatl) (Martínez, 2005)
- Ichcha (García-Chávez, 2004)
- Chilicauau o chicuau (García-Chávez, 2004)
- Pelitre o peritre (Martínez, 2005)
- Raíz azteca o raíz de oro (García-Chávez, 2004)
- Falso girasol (García-Chávez, 2004)

2.2.3.3 Botánica y ecología

Planta herbácea perenne, de 20 a 70 cm, escasamente ramificada desde la base; hojas opuestas, ovadas, de 2 a 4 cm, aserradas y con pecíolos cortos; cabezuelas amarillas con largo pendúnculo (Figura 3a), raíces gruesas y ásperas de 15 a 30 cm de largo por unos 2 mm de ancho, con corteza morena que cubre a un eje leñoso y amarillento (Figura 4b) (CONABIO, 2008).



Su distribución geográfica es en la Sierra Gorda incluyendo los estados de San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro, crece entre 1 800 a 2 450 msn.



3a



3b

Figura 3. *Heliopsis longipes* (Asteraceae). a) Flor y tallo. b) Raíz.

2.2.3.4 Etnobotánica y antropología

El uso de *Heliopsis longipes* cuenta con una larga tradición en la herbolaria indígena, se emplea como analgésico, anestésico local y como antibiótico para infecciones de los aparatos respiratorio y digestivo. Dichos usos han sido respaldados por algunas publicaciones científicas que comprueban su actividad analgésica (Ríos, et al., 2007) y antibiótica (Molina, et al., 2004). También es utilizado para condimentar diversos platillos (Molina-Torres, et al., 2001). Por sus propiedades insecticidas, fue una de las plantas descubiertas por los Estados Unidos durante la segunda guerra mundial, observando que los extractos de estas raíces tienen una acción paralítica y toxicidad contra insectos (Little, 1948).

Otras actividades biológicas que se han atribuido al chilcuague son: actividad antiviral, en el tratamiento de aftas bucales y de algunas variedades de herpes; actividad fungicida en el tratamiento de pie de atleta; actividad molusquicida y en el tratamiento de algunos parásitos intestinales (Molina-Torres, et al., 2001).



2.2.3.5 Composición química

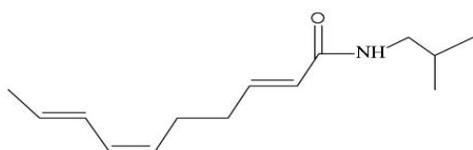
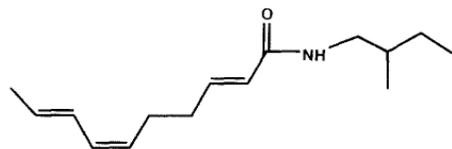
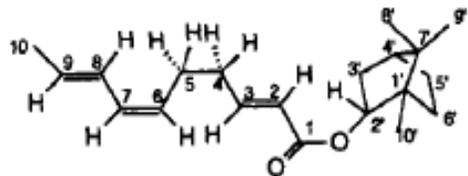
En el género *Heliopsis* sólo se han encontrado alcanidas alifáticas y acetilénicas. *H. longipes* fue la primera especie en la que se determinó la presencia de una alcanida olefínica, formada a partir de un ácido graso de cadena alifática de 10 átomos de carbono con tres insaturaciones unido a una isobutilamina, probablemente productos de la descarboxilación de la leucina (Acree, et al., 1945). Sin embargo, la planta cuya muestra de raíces fue sometida para su análisis en el laboratorio resultó identificada erróneamente como *Erigeron affinis* y así, la amida aislada fue denominada afinina. El descubrimiento de la afinina, como compuesto insecticida en esta especie, despertó interés por su notoria actividad.

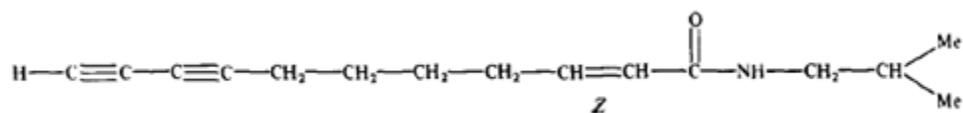
La afinina (Fig. 3a) es la alcanida mayoritaria en las raíces de esta planta y la principal responsable de los efectos biológicos específicos observados, entre los que se puede considerar la acción anestésica local (Ríos, et al., 2007), el estímulo organoléptico, así como la actividad insecticida y bactericida. Por mucho tiempo se consideró a la afinina como único componente bioactivo en esta especie, cuyo extracto crudo se ha utilizado para el estudio de sus aplicaciones insecticidas (Romero, et al., 1989; Gutiérrez-Lugo, et al., 1996), mismas que recientemente se han extendido mostrando un potencial agronómico importante en el control de bacterias y hongos fitopatógenos (Ramírez-Chávez, et al., 2000; Salgado-Garciglia, et al., 2008).

El análisis fitoquímico más detallado de las raíces de *H. longipes* ha revelado la presencia de otros principios bioactivos y de propiedades antimicrobianas de algunas alcanidas individuales (Molina-Torres, et al., 1995, 1996, 1999, 2001). En la Tabla 4 se muestran los metabolitos secundarios que se han aislado a partir de *Heliopsis longipes* (A.Gray) S.F. Blake.

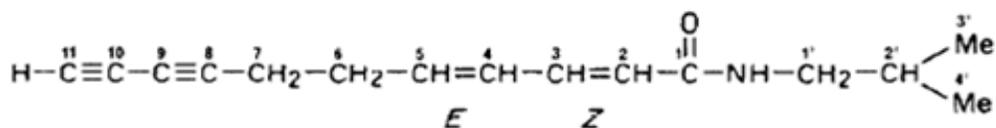
Tabla 4. Metabolitos aislados de *Heliopsis longipes*.

Metabolito secundario	Referencia
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> -decatrienamida (afinina) (4a)	Molina-Torres, et al., 1996 García-Chávez, et al., 2004
<i>N</i> -(2-metilbutil)-2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> -trien-decamida (4b)	Molina-Torres, et al., 1996 García-Chávez, et al., 2004
2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> -trien decanoato de bornilo (4c)	Molina-Torres, et al., 1995 García-Chávez, et al., 2004
<i>N</i> -isobutil-2 <i>Z</i> -en-8,10-diinundecamida (4d)	García-Chávez, et al., 2004
<i>N</i> -isobutil-2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> -dien-8,10-diinunadecamida (4e)	García-Chávez, et al., 2004
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> -en-8,10-diinunadecamida (4f)	García-Chávez, et al., 2004
<i>N</i> -isobutil-decanamida	García-Chávez, et al., 2004
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> -mono-en-decamida	García-Chávez, et al., 2004
<i>N</i> -isobutil-6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> -diendecamida	García-Chávez, et al., 2004
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dien-8,10-diinunadecamida	García-Chávez, et al., 2004
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> -tetraendodecamida	García-Chávez, et al., 2004

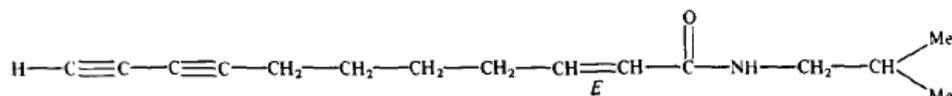
*N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamida (afinina) (**4a**)*N*-(2-metilbutil)-2*E*,6*Z*,8*E*-trien-decamida (**4b**)2*E*,6*Z*,8*E*-trien-decanoato de bornilo (**4c**)Figura 4. Metabolitos secundarios mayoritarios de *Heliopsis longipes*



N-isobutil-2*Z*-en-8,10-diinundecamida (**4d**)



N-isobutil-2*Z*,4*E*-dien-8,10-diinunadecamida (**4e**)



N-isobutil-2*E*-en-8,10-diinunadecamida (**4f**)

Figura 4. Metabolitos secundarios mayoritarios de *Heliopsis longipes* (continuación)

2.3 Control de calidad de plantas medicinales

El control de calidad de plantas medicinales es el conjunto de actividades y técnicas operativas que tienen como finalidad garantizar que su uso satisfaga la necesidad para las que son empleadas. Las plantas medicinales suelen ser usadas con diferentes propósitos, desde remedios caseros hasta como materia prima para la industria farmacéutica. Considerando lo anterior, podemos decir que la importancia del control de calidad radica en que brinda parámetros de seguridad y eficacia que respaldan el uso del material vegetal con propiedades medicinales.

Las actividades relacionadas con el control de calidad se inician desde la cosecha o recolección de las plantas medicinales, hasta el manejo y elaboración del producto final destinado al consumo humano.



Las operaciones de control de calidad consisten en:

- Pruebas de identidad: Son aquellas que tienen como finalidad garantizar que se trata sin lugar a dudas de la planta que se dice que es: incluye la identificación macro y microscópica, así como ensayos cromatográficos o algún otro ensayo químico.
- Pruebas de pureza: Están relacionadas con la determinación de la presencia del algún material ajeno o contaminante presente en la materia prima; incluye determinaciones como: humedad, cenizas, constantes físicas, material extraíble, contaminación microbiológica, materiales extraños, adulteraciones.
- Pruebas de composición: Tienen como finalidad cuantificar la presencia de los componentes químicos presentes en la planta.

2.4 Identificación microscópica por medio de técnicas histológicas e histoquímicas como herramienta para el control de calidad.

2.4.1 Técnicas histológicas

Históricamente se sabe que uno de los principales pilares de la farmacia fue el conocimiento de los vegetales con propiedades medicinales, éste reconocía en la histología vegetal un poderoso aliado para establecer los elementos que permitieran identificar los materiales vegetales con los que habitualmente se fabricaban los medicamentos, caracterizando mediante estructuras anatómicas individualmente cada planta. Pero el interés de la anatomía sistemática decreció al tiempo que la química adquiría protagonismo en la elaboración de medicamentos (González-Tejero y Casares-Porcel, 1996).

Actualmente, la OMS sigue reconociendo a la anatomía vegetal (a través de la identificación macroscópica y microscópica), como el primer paso para establecer la identidad y el grado de pureza de los materiales vegetales. La identificación microscópica resulta indispensable en la identificación de material fragmentado o molido (WHO, 1998).



La determinación taxonómica, empleando la anatomía vegetal como principal herramienta, puede ser aplicada a procedimientos de control de calidad de productos de plantas que son utilizados como remedios caseros o materia prima para la elaboración de medicamentos, en los cuales se busca evitar adulteraciones o detectar la presencia de contaminantes vegetales indeseables (Luna, et al., 1986). Sabiendo que gran parte del material vegetal que se expende en los mercados (tanto fresco como seco), se encuentra incompleto, molido o fraccionado, la anatomía vegetal como herramienta para el control de calidad adquiere mayor relevancia (Manzanero, 1995).

En la literatura se reportan los siguientes propósitos:

- El uso de estudios comparados de anatomía para proveer parámetros micrográficos adecuados para la verificación de la identidad de las especies, al momento de realizar el control de calidad (Bonzani, et al., 2003 b; González-Tejero, et al., 1987).
- Los análisis microscópicos así como las observaciones histoquímicas aportan información para la validación y estandarización de un producto vegetal como fitomedicamento o como suplemento alimenticio (Gopalakrishnan, et al., 2009; Van Breemen, et al., 2007; Sandoval, et al., 2005 a).
- Caracterización de las estructuras vegetales para la identificación de especies vegetales (Bonzani, et al., 2003 a; Venkatesh, et al., 2008)

Teniendo en cuenta lo anterior y conociendo que la caracterización de algunas estructuras vegetales son herramientas potenciales para la identificación de plantas medicinales, así como para su posterior uso en el control de calidad, de acuerdo con el criterio seguido por Metcalfe y Chalk (1979), se resumen a continuación algunas de las estructuras habitualmente utilizadas con propósitos de diagnóstico:

1. Tricomias: Estructuras bastantes útiles para la identificación ya que son frecuentes y se observan fácilmente. Se debe tener en cuenta que la proporción y longitud de tricomas, son características propensas a cambiar con las



condiciones ambientales. Una descripción completa comprende el aspecto global del indumento visto en superficie, así como las características individuales de cada tricoma (morfología, características de la pared, inclusiones, etc).

2. Disposición y tipo de estomas: Los estomas pueden estar ordenados en columna o en grupos. Su clasificación se basa en la forma de éstos y el arreglo de las células subsidiarias. Para realizar una correcta clasificación de los estomas es necesario la realización de estudios de ontogenia.

3. Características estructurales de los elementos del sistema vascular en la lámina, de las venas foliares, así como las células que constituyen las vainas de los haces.

2.4.2 Técnicas histoquímicas

Las técnicas histoquímicas han sido desarrolladas para análisis cuantitativos y cualitativos de todos los componentes celulares, incluyendo proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y la gama de elementos iónicos presentes en las soluciones celulares (Gersbach, et al., 2001).

Las técnicas histoquímicas proporcionan una base científica para la adquisición selectiva de plantas para el desarrollo de medicamentos y ayudan a establecer una base sólida para el uso de estas plantas en la medicina. También proporcionan la base para estudios más amplios y eliminar los problemas de grandes cantidades de muestras y de reactivos químicos necesarios; así hace posible la documentación de la estructura anatómica de las plantas (NRCP, 1980).

La combinación de técnicas histoquímicas e histológicas puede proporcionar la información suficiente para servir como prueba de identificación en el control de calidad de plantas medicinales (Sandoval, et al., 2005 a), del mismo modo proporciona la información para localizar metabolitos secundarios con actividad biológica en estructuras específicas (Bilkova, et al., 1999; Gersbach, et al., 2001; Gershenzon, et al., 1989).



3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos que a continuación se mencionan son los recomendados por la Organización Mundial de la Salud (1998, 2007 a) para el control de calidad de drogas de origen vegetal. Algunos de ellos ya se encuentran incluidos en la edición vigente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM, 2008) y en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM, 2001).

3.1 Material vegetal

- El material vegetal *Verbena carolina*, se recolectó en el municipio de Hueyapan, Morelos en abril del 2005 y fue identificado por la M. en C. Margarita Avilés y la M. en C. Macrina Fuentes. Un ejemplar de referencia fue depositado en el Herbario del Instituto Nacional de Antropología e Historia de Morelos, identificado con el número de clasificación: INAHM-2018.

- La raíz de *Heliopsis longipes*, fue recolectada a 3 km S de “Las presillas” y a 4 km N de “Mesa de palotes”, a 2 285 m.s.n.m, en el municipio San Luis de la Paz, Guanajuato, México; el material vegetal fue identificado por el M. en C. Ramiro Ríos Gómez. Un ejemplar de referencia fue depositado en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores de Zaragoza y registrado con el número 5904.

3.2 Material y equipo utilizado

El proceso de fragmentación para *V. carolina* a gran escala se llevó a cabo en un molino de cuchillas modelo Thomas-Wiley No. 4 y en menor escala, tanto para *V. carolina* como para *H. longipes*, se realizó en una licuadora Black & Decker modelo BL-500. Después de la fragmentación para cernir el material vegetal se utilizó una malla de 2 mm.

Para la realización de los cortes de raíz, hoja y tallo, se empleó el micrótopo de rotación Reichert. La observación de los tejidos a partir de las preparaciones histológicas fue hecha mediante el fotomicroscopio Axioskop Zeiss; la captura de



imágenes se realizó mediante la cámara de video (acoplada al microscopio) Sony ExwaveHad Mod. SSC-DC54A y con ayuda del software Ulead VideoStudio 11, para la edición de la imágenes se empleó Adobe Photoshop Elements 9 y Jasc Paint Shop Pro 8.

Los análisis de cromatografía en capa fina, se llevaron a cabo en cromatofolios Alugram Sil G/UV₂₅₄ Macherey-Nagel Duren. Para el aislamiento del verbascósido se empleó una placa preparativa DC- Fertigplatten SIL G-100 UV₂₅₄, 10 mm. Como reveladores cromatográficos se emplearon una lámpara de luz UV Spectroline Modelo ENF-240c de longitud de onda a 254 y 365 nm y una solución de sulfato cérico amoniacal ((NH₄)₄Ce(SO₄)).

Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se determinaron a 400 MHz, los espectrómetros analíticos empleados fueron: VARIAN INOVA 400MR Mod para ¹H y VARIAN INOVA 400/100.5 VNMRS Mod. para ¹³C. El disolvente que se empleó fue CD₃OD y como referencia interna TMS.

La incineración para la determinación de cenizas se llevó a cabo en una mufla Thermolyne 1500 Furnace. En la determinación de cenizas insolubles en ácido se utilizó papel filtro Whatman Ashless 40 Para las determinaciones de material extraíble y materia volátil se empleó un Horno Felisa Mod. FE-241.

La determinación de Pb y Cd se realizaron mediante Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica, usando un equipo marca Perkin-Elmer, modelo AAnalyst 600 con corrección por efecto Zeeman. Mientras que la determinación de Hg se realizó mediante Espectrometría de Absorción Atómica en la modalidad de Vapor Frío de Mercurio, usando un equipo marca Perkin-Elmer, modelo AAnalyst 100 con MHS-10. Para las tres determinaciones, la digestión se realizó vía húmeda con HNO₃ y H₂O₂, en sistema cerrado usando microondas marca Milestone, modelo MLS 1200 Mega. Todo lo anterior se llevó a cabo en el departamento de Química Analítica, laboratorio 103 de esta Facultad.



Para la esterilización de medios de cultivo, tubos y pipetas en la determinación de límite microbiano por ausencia o presencia de microorganismos patógenos; se empleó un autoclave AESA Mod. CV-30.

3.3 Ensayos de Identidad

3.3.1 Identificación microscópica

Del material vegetal seco de ambas especies, se tomó una muestra de hoja, tallo y raíz para poder realizar los estudios histológicos e histoquímicos.

En el caso de la raíz y el tallo se tomaron muestras de la menor longitud posible para mantener íntegros los tejidos (aproximadamente de 3-4cm). En el caso de la hoja se tomaron muestras que incluyeran la sección de la vena media y de los contornos.

Es preciso mencionar que se tomó como base la metodología expuesta en Sandoval, et al., 2005 y se realizaron las modificaciones pertinentes considerando la naturaleza de las muestras vegetales.

3.3.1.1 Tratamiento previo a las técnicas histológicas e histoquímicas

A. Técnica de ablandamiento y rehidratación

En la Tabla 5 se describe el proceso de ablandamiento y rehidratación.

Tabla 5. Técnica de ablandamiento para hoja, tallo y raíz.

HOJA	TALLO Y RAÍZ
<ul style="list-style-type: none">• Se colocaron 10 hojas en un vaso de precipitados con agua y un poco de detergente en polvo comercial sobre una parrilla de calentamiento; se dejó hervir durante 5 min.• Se lavó el exceso de detergente con agua y con la ayuda de una navaja de un solo filo se cortaron secciones transversales de aproximadamente 1.5 cm² de la región media incluyendo el margen de la hoja.	<ul style="list-style-type: none">• Se colocaron por separado las muestras de raíz y tallo en un vaso de precipitados con agua y un poco de detergente sobre una parrilla de calentamiento, se dejaron hervir durante 30 min.• Se lavó con agua el exceso de detergente de las muestras y posteriormente se colocaron en un frasco con una solución de etilendiamina al 10%, a 50-60°C durante 24 hrs.• Se lavó con agua el exceso de la solución anterior y se realizaron cortes de 1-2 cm de longitud.



B Técnica de fijación

En la tabla 6 se describe el proceso para la fijación.

Tabla 6 . Técnica de fijación para hoja, tallo y raíz.

HOJA	<ul style="list-style-type: none">• Las secciones de muestra obtenidas en la técnica de ablandamiento se colocaron en un frasco con 6 mL del Reactivo de Navashin (3mL solución A + 3mL solución B) durante un día.• El exceso del reactivo anterior se lavó con agua corriente durante 30 min.
TALLO Y RAÍZ	<ul style="list-style-type: none">• Las secciones obtenidas por la técnica de ablandamiento se colocaron en contacto con la mezcla FAA durante 24 hrs.• El exceso de la mezcla anterior se lavó con agua corriente durante 30 min.

C. Técnica de deshidratación e infiltración/inclusión

La deshidratación se realizó con alcohol butílico terciario (ABT) donde éste es también capaz de disolver a la parafina.

La serie de deshidratación fue la misma para las hojas, tallo y raíz, sólo fue modificado el tiempo entre cada lavado.

Las muestras obtenidas en el proceso anterior se colocaron en frascos pequeños de vidrio, aproximadamente de 20 cm, con tapa de metal.

En la Tabla 7 se describe el proceso de deshidratación.



Tabla 7. Serie de deshidratación con alcohol butílico terciario (ABT)

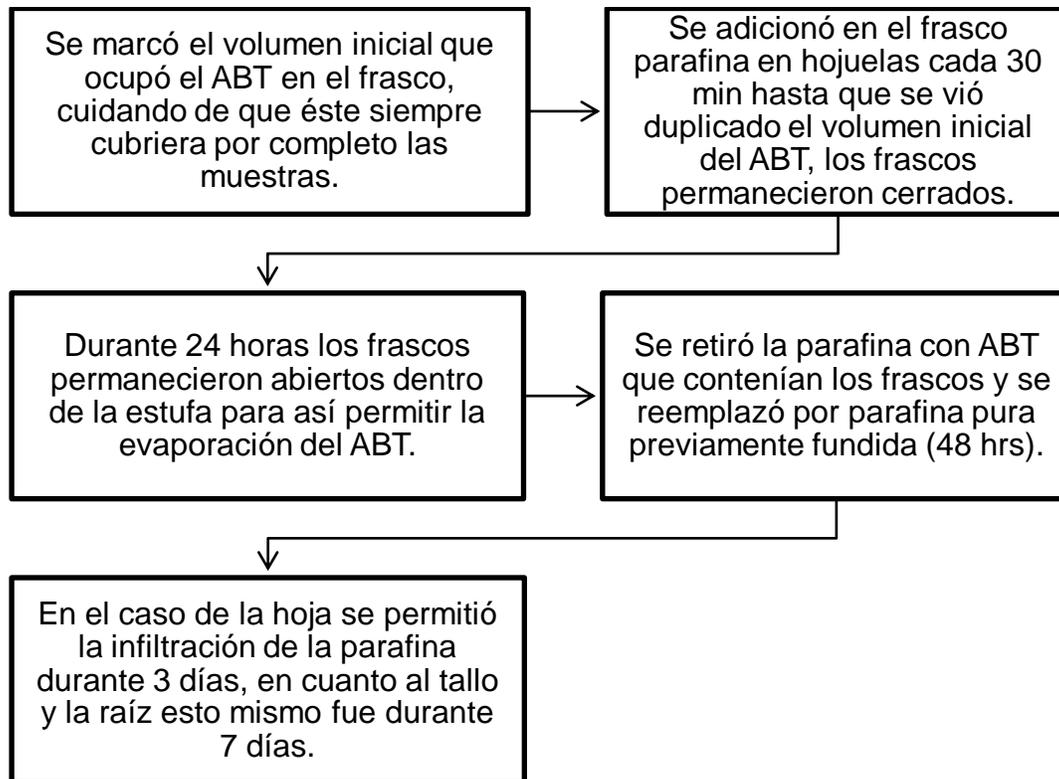
ABT 100%(mL)	EtOH 100% (mL)	EtOH 95% (mL)	H ₂ O (mL)	[] final (%)	Temp. (°C)	Tiempo Hoja (hrs)	Tiempo Raíz y tallo (h)
5	0	30	65	≈35	22±5	24	72
10	0	40	50	≈50	22±5	24	72
15	0	45	30	≈60	22±5	24	72
20	0	50	30	≈70	22±5	24	72
35	0	50	15	≈85	22±5	24	72
55	0	45	0	≈100	22±5	24	72
75	25	0	0	100	22±5	24	72
100	0	0	0	100	59±1	24	72
100	0	0	0	100	59±1	24	72
100	0	0	0	100	59±1	24	72

*Cabe mencionar que el ABT se solidifica por debajo de los 18°C, por lo que al momento de adicionarlo fue necesario que éste se hallara colocado previamente en un baño María.

Al terminar el periodo del tercer cambio de ABT al 100%, el proceso de deshidratación se da por terminado, con esto los tejidos se encontraron listos para la infiltración gradual con parafina a una temperatura de ± 58°C.

Previo a comenzar el proceso de infiltración, las muestras continuaron en una estufa a una temperatura entre 58-60°C.

En el Esquema 1, se describe el proceso de infiltración para las tres diferentes estructuras vegetales, haciendo las especificaciones pertinentes según sea el caso:



Esquema 1. Proceso de infiltración para hoja, tallo y raíz.

Al término del proceso anterior se procedió a la inclusión de las muestras en parafina a través de la elaboración de los bloques de parafina. Las muestras se colocaron dentro de las cajas de papel previamente elaboradas, orientándolas de modo que se pudieran realizar cortes transversales, esto se pudo hacer con la ayuda de unas pinzas y una aguja de disección previamente calentadas con una lámpara de alcohol; al vaciar la parafina caliente, se tuvo especial cuidado en que no se formaran burbujas, para esto fue útil la ayuda de la aguja de disección caliente para que así permitiera deshacer las burbujas.

Los bloques se dejaron enfriar para así posteriormente con ayuda de una navaja de rasurar darles forma parecida a la de una pirámide. Dichos bloques se unieron a unos cubos de madera, calentando la base de los bloques con una aguja caliente y reforzando la unión con más parafina. Se realizaron 8 bloques por cada una de las estructuras vegetales.

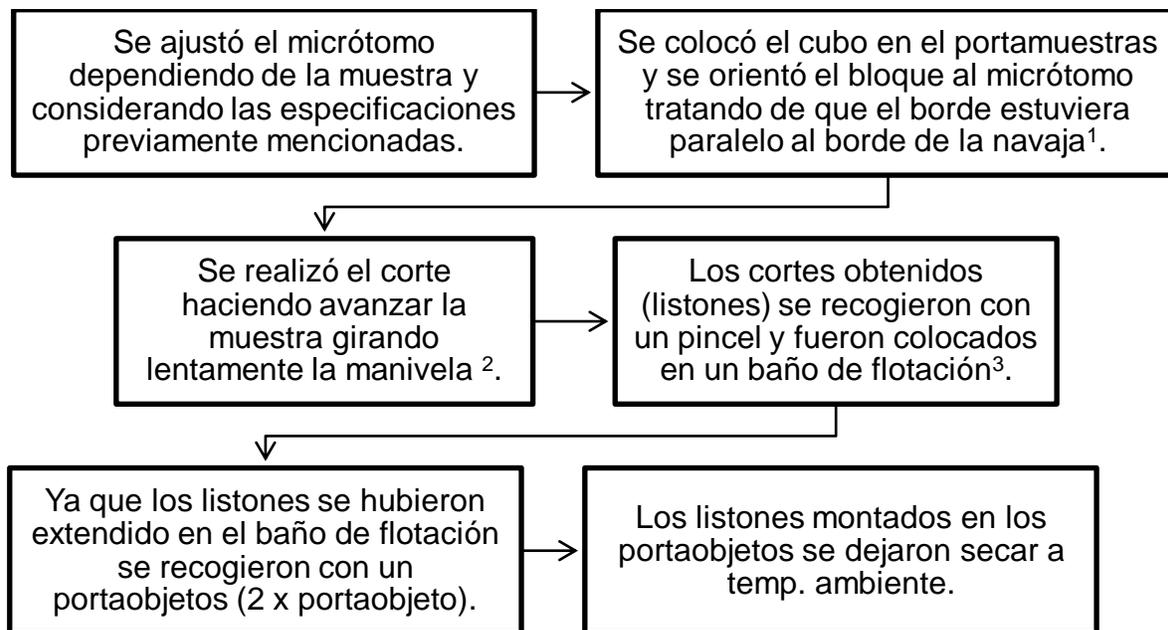
Los bloques de parafina se elaboraron para ayudar en la manipulación de las muestras al momento de realizar los cortes en el micrótomó de rotación.



D. Técnica de corte de material embebido en parafina

Tanto para la hoja como para el tallo y la raíz se realizaron secciones transversales; en el caso de la hoja las secciones fueron de un espesor de 12 μm , mientras para el tallo y la raíz fueron de 18-22 μm .

El corte en el micrótopo se realizó del modo como se muestra en el Esquema 2.



¹ El ángulo de inclinación de la navaja fue aproximadamente de 45°.

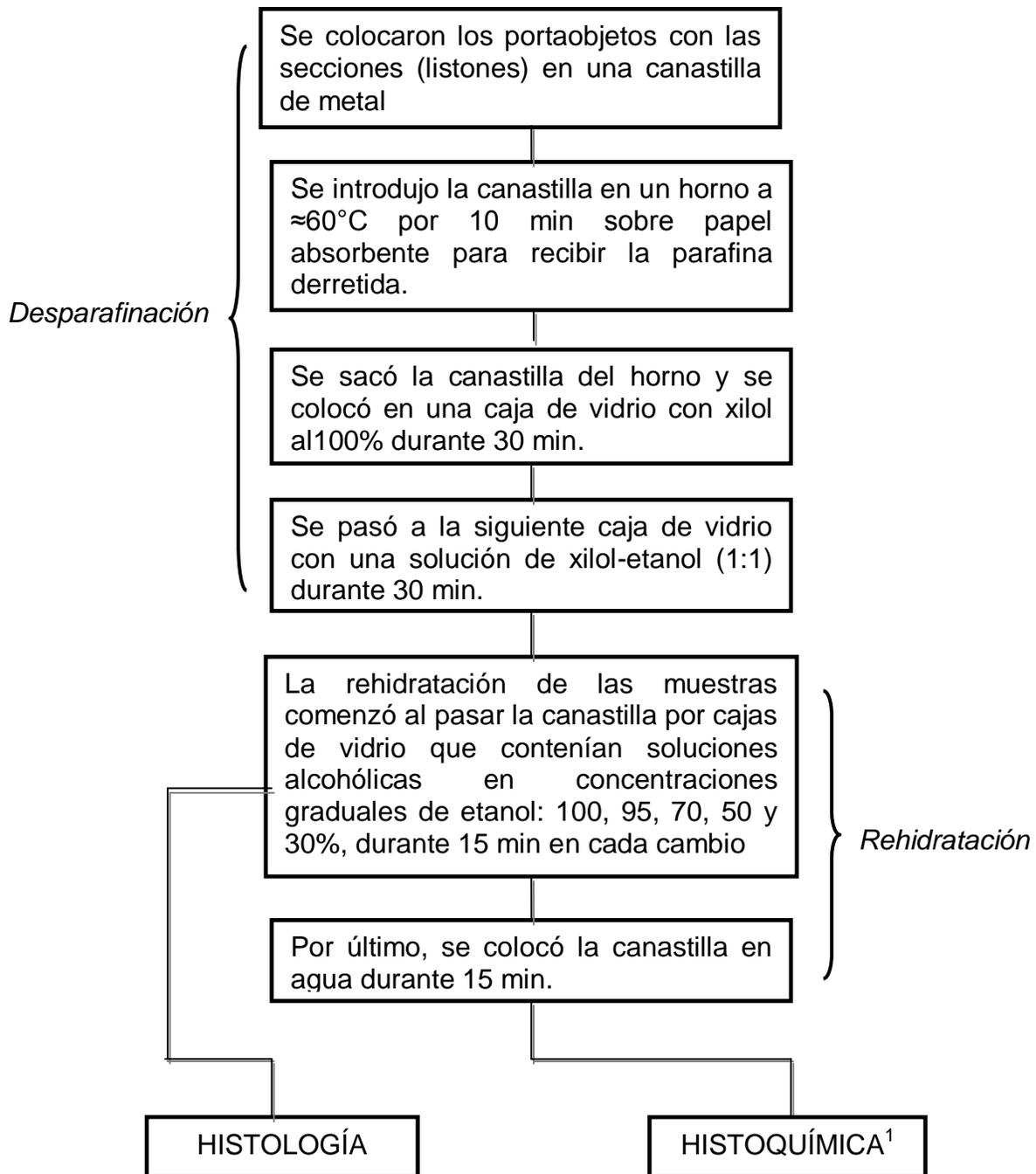
² Durante el proceso de corte fue importante mantener la navaja limpia y para esto se utilizó una gasa impregnada de xilol, de este modo se evitó que la sección obtenida se adhiriera a la navaja y se rompiera.

³ Como baño de flotación se empleó un cristizador con agua a una temperatura entre 48-50°C al que se le espolvoreó grenetina.

Esquema 2. Técnica de corte de material embebido en parafina.

E. Técnica de desparafinación y rehidratación de las muestras

La realización de esta técnica en particular se debe a que la parafina no es soluble en agua, lo cual no permitiría la acción de los colorantes acuosos para la posterior tinción y contraste de los tejidos vegetales. En el Esquema 3 se describe la técnica empleada. Una parte de las muestras se utilizó para elaborar preparaciones histológicas permanentes y otra para realizar las pruebas histoquímicas.



Esquema 3. Proceso de desparafinación y rehidratación de las muestras.

¹En el caso de la tinción histoquímica, particularmente para determinar la presencia de aceites, grasa y cutina, únicamente se rehidratarán las muestras hasta llegar a la solución de alcohol al 50%. Al finalizar el proceso anterior, las muestras en los portaobjetos se encontraron listas para la realización de las técnicas posteriores (técnicas histoquímicas o tinción para histología).

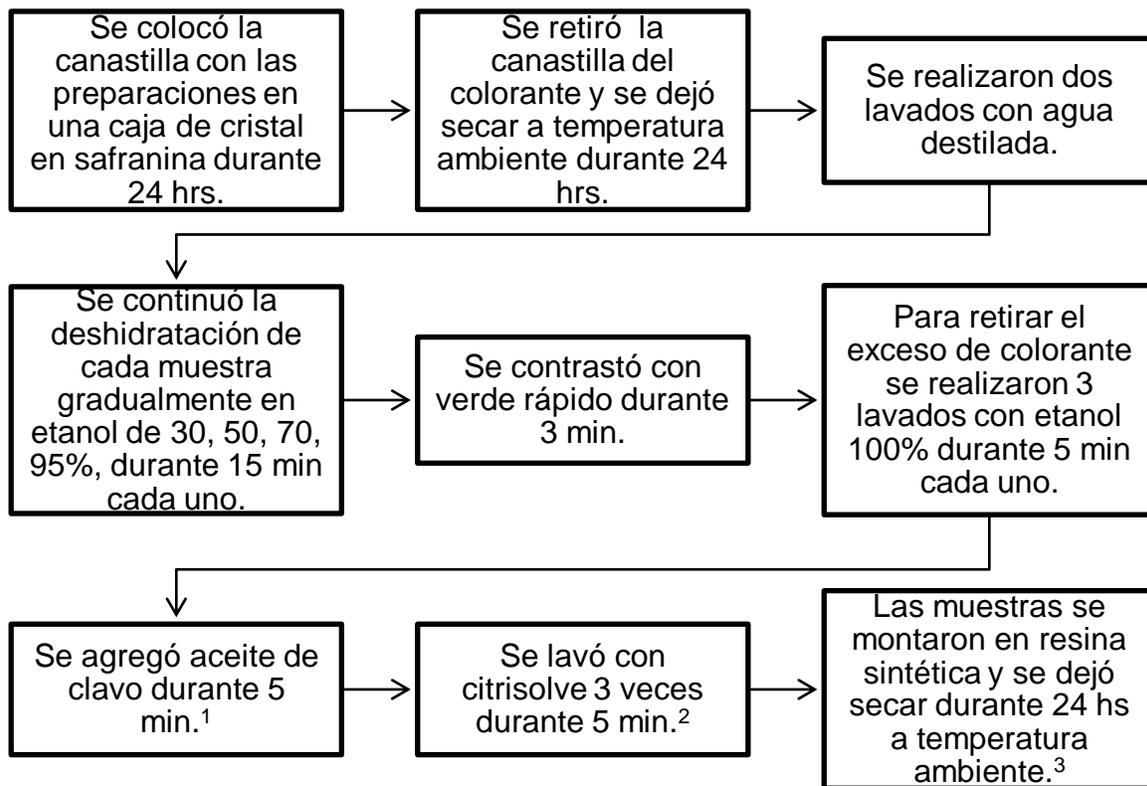


3.3.1.2 Histología

Para conocer la naturaleza y niveles de organización de los tejidos en los órganos vegetales (hoja, tallo y raíz), se realizó la tinción de contraste: Tinción con safranina “O”–verde rápido FC.

A. Técnica de tinción para histología

Después de haber realizado el proceso descrito en el Esquema 3, se procedió a realizar la tinción del modo representado en el Esquema 4.



¹El aceite de clavo se emplea tanto como agente clarificante como para evitar la rehidratación de las muestras.

²El citrisolv además de ser también agente clarificante, permite lavar el exceso del aceite de clavo y ser un adecuado medio de montaje.

³Sobre la resina sintética se coloca un cubreobjetos, teniendo especial cuidado de que al colocarlo no forme burbujas; esto se logra al ejercer presión uniforme al comenzar por uno de sus lados y dejándolo caer suavemente

Esquema 4. Tinción con safranina “O”–verde rápido FC



B. Limpieza y etiquetado de las preparaciones

Para comenzar el proceso de limpieza se colocaron las preparaciones histológicas ya montadas en un horno a $\approx 60^{\circ}\text{C}$ durante 15-20 días para lograr que la resina se secase, posteriormente el exceso de resina se retiró raspando con una navaja los alrededores del cubreobjetos.

Los colorantes y cualquier resto de grasa se eliminaron pasando algodón impregnado con alcohol al 95% alrededor del portaobjetos. Ya limpias las preparaciones, se procedió a la elaboración de las etiquetas para la identificación de cada una de ellas. En la Figura 5, se muestra un ejemplo de etiqueta de identificación.

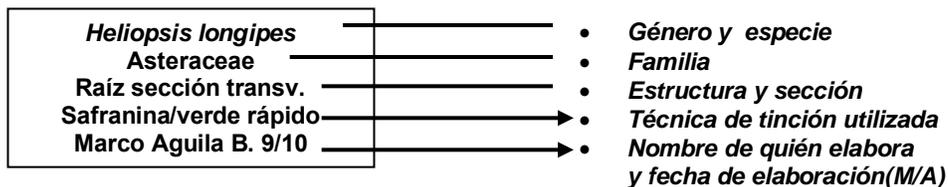


Figura 5. Ejemplo de etiqueta de identificación

Las preparaciones se depositaron en la colección científica del Laboratorio de Apoyo a la Investigación del Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM.

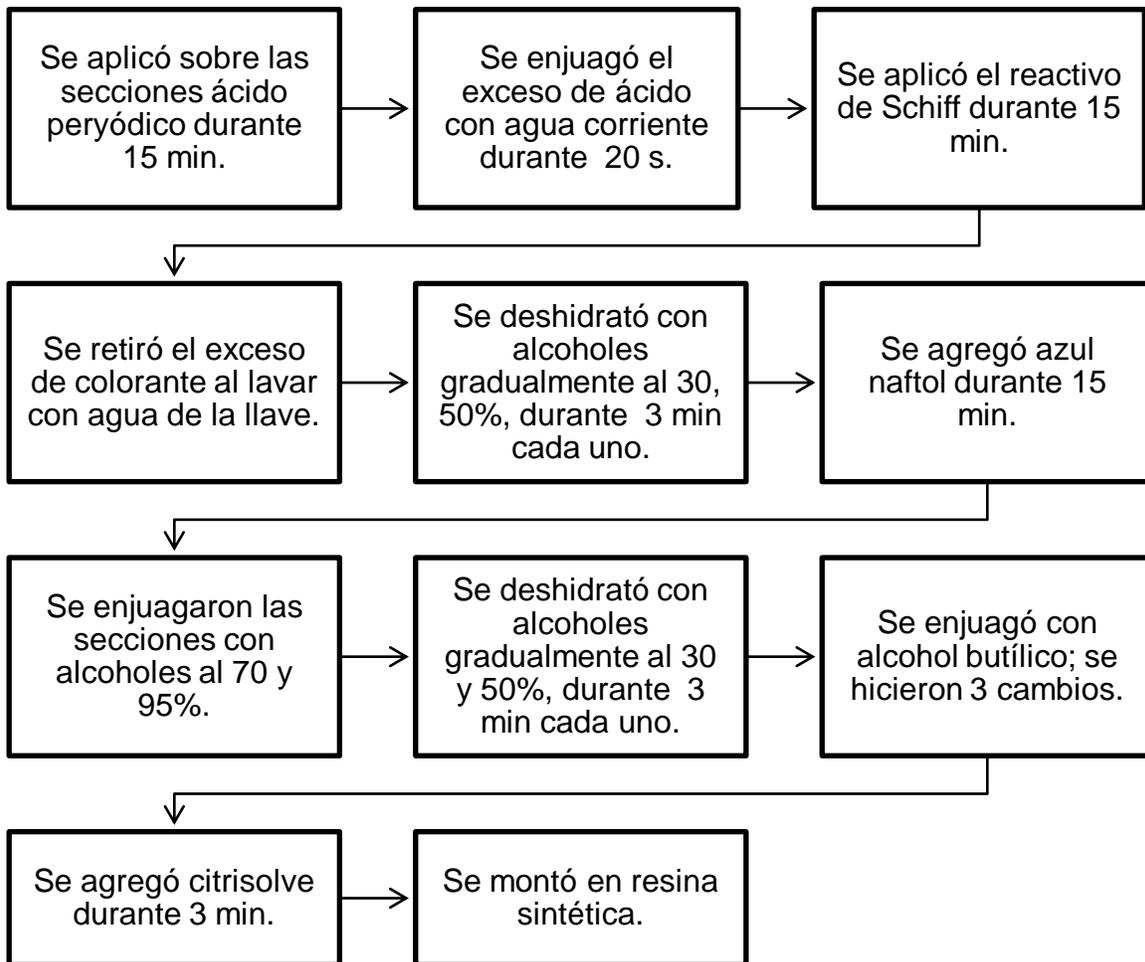
3.3.1.3 Histoquímica

Estas técnicas se realizaron aplicando diversos reactivos a las muestras con base en las características bioquímicas e histoquímicas específicas de sus tejidos vegetales. Después de haber realizado el proceso descrito en el Esquema 3. se procedió a realizar cada técnica histoquímica como a continuación se desglosa.

A. Identificación de polisacáridos y proteínas

Tanto los polisacáridos como las proteínas son elementos estructurales de las células vegetales aunque en el caso de las proteínas es posible encontrarlas en forma de almacenamiento en forma amorfa o en forma de cristales.

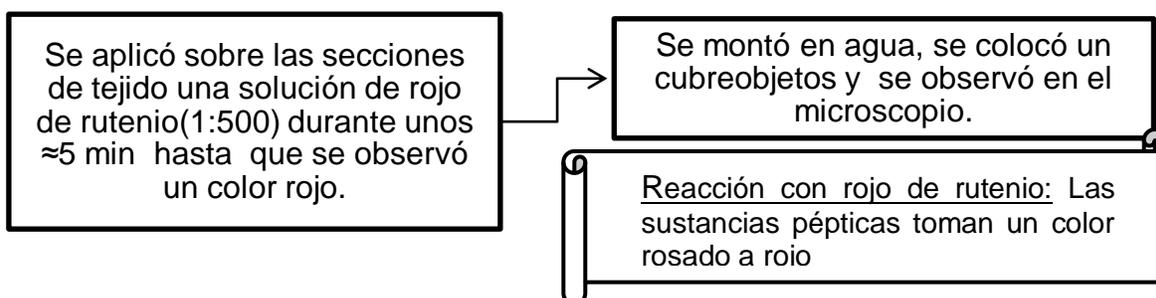
En el Esquema 5 se describe la tinción realizada con ácido peryódico y reactivo de Schiff para esta determinación.



Esquema 5. Identificación de polisacáridos y proteínas

B. Identificación de pectinas

Las pectinas comprenden el grupo de polisacáridos más solubles y son uno de los principales componentes de la pared celular. En el Esquema 6 se describe la tinción con rojo de rutenio para su identificación.

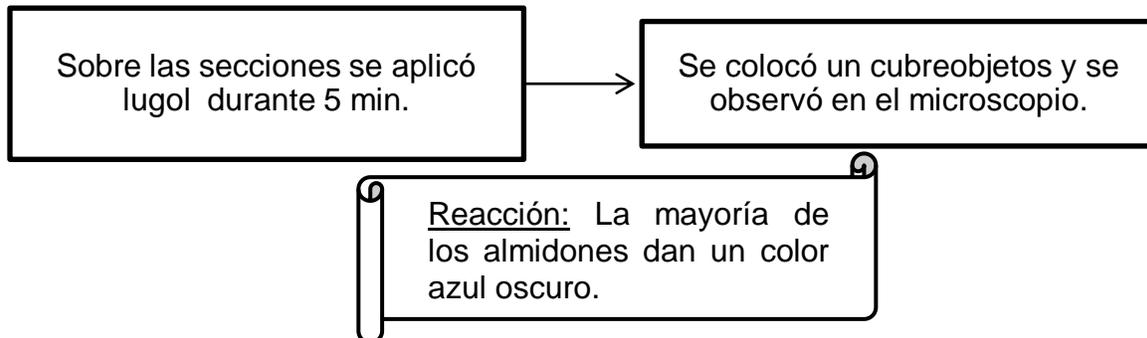


Esquema 6. Identificación de pectinas.



C. Identificación de almidón

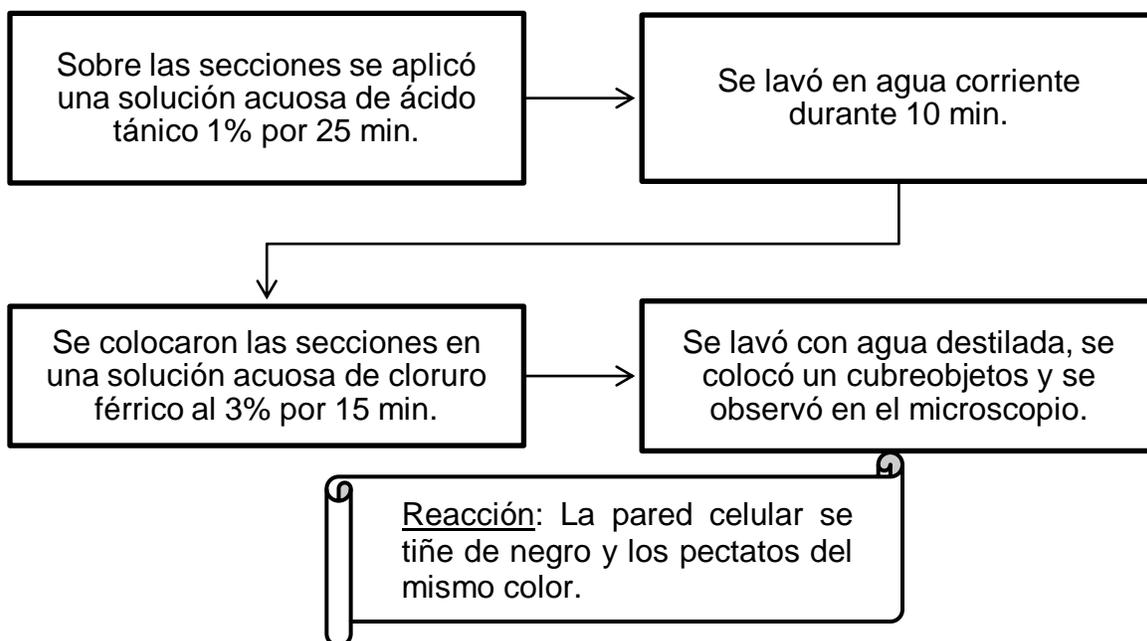
Polímero de reserva más común, se sintetiza en los amiloplastos y puede estar como reserva por una duración más o menos larga (diariamente en los cloroplastos formando el almidón de asimilación o en los amiloplastos formando el de almacenamiento de larga duración). En el Esquema 7 se describe la tinción con lugol para su identificación.



Esquema 7. Identificación de almidón.

D. Identificación de pectatos de calcio

Los pectatos de calcio son formadores importantes de las paredes de todos los elementos celulares. En el Esquema 8 se describe la tinción con ácido tánico y cloruro férrico para su identificación.

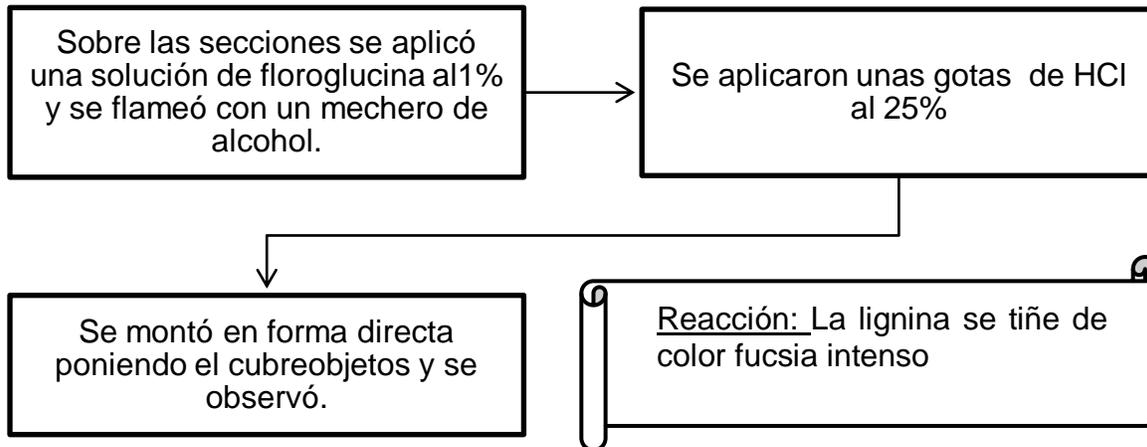


Esquema 8. Identificación de pectatos de calcio.



E. Identificación de lignina

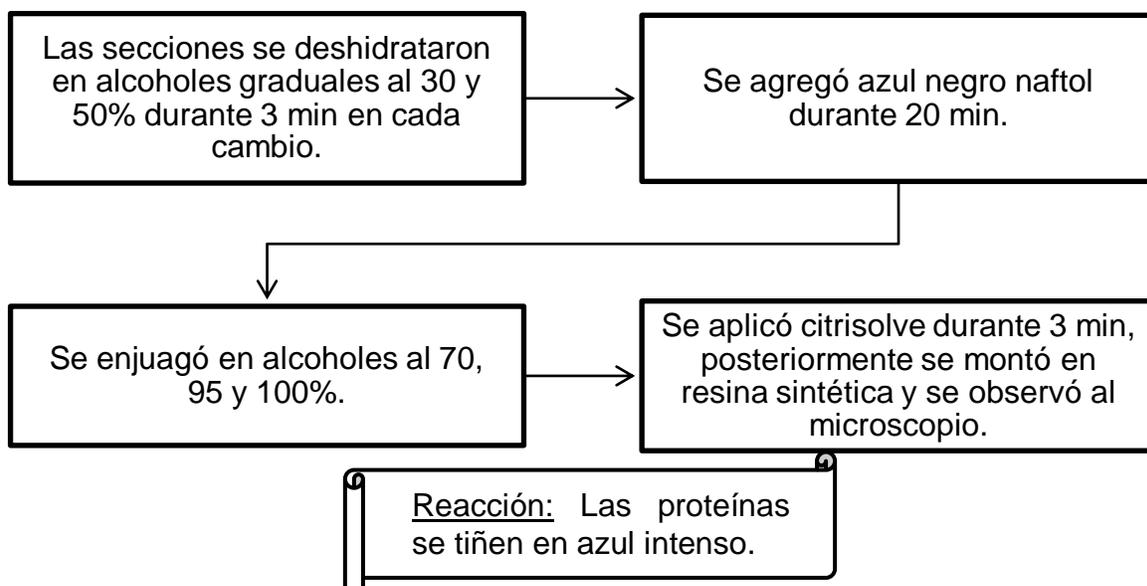
La lignina es un polímero de unidades fenólicas altamente insoluble, está presente en ciertas paredes celulares secundarias (en tejidos conductores y de sostén) y entonces hace imposible su crecimiento. En el Esquema 9 se describe la tinción con floroglucina para su indentificación.



Esquema 9. Identificación de lignina

F. Identificación de proteínas

Mediante la tinción con azul naftol es posible observar las proteínas de almacenamiento, en el Esquema 10 se describe dicho proceso de tinción.



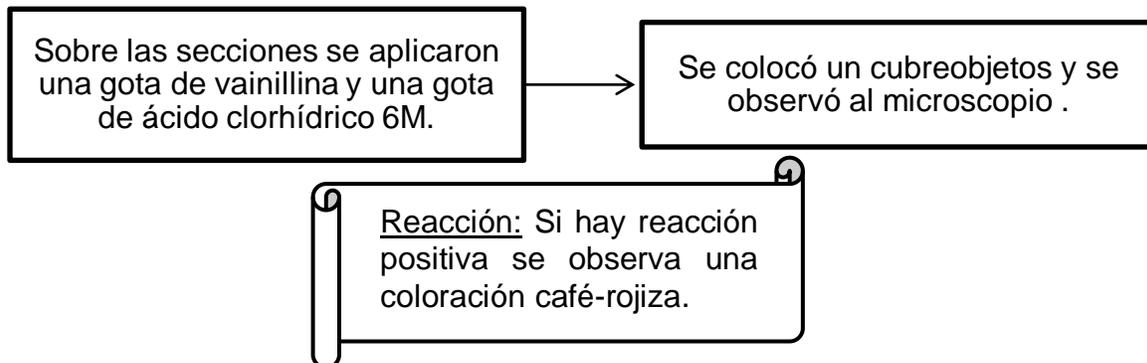
Esquema 10. Identificación de proteínas.



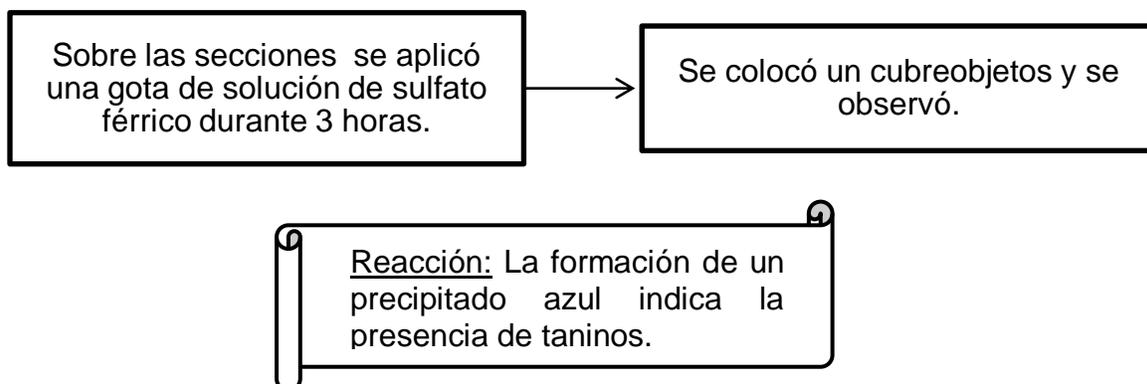
G. Identificación de taninos

Derivados polifenólicos de peso y tamaño muy variado. Son metabolitos secundarios que pueden proteger contra la deshidratación, putrefacción y ataque de insectos o parásitos.

En el Esquema 11 se describe la tinción con vainillina y ácido clorhídrico para la identificación de taninos condensados y catequinas, mientras en el Esquema 12 se describe la tinción con sulfato férrico para la identificación de taninos hidrolizables.



Esquema 11. Identificación de taninos condensados y catequinas.



Esquema 12. Identificación de taninos hidrolizables.

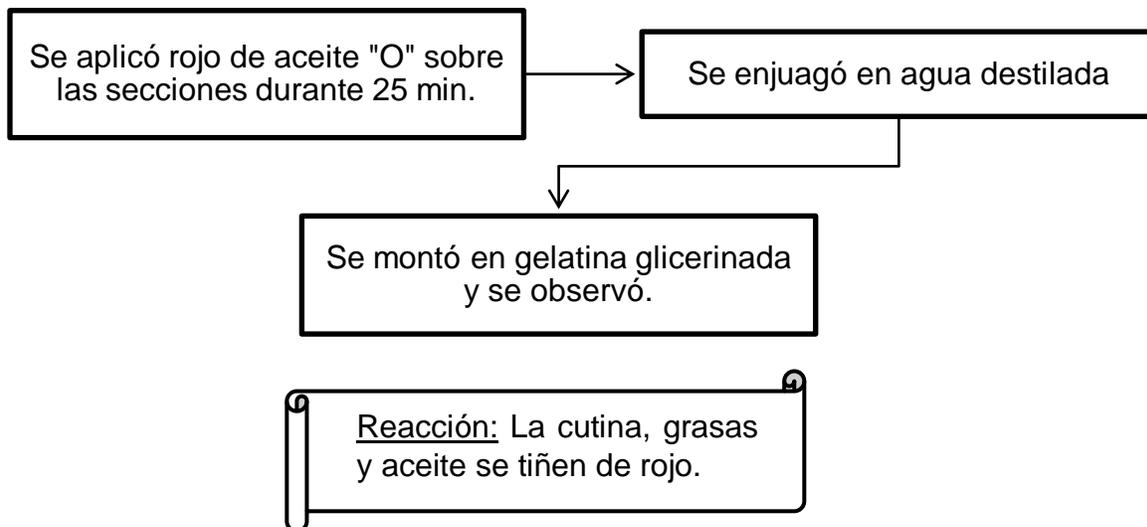


H. Identificación de aceites, grasas y cutina

Mediante la tinción con rojo de aceite "O" es posible identificar tanto elementos estructurales como sustancias de reserva. Como elementos de origen lipídico que se encuentran en la pared celular podemos mencionar a las ceras, la cutina y la suberina. Como sustancias de almacenamiento de origen lipídico podemos mencionar a las grasas y aceites esenciales.

En el Esquema 13 se describe la tinción con rojo de aceite "O" para la identificación de aceites, grasas y cutina.

Teniendo en cuenta el Esquema 3., en el caso de la identificación de aceites, grasas y cutina, es necesario sólo hidratar hasta alcohol 50%.



Esquema 13. Identificación de aceites, grasas y cutina.



3.3.2 Ensayo de identidad en cromatografía en capa fina

3.3.2.1 Ensayo de identidad en cromatografía de capa fina para *Verbena carolina* L.

A. Aislamiento e identificación estructural del verbascósido

Previo a definir el ensayo de identidad para *Verbena carolina* L., se decidió analizar la fracción F70-76 obtenida anteriormente (Morales, 2009) (Esquema 14, Parte a), la cual proviene del fraccionamiento cromatográfico en columna abierta de un extracto *n*-butanólico.

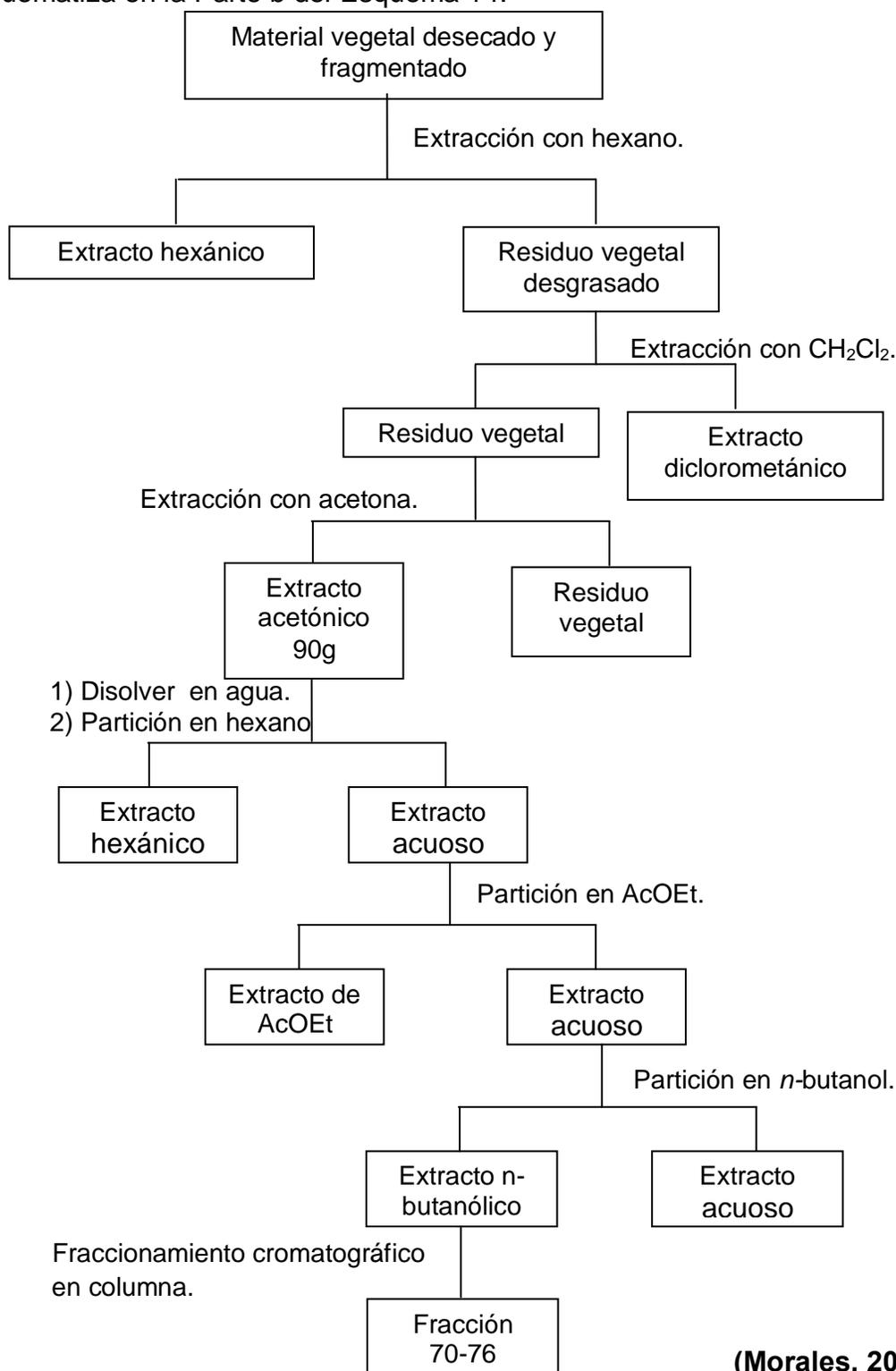
Se adsorbieron 1.017g de la fracción F70-76 en 1 g de gel de sílice, se aplicaron a una columna de cromatografía abierta de vidrio conteniendo 20 g de sílica gel. La muestra se eluyó (recolectando fracciones de 250 mL cada una) con una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ de polaridad creciente. Se recolectaron 41 fracciones, de las cuales se agruparon de la fracción 14 a la 38 debido a la similitud que presentaban sus características cromatográficas en capa fina y se denominó a este agrupamiento, fracción FA.

Se aplicaron 100 mg de FA en una placa preparativa para separar dos compuestos con R_f muy parecido, siendo el de menor polaridad mayoritario. Se eluyó en una fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (60:40). Se reveló un extremo angosto de la placa al UV con sulfato cérico amoniacal y se raspó la zona correspondiente al compuesto mayoritario la cual presentaba respuesta al UV (365 nm).

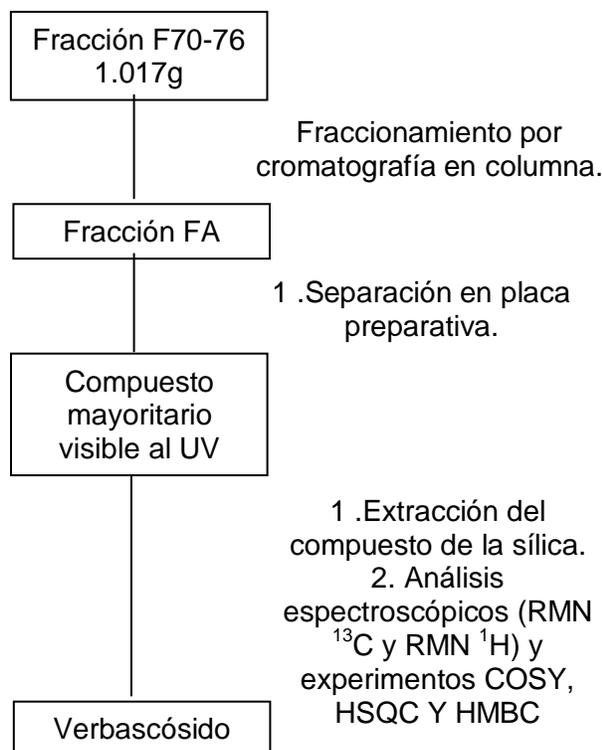
Se extrajo el compuesto de la sílica mediante agitación con MeOH durante 3 horas; se filtró a través de celita y se eliminó el disolvente al vacío. Se obtuvieron 50 mg de un polvo de color café y se envió a análisis espectroscópicos (RMN ^{13}C y RMN ^1H), así como la realización de los correspondientes experimentos COSY, HMBC y HSQC, además se compararon las características espectroscópicas con las reportadas en la literatura (Andary, et al., 1982).



Con lo anterior se pudo determinar que el compuesto aislado era el verbascósido. Lo realizado para obtener el verbascósido a partir de la fracción F70-76 se esquematiza en la Parte b del Esquema 14.



Esquema 14. Aislamiento y elucidación del verbascósido (Parte a).



Esquema 14. Aislamiento y elucidación del verbascósido (Parte b).

B. Obtención del extracto total clorofórmico/metanólico de *Verbena carolina* L.

10 g del material vegetal seco y molido se extrajeron con cloroformo-metanol 1:1 (60 mL), se dejó reposar durante 24 hrs a temperatura ambiente y con agitación constante. Se eliminó el disolvente en rotavapor.

C. Identificación por cromatografía en capa fina de tres compuestos mayoritarios del extracto acetónico de *Verbena carolina* L. como prueba de identidad.

Los estándares empleados para ser identificados en el extracto total fueron verbascósido (Fig. 1w), hastatósido (Fig. 1m) y verbenalina (Fig. 1l); el primero fue obtenido en el presente trabajo, mientras que los últimos dos fueron aislados e identificados en un trabajo previo (Morales, 2009).



Se empleó una cromatoplaca con dimensiones de 13 x 9.1 cm, las muestras (extracto total y estándares) se aplicaron separadas entre sí, de los extremos y por encima del borde inferior a una distancia de 1.5 cm. El ancho del punto de aplicación de las muestras fue de 0.4 cm. Se empleó como fase móvil $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (80:20) y se permitió que el frente de corrida fuera de al menos 10 cm. La placa fue revelada con luz UV a 254 nm y con sulfato cérico amoniacal. Se calculó el Rf de los estándares y se comparó con el Rf de los compuestos presentes en el extracto total.

3.3.2.2 Ensayo de identidad en cromatografía de capa fina para *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake.

A. Obtención del extracto total clorofórmico de *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake.

1 g de la raíz seca y molida se maceró con 20 mL de cloroformo, durante 24 hrs a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente, se eliminó el disolvente a sequedad.

B. Identificación por cromatografía en capa fina del componente mayoritario del extracto clorofórmico de *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake como prueba de identidad.

Se empleó afinina como estándar, previamente obtenida, identificada y caracterizada (Castillo, 2009) la cual constituye el metabolito secundario mayoritario en la raíz.

En una cromatoplaca con dimensiones de 13 x 5.3 cm, las muestras (extracto total y estándar) se aplicaron separadas de los extremos, entre ellas y por encima del borde inferior a una distancia de 1.5 cm. El ancho del punto de aplicación de las muestras fue de 0.4 cm. Se empleó como fase móvil hexano/AcOEt (70:30) y se permitió que el frente de corrida fuera de al menos 10 cm. La placa fue revelada en UV a 254 nm y con sulfato cérico amoniacal. Se calculó el Rf del estándar y se localizó éste metabolito en el extracto total por comparación con el Rf del compuesto mayoritario del extracto total.



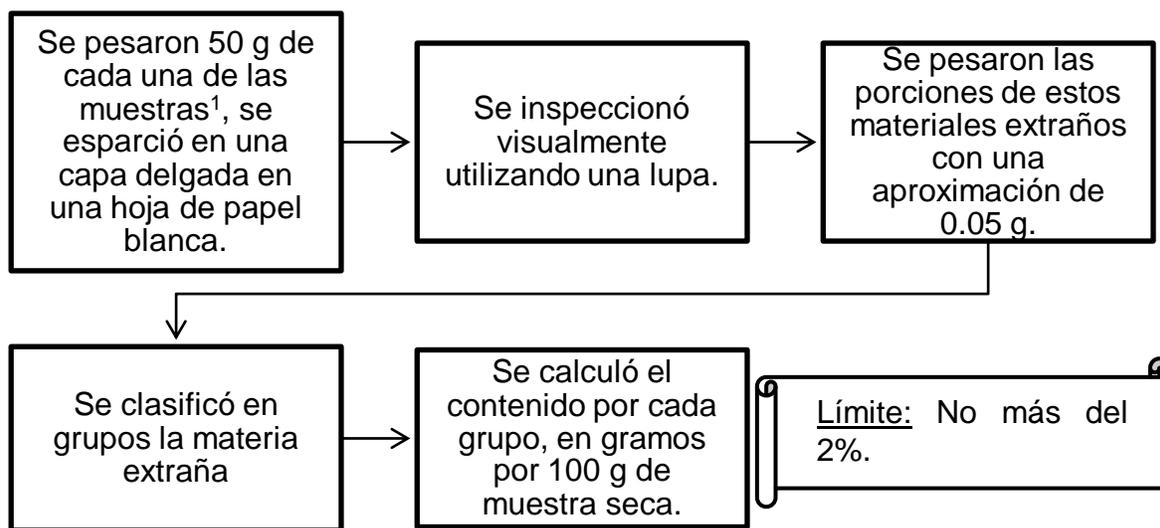
3.4 Ensayos de pureza

Para los ensayos de pureza fue necesario moler el material vegetal y cernirlo a través de una malla de 2 mm. Este material constituyó la muestra de análisis.

3.4.1 Determinación de materia extraña

Esta determinación se realizó tanto para *V. carolina* como para *H. longipes*.

De acuerdo con el MGA-FH-0030 Materia Extraña, en el Esquema 15 se describe el proceso para esta determinación.



*Cada una de las muestras se refiere tanto a la muestra de *V. carolina* como la muestra de *H. longipes*.

Esquema 15. Determinación de materia extraña.

3.4.2 Metales pesados

En esta prueba se determinó la cantidad de plomo, cadmio y mercurio en las partes aéreas de *V. carolina* y en la raíz de *H. longipes*, para lo cual se pesaron 5 g del material vegetal. La determinación de Pb y Cd se llevó a cabo mediante Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica, mientras que la determinación de Hg se llevó a cabo mediante Espectrometría de Absorción Atómica en la modalidad de Vapor Frío de Mercurio.

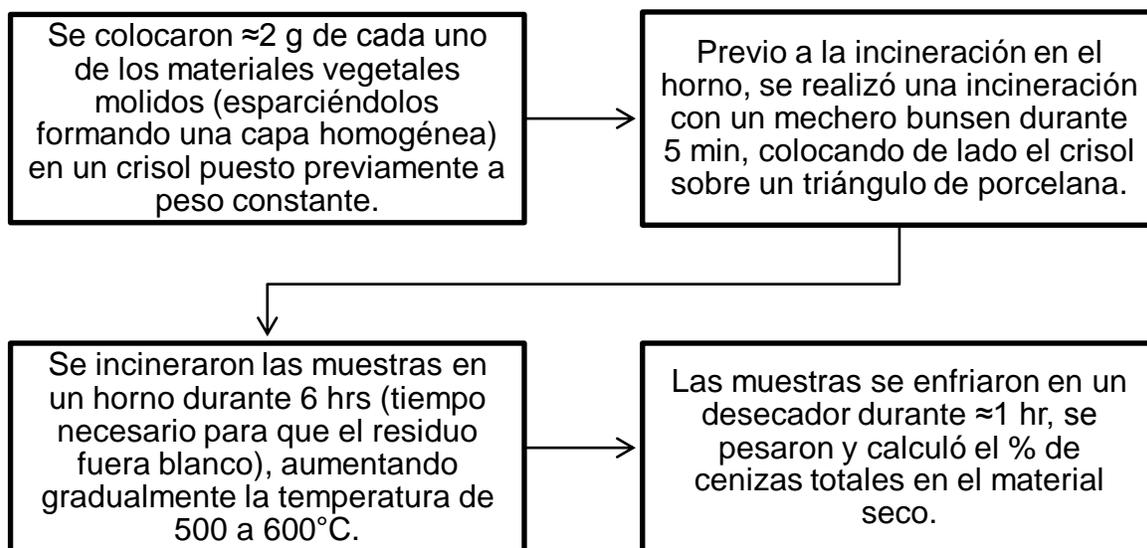


3.4.3 Determinación de cenizas

La determinación de cenizas se efectuó para *V. carolina* mediante dos métodos diferentes: Determinación de cenizas totales y Determinación de cenizas insolubles al ácido; mientras que para *H. longipes* decidió realizarse únicamente la Determinación de cenizas totales.

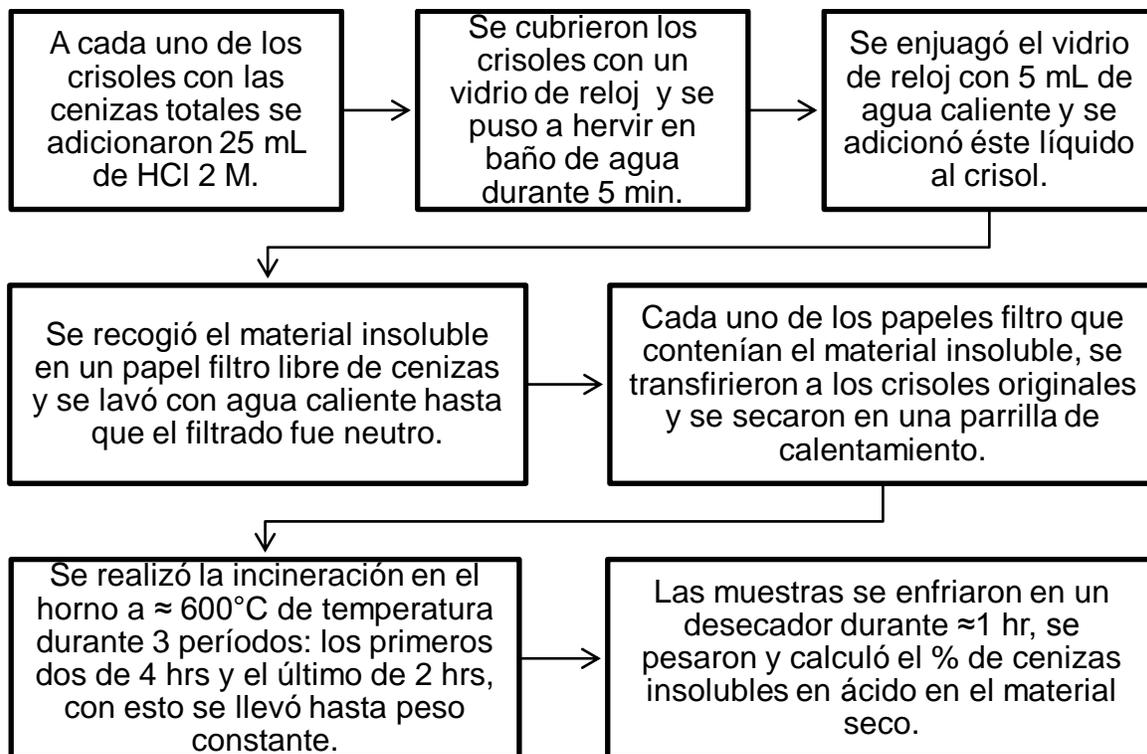
Para ambos materiales vegetales la determinación se realizó por cuadruplicado. Se realizó una media de las determinaciones realizadas.

De acuerdo con el MGA-FH-0060 Determinación de cenizas, en el Esquema 16 y 17 se describe el proceso para los métodos realizados.



*Para ambos materiales vegetales la determinación se realizó por cuadruplicado. Se realizó una media de las determinaciones realizadas.

Esquema 16. Determinación de cenizas totales



Esquema 17. Determinación de cenizas insolubles en ácido.

3.4.4 Material extraíble

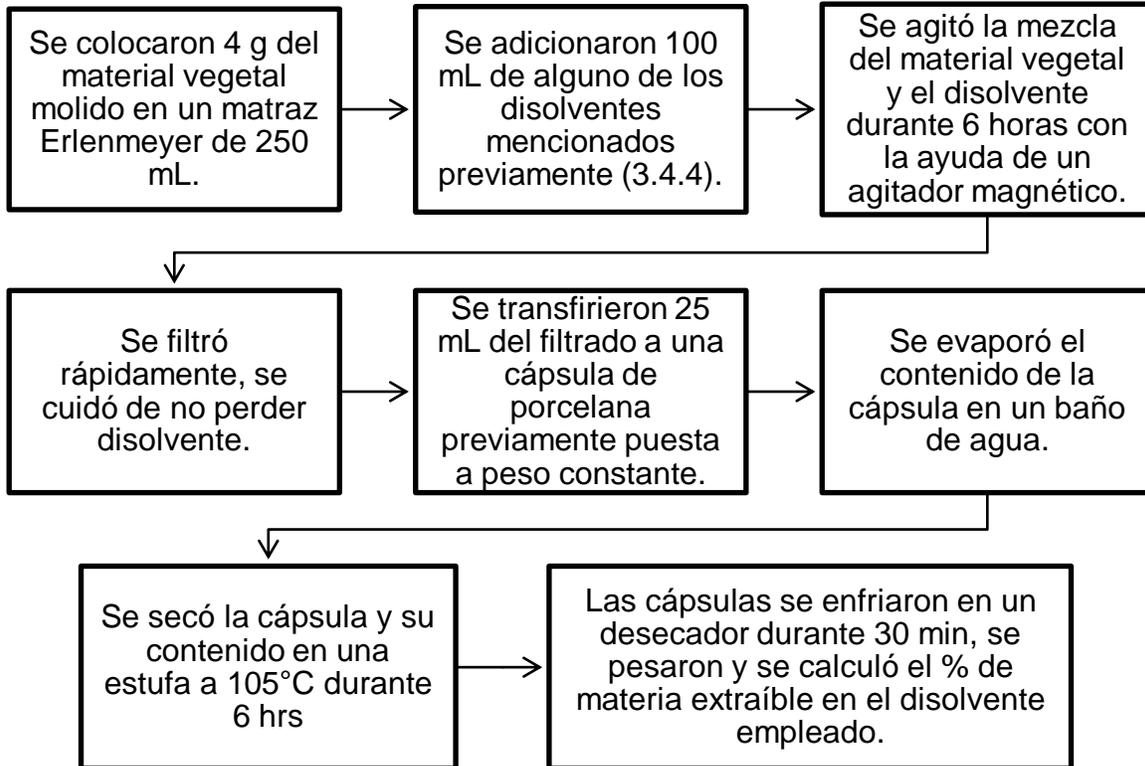
Esta determinación se realizó sólo para *V. carolina*, los disolventes que se emplearon fueron hexano, etanol y etanol:agua (7:3).

De acuerdo al Método 2. Maceración en frío del MGA-FH 0070 Material Extraíble, en el Esquema 18 se describe el proceso para las determinaciones hechas del material extraíble en cada uno los disolvente mencionados.

3.4.5 Índice de hinchamiento

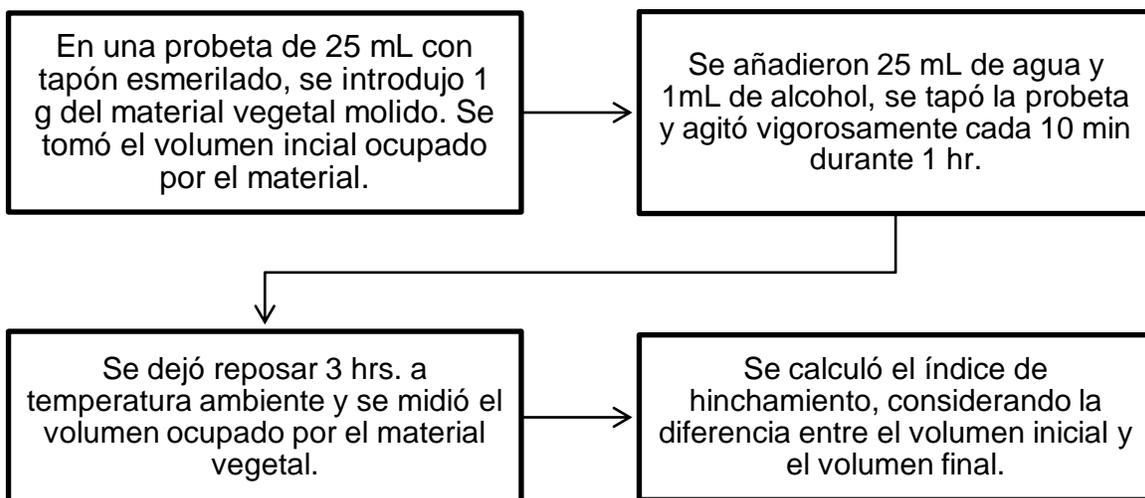
La determinación del índice de hinchamiento se efectuó para *V. carolina* y de igual modo para *H. longipes*.

De acuerdo con el MGA-FH-0130 Índice de hinchamiento, en el Esquema 19 se describe el proceso llevado a cabo para esta determinación.



*Cada una de las determinaciones hechas con los disolventes empleados se realizó por cuadruplicado. Se realizó una media de las determinaciones realizadas.

Esquema 18. Determinación de material extraíble



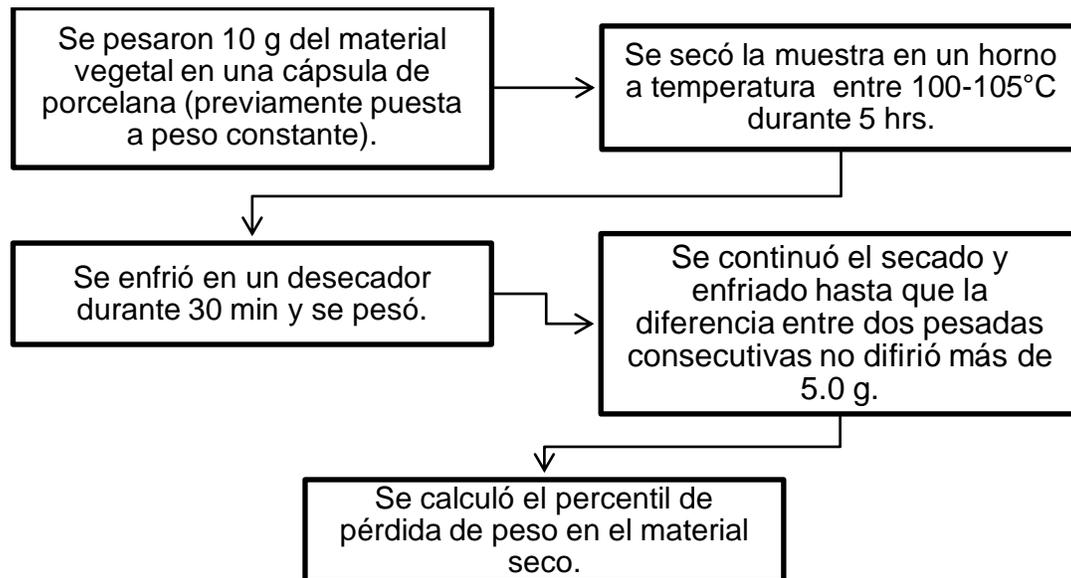
*Para ambos materiales vegetales la determinación se realizó por cuadruplicado. Se realizó una media de las determinaciones realizadas.

Esquema 19. Determinación del índice de hinchamiento.



3.4.6 Determinación de la pérdida de agua y material volátil

Esta determinación se realizó sólo para *V. carolina*. De acuerdo al Método Pérdida por secado del MGA-FH 0080 Agua y materia volátil; en el Esquema 20 se describe el proceso para dicha determinación.



*La determinación se realizó por triplicado y se hizo una media de los resultados obtenidos.

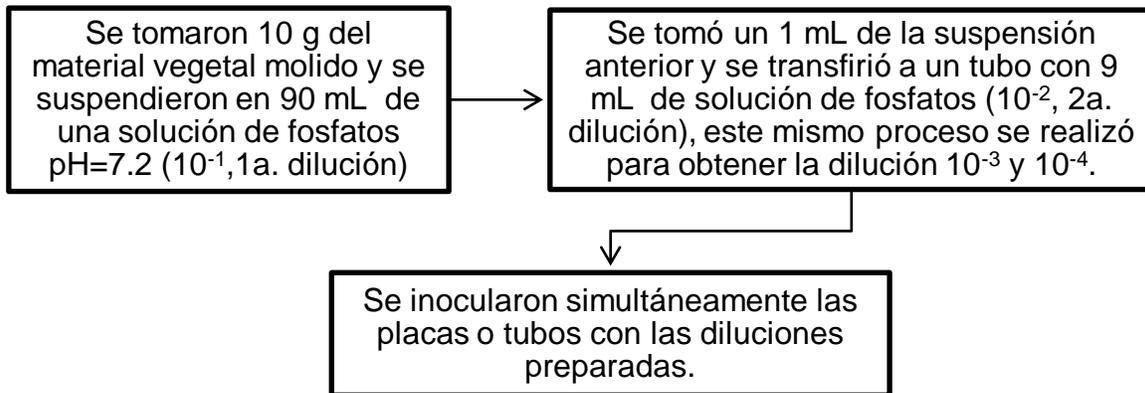
Esquema 20. Determinación de la pérdida de agua y materia volátil.

3.4.7 Determinación de límite microbiano, ausencia o presencia de microorganismos objetables

Esta determinación sólo se realizó para *V. carolina* y se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita en FEUM (2008) y FHEUM (2001).

3.4.7.1 Recuento de microorganismos mesófilos aerobios

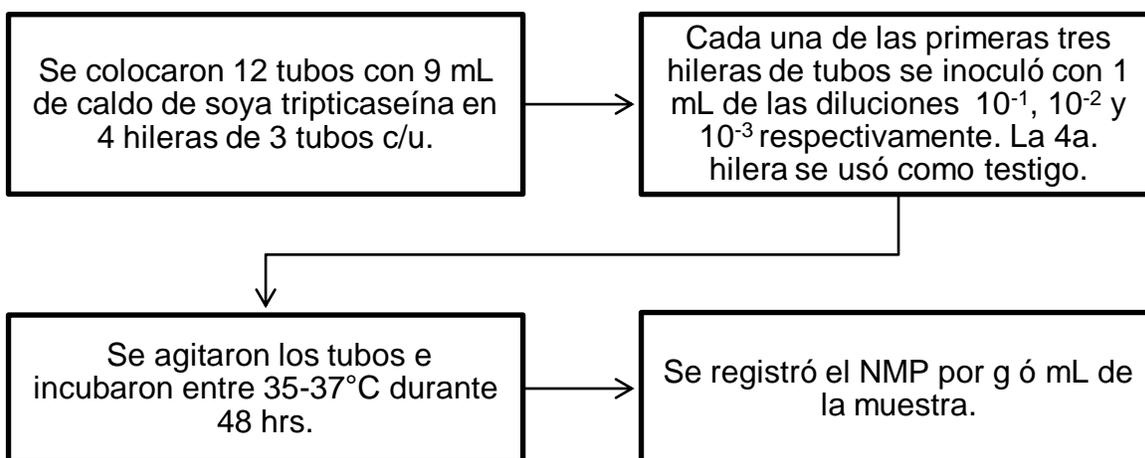
El recuento de microorganismos mesófilos aerobios decidió realizarse mediante dos métodos: Método en placa y Método en tubo. Antes de realizar cada uno de los métodos fue preciso realizar las diluciones de la muestra que se iba a analizar, por lo que en el Esquema 21 se describe dicho proceso.



*Las muestras se trabajaron bajo condiciones asépticas, el tiempo transcurrido desde la preparación de la primera dilución hasta su incorporación en el medio de cultivo no excedió una hora.

Esquema 21. Dilución de la muestra.

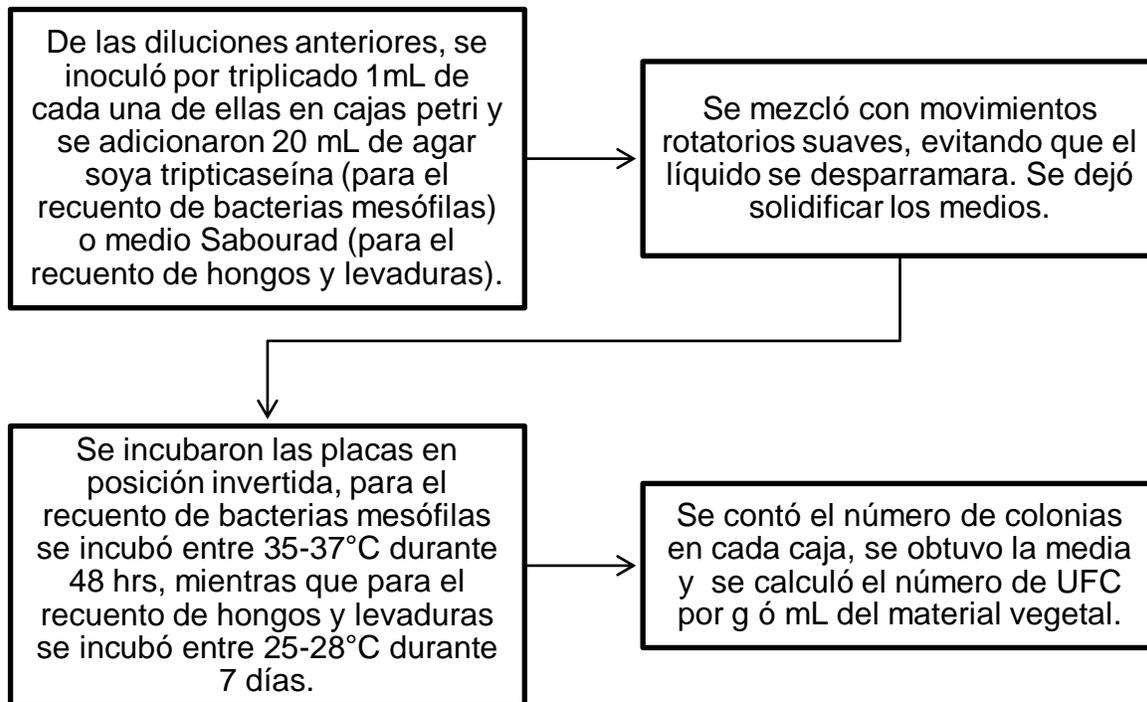
Después de la preparación de las diluciones de la muestra, se procedió a realizar cada método para el recuento de microorganismos mesófilos aerobios; mientras que por el método en placa fue posible el recuento de bacterias mesófilas así como de hongos; por el método en tubo sólo es posible el recuento de bacterias mesófilas. En los Esquemas 22 y 23 se describe el proceso para la realización de los dos métodos anteriormente mencionados.



¹Es importante que durante todo el método se trabaje bajo condiciones asépticas.

²Para la obtención del NMP es necesario consultar el Anexo III.

Esquema 22. Recuento de bacterias mesófilas por el método en tubo (NMP)



*Es importante que durante todo el método se trabaje bajo condiciones asépticas.

Esquema 23. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios por el método en placa.

3.4.7.2 Determinación e identificación de microorganismos objetables

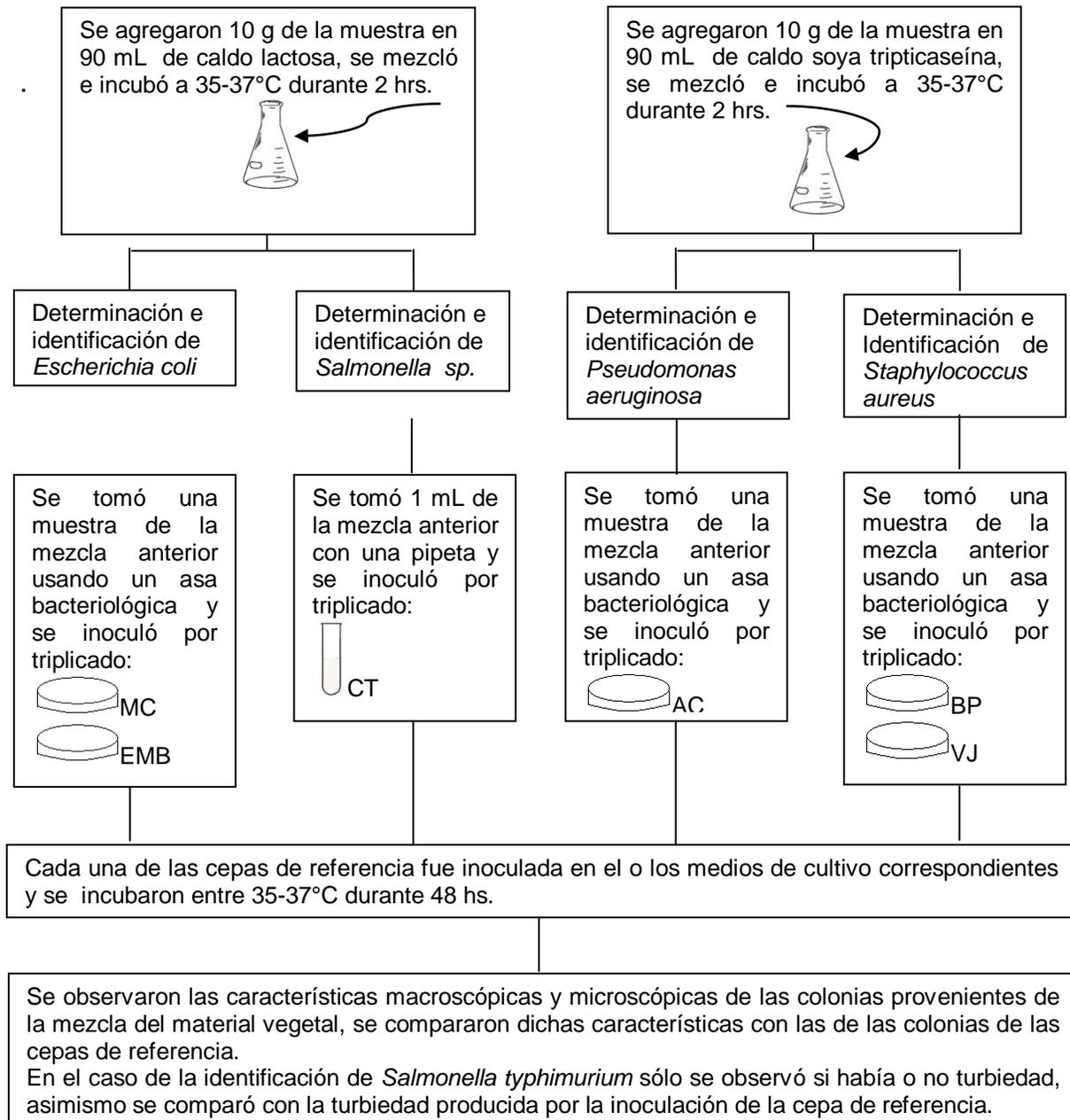
En cuanto a la contaminación microbiana, la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2008) y la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (2001), consideran que son cuatro los microorganismos patógenos que se deben investigar: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.* y *Escherichia coli* (denominados microorganismos objetables). En la Tabla 8 se mencionan las cepas de referencia empleadas.

Tabla 8. Cepas de Referencia

Microorganismo	Clasificación ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922



En el Esquema 24 se describe el proceso realizado para la determinación e identificación de microorganismos patógenos.



*Durante todo el proceso se trabajó en condiciones asépticas.

*Es importante comparar el crecimiento de las cepas de referencia con el reportado en cada medio de cultivo, para ello se puede consultar el Anexo IV.

Esquema 24. Determinación e identificación de microorganismos patógenos.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Modificaciones hechas al tratamiento previo a las técnicas histológicas e histoquímicas

Las consideraciones mencionadas a continuación son válidas tanto para *Verbena carolina* como para *Heliopsis longipes*. A pesar de haberse estudiado dos especies diferentes, el tratamiento previo al corte que se le dio al tallo de *Verbena carolina* fue semejante al de la raíz de *Heliopsis longipes*, es por eso que en este mismo apartado se discute el tratamiento para ambas especies.

Una adecuada identificación microscópica depende de gran medida de obtener una sección que permita observar las características del material vegetal de estudio, así como realizar tinciones que permitan evidenciar sus componentes estructurales y las posibles sustancias del almacenamiento. El éxito de una sección en orden de micras depende de los pasos previos a ésta; es por eso que a continuación se discute el tratamiento previo a las técnicas histológicas e histoquímicas.

Para asegurar que al realizar los cortes de las muestras no se presentaran desgarres del tejido, fue necesario ablandarlas. La técnica empleada para la raíz y el tallo fue diferente a la usada en la hoja, debido a que la estructura de las primeras dos es más rígida y necesitaron un tratamiento más agresivo que la tercera. En primera instancia las tres estructuras tuvieron el mismo método de ablandamiento (agua y detergente), pero se observó que al momento de realizar el corte del tallo y la raíz las secciones cortadas no se obtenían integras y el tejido se desgarraba fácilmente, mientras que dicho método fue efectivo para los cortes de la hoja. El ablandamiento para tallo y raíz se realizó con etilendiamina, ya que éste reacciona con los componentes de la pared celular, la cual está formada por polímeros de carbohidratos. La reacción ocurre en los enlaces éster que unen cada unidad del polímero, de este modo la pared celular pierde su resistencia y se vuelve más laxa permitiendo así el corte.



Posterior al ablandamiento de las estructuras vegetales fue importante realizar la técnica de fijación ya que ésta tuvo como objetivo preservar selectivamente la organización morfológica y el contenido químico para su posterior observación microscópica.

Para las tres estructuras vegetales estudiadas es importante considerar que si bien el éxito de una sección histológica depende de cada uno de los pasos previos a éste; se puede decir que una correcta deshidratación e infiltración fue un paso clave que nos aseguró el obtener secciones lo suficientemente rígidas a pesar de ser muy delgadas, en el orden de micras. La deshidratación se realizó gradualmente para así no dañar los tejidos e irlos preparando para la inclusión con parafina.

Previo a discutir los resultados de las pruebas histoquímicas para las dos especies vegetales de estudio, es importante considerar que lo adecuado es realizar estas determinaciones en material fresco y así evitar la alteración de las sustancias ergásticas almacenadas o parte estructural de las células vegetales por los tratamientos previos; sin embargo, no siempre es posible obtener secciones lo suficientemente delgadas con el material fresco que permitan su observación en el microscopio, así como la adecuada tinción por los reactivos para histoquímica.

Otros factores a considerar en la determinación de contenidos celulares, son las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrolló la especie vegetal. Es por eso que los resultados que se muestran en cuanto a este aspecto no pueden tomarse como una generalidad. Para poder caracterizar a ambas especies sería necesario analizar diversas poblaciones de las diferentes zonas en las que crecen ambas especies, debido a que algunas sustancias ergásticas cambian según los ciclos fisiológicos de las plantas, por lo que sería conveniente analizar lotes de diferentes fechas de colecta.



Pruebas de identidad y pureza para *Verbena carolina* L.

4.1 Ensayos de identidad para *Verbena carolina*.

4.1.1 Descripción microscópica de la anatomía y contenidos celulares de hoja y tallo de *Verbena carolina*.

La descripción se integró considerando a los principales tejidos dérmico, fundamental y vascular; sin embargo, se describe por regiones siguiendo un orden de afuera hacia adentro. De igual modo, en cada tejido descrito se señalan los contenidos celulares encontrados. La descripción se acompaña de fotomicrografías.

4.1.1.1 Hoja

* Lámina

A. Tejido dérmico

- Epidermis

Epidermis adaxial (superior) con cutícula ligeramente engrosada, monoestratificada, con células oblongas tangencialmente alargadas y de paredes delgadas de tamaños relativamente más grandes que las abaxiales. Epidermis abaxial (inferior) con cutícula menos engrosada que la adaxial, monoestratificada con células isodiamétricas pequeñas, de paredes delgadas. Estomas sólo en la epidermis abaxial al nivel del resto de células epidérmicas (Fig. 6 A). Tricomas en ambas epidermis (Fig. 6 A, B); de acuerdo a Metcalfe (Metcalfe y Chalk, 1979), los tricomas son una estructura de diagnóstico para la familia Verbenaceae, por lo que sería útil definir la naturaleza y morfología de estas estructuras y así poder utilizarlas como un elemento de control de calidad.

A partir de la reacción positiva con rojo de rutenio se puso en evidencia de pectinas en ambas epidermis y en tejido fundamental (Fig. 6 C).

B. Tejido fundamental

- Mesófilo

Formado por parénquima en empalizada y parénquima esponjoso. El parénquima en empalizada ubicado hacia el extremo adaxial, con dos estratos celulares,



células tubulares con abundante cloroplastos y otros contenidos celulares; en algunas zonas este tejido es compacto y en otras se muestra laxo (Fig. 6 B, D), con abundante espacios aéreos. El parénquima esponjoso, ubicado hacia el extremo abaxial, con células irregulares y alto contenido celular, con abundantes espacios intercelulares entre ellas (Fig. 6 D).

En el mesófilo en empalizada se determinó la presencia de amiloplastos, mientras que en el mesófilo esponjoso se observó una presencia significativa de un compuesto amarillento que no fue determinado (Fig. 6 E, F). También se determinó la presencia de pectatos de calcio ampliamente distribuidos en el mesófilo.

C. Tejido vascular

Venas secundarias con xilema y floema organizado como un paquete, donde el floema se ubica hacia el extremo adaxial y el xilema hacia el extremo abaxial (Fig. 7 A). Floema con elementos cribosos y células acompañantes. Xilema con traqueidas y elementos de vasos organizados en hileras, y células parenquimáticas. Los haces más pequeños envueltos por una vaina parenquimática, con células isodiamétricas y de paredes delgadas. A través de la lámina se observan venas transversales menores. La reacción con rojo de rutenio fue positiva denotando la presencia de pectinas (Fig. 7 A).

*** Vena primaria o vena media**

A. Tejido dérmico

Epidermis adaxial con cutícula engrosada, monoestratificada, células isodiamétricas o rectangulares y tangencialmente extendidas de paredes delgadas. Epidermis abaxial con cutícula engrosada y ligeramente suberizada, con células relativamente pequeñas, isodiamétricas, de paredes delgadas (Fig. 7 A).

La suberización fue evidente mediante la reacción con rojo de aceite "O".



B. Tejido fundamental

Córtex con hasta cinco estratos de células oblongas e isodiamétricas, de paredes delgadas; en el extremo adaxial las células del estrato continuo a la epidermis con paredes engrosadas. Hacia el extremo abaxial las células son más grandes y de contornos irregulares, los estratos externos con células de paredes engrosadas y ligeramente suberizadas (Fig. 7 B).

C. Tejido vascular

Organizado como media luna (Fig. 7 B). Floema ubicado hacia el extremo adaxial, con células cribosas y acompañantes (Fig. 7 C). Xilema ubicado hacia el extremo abaxial, formado por traqueidas y elementos de vaso organizados en hileras paralelas (Fig. 7 D) , parénquima ubicado hacia el extremo abaxial, éste último con abundantes contenidos celulares no identificados.

Si bien en las secciones obtenidas no se determinó la presencia de taninos condensados ni catequinas, se decidió realizar esta determinación en material vegetal molido sin previo tratamiento y se pudo observar una reacción positiva (Fig. 8). Lo cual sugiere que en caso de querer determinar la presencia y ubicación de estas sustancias debe hacerse en material vegetal fresco, sin tratamiento previo.

4.1.1.2 Tallo

A. Tejido dérmico

- Peridermis

La peridermis es incipiente; formada por uno a tres estrato de células rectangulares y tangencialmente extendidas, excepto al nivel de las lenticelas, dónde las células se observan cuadradas; en ambos casos y principalmente en las del estrato exterior, las paredes tangenciales externas e internas se observan engrosadas como inicio del proceso de suberización (Fig. 9 A). La reacción al rojo de aceite "O" fue positiva e intensa como resultado de la presencia de cutina y suberina (Fig. 9 B).



B. Tejido fundamental

- **Córtex**

El córtex está formado de tres a ocho estratos celulares, con células generalmente oblongas, en las regiones a nivel de las lenticelas se observa colequima de tipo angular (Fig. 9 A), las células del estrato continuo al tejido vascular son de tamaños considerablemente mayor respecto al resto de las células del córtex (Fig. 9 C). A partir de la reacción con lugol, en los primero estratos celulares del córtex se observa abundante almidón (Fig. 9 D).

- **Médula**

La médula está formada por dos tipos de células; unas grandes e isodiamétricas aunque de contornos ligeramente ondulados y con paredes celulares delgadas ocupando la mayor parte de la médula, las células ubicadas hacia el centro de ésta son más grandes; entre éstas se observan algunas células pequeñas con formas desde cuadradas hasta triangulares, de paredes delgadas y sin aparente contenido celular. Dentro de las células más grandes se determinó la presencia de un cristal de origen proteico mediante la reacción con azul de naftol (Fig. 9 E).

C. Tejido Vascular

Floema compuesto por un paquete de fibras ubicadas en contacto con el cortéx, elementos cribosos y células acompañantes (Fig. 9 C). Xilema compuesto por fibras, traqueidas, vasos y células parenquimáticas, los vasos ubicados hacia la zona medular, todos ellos organizados en hileras paralelas (Fig. 9 F, G).

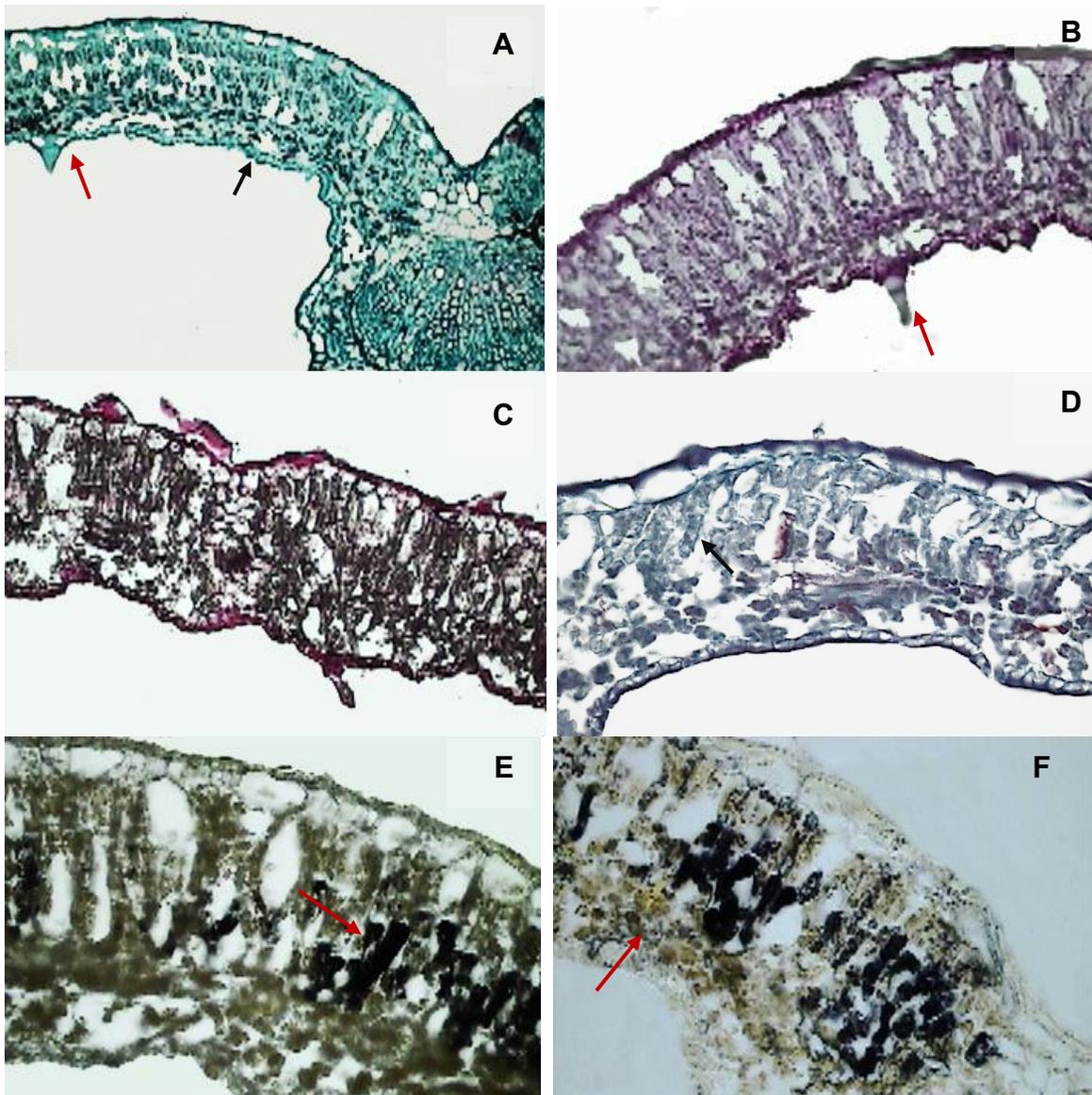


Figura 6. Secciones transversales de hoja de *Verbena carolina*.

A) Epidermis adaxial con cutícula engrosada y monoestratificada, epidermis abaxial con cutícula menos engrosada que la adaxial, tricoma (flecha roja) y estoma (flecha negra), X200. B) Lámina con mesófilo en empalizada hacia el extremo adaxial o superior y esponjoso hacia el extremo abaxial o inferior, tricoma (flecha roja), X400. C) Reacción positiva al rojo de rutenio, X200 D) Lámina con células tubulares en el parénquima en empalizada (flecha negra), X400. E) Lámina con amiloplastos en el mesófilo en empalizada (flecha roja), X400. F) Contenido celular abundante no identificado de color amarillento (flecha roja) en el mesófilo esponjoso, X400.

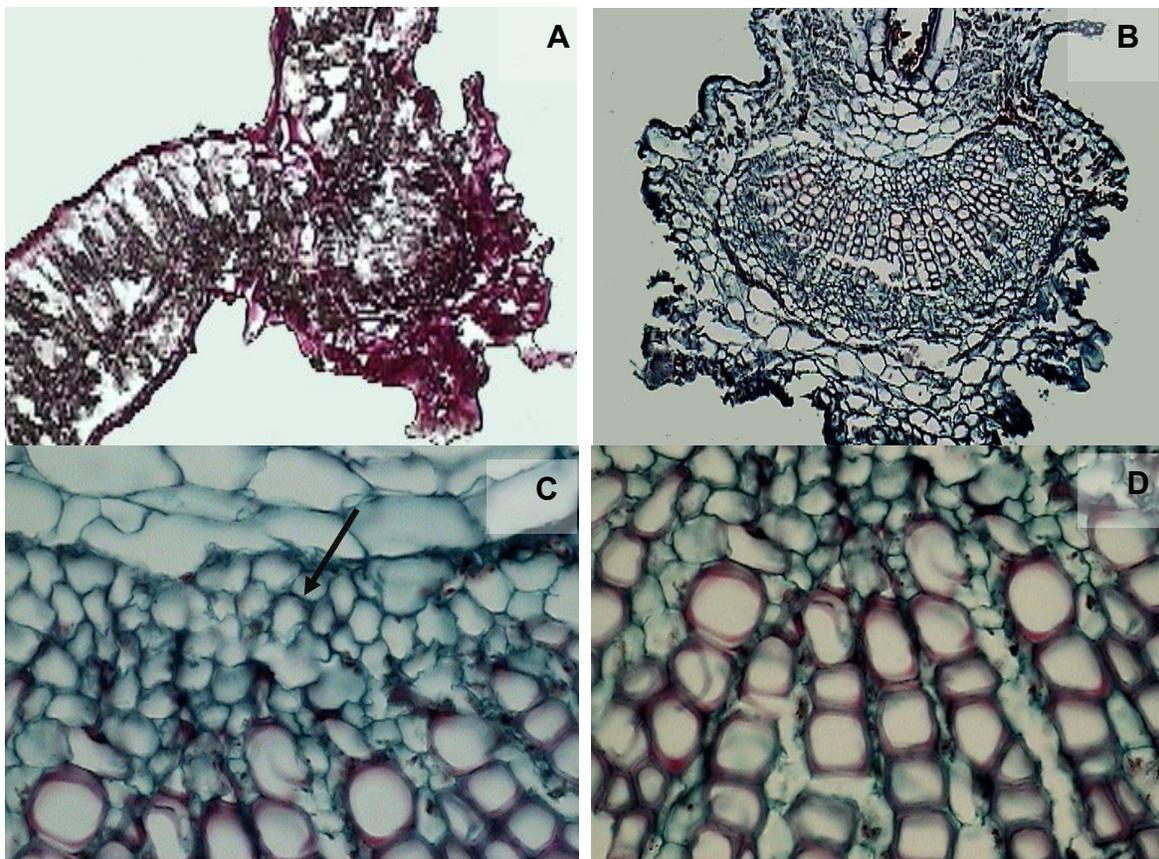


Figura 7. Secciones transversales de venas de *Verbena carolina*. A) Vena secundaria, epidermis con cutícula engrosada, córtex y tejido vascular organizado como media luna, reacción positiva con rojo de rutenio X200. B) Vena primaria, tejido vascular organizado como media luna. Epidermis abaxial parcialmente suberizada, X200. C) Floema con células cribosas y células acompañantes (flecha negra) , X1000. D) Xilema con traqueidas y elementos de vaso organizados en hileras, X1000.



Figura 8. Material vegetal molido de *Verbena carolina*. Reacción postiva con vainillina para evidenciar la presencia de taninos condensados (color marrón), X100.

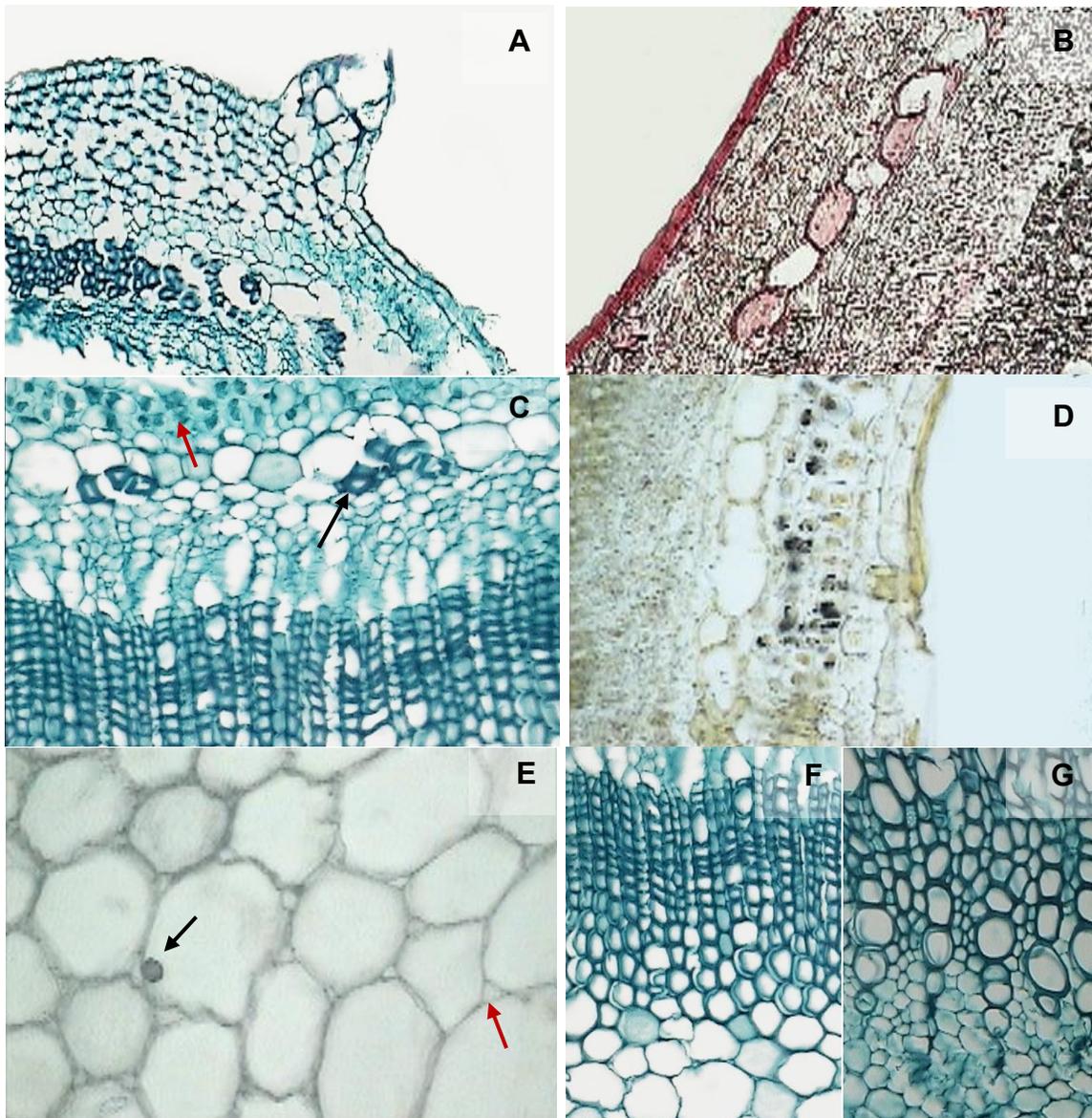


Figura 9. Secciones transversales de tallo de *Verbena carolina*.
A) Peridermis con lenticela, X200. B) Reacción positiva al rojo de aceite “O”, X400. C) Córtex y tejido vascular. Almidón en células corticales (flecha roja). Floema con fibras (flecha negra), células cribosas y células acompañantes (región central de la imagen), X400. D) Reacción positiva al lugol, X400. E) Médula con células isodiamétricas con contornos ligeramente ondulados y células triangulares a cuadradas entre ellas (flecha roja); cristal de origen proteínico (flecha negra), X400. F) Xilema con traqueidas, fibras y elementos de vaso, X400. G) Xilema con elementos de vaso y parénquima, X400.



4.1.2 Ensayo de identidad en cromatografía capa fina de *Verbena carolina*.

4.1.2.1 Aislamiento y elucidación estructural del verbascósido

La fracción F70-76 obtenida en un trabajo previo a éste (Morales, 2009) fue de interés ya que se observó la presencia de un compuesto mayoritario con un comportamiento cromatográfico diferente al de los compuestos aislados e identificados en ese mismo trabajo. Este compuesto fue separado de la fracción mediante cromatografía en columna abierta como se muestra en el Esquema 14 parte b. La fracción FA conteniendo al compuesto mayoritario y visible al UV, fue purificada mediante CCF preparativa y el compuesto aislado (I) mostró pureza cromatográfica ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 80:20, R_f 0.37) y absorción en el UV. Fue identificado como verbascósido (I) (Fig. 1w) de acuerdo a sus características espectroscópicas y por la comparación de éstas con lo reportado en la literatura (Andary, 1982). La elucidación estructural del verbascósido fue como sigue:

Las características cromatográficas en capa fina mostraron que se trataba de un compuesto polar. El espectro IR (Espectro 1) mostró bandas muy intensas en la zona de 3328 y en 1033 cm^{-1} correspondientes a la presencia abundante de grupos hidróxilo. Asimismo, se localizó una banda en 1698 para la vibración de un grupo carbonilo α,β -insaturado. En 1628 y 811 cm^{-1} se apreciaron bandas para compuesto aromático trisustituído no vecinal. En 2927 cm^{-1} se observó una banda que se asignó a carbonos-hidrógeno de tipo alifático.

El espectro de RMN- ^1H (Espectro 2), también mostró señales para hidrógenos alifáticos en 2.79 ppm, como un triplete dobleteado que integró para dos hidrógenos y correlacionó en el espectro COSY (Espectro 3) con dos señales múltiples, en 3.73 y 3.91 ppm, cada una integró para un hidrógeno y ambas correlacionaron entre sí en el espectro COSY. Estas señales se asignaron a un par de grupos metilenos vecinos entre sí. La señal en 2.79 mostró además correlación en el espectro HMBC (Espectro 4) con las señales en la zona de aromáticos (121.303 y 117.16), por lo que la señal de metileno se consideró vecina a un anillo bencénico. Las señales en 3.73 y 3.91 ppm, ya mencionadas, de



acuerdo a su desplazamiento químico, se asignaron a un metileno vecino a un átomo de oxígeno. El resto de señales bencénicas del anillo vecino al metileno se asignaron a un sistema ABX (benceno trisustituído) con dos sustituyentes hidroxilos (144.71 y 146.16) cuyo hidrógeno en posición 2' se asignó a la señal en 6.70, que como doblete con constante de acoplamiento de 2 Hz (H-X), se encuentra en posición meta a otro doblete de dobles en 6.57 ($J = 8$ y 2 Hz) (H-B), ubicado en la posición 6', siendo éste, vecino de otro hidrógeno ubicado en la posición 5', como doblete con $J = 8$ Hz (H-A). Estas señales presentaron correlaciones entre sí en el espectro COSY. Las señales relatadas hasta este momento son parte de la molécula correspondiente al residuo de un compuesto aromático de tipo C₆-C-₂ (alcohol 3,4-dihidroxifenilético).

El espectro de RMN-¹H por otra parte, presentó dos señales en 7.59 y 6.27 ppm, que correlacionaron entre sí (COSY) como dobletes con constante de acoplamiento de 16 Hz y se asignaron a un par de hidrógenos vinílicos con isomería *trans*. De éstas, la señal a campo más bajo (7.59 ppm), presentó correlaciones en el espectro HMBC con las señales en 115.29 y 123.24 ppm, correspondientes a carbonos bencénicos cuyas señales en RMN-¹H correspondieron a los hidrógenos BX de un sistema aromático trisustituído (7.058, $J = 2$ Hz y 6.957, $J = 8.2$ Hz). Esta misma señal (7.59 ppm) correlacionó con un grupo carbonilo (168.35 ppm) visualizado en el espectro IR. El hidrógeno faltante (H-A) en el sistema ABX se localizó en 116.36 ppm (δ_{H} 6.782) acoplado con H-B (constante de acoplamiento de 8.4Hz). De acuerdo a los desplazamientos químicos en RMN-¹³C para los carbonos aromáticos que correlacionaron en el experimento HMBC con los hidrógenos anteriormente mencionados, el anillo bencénico debe tener dos sustituyentes hidroxilados en 146.87 y 149.84 ppm y otra sustitución con el hidrógeno vinílico beta (δ_{C} 148.06). El hidrógeno vinílico alfa se localizó en δ_{H} 6.28 (δ_{C} 114.744).



De acuerdo al espectro IR, la molécula contiene un grupo éster, que debe estar localizado en este residuo descrito, de un compuesto C6-C-3, derivado del ácido cafeico.

La molécula adicionalmente contiene una parte glicosilada, determinada por una serie de señales en RMN-¹H, entre 3.30 y 5.19 ppm determinadas como hidrógenos unidos a carbonos base de oxígeno, confirmados por las diez señales en RMN-¹³C (Espectro 6) (62.39 a 104.25 ppm), de hecho, se trató de un disacárido, debido a que se encontraron dos señales para carbonos anoméricos en RMN-¹³C (104.26 y 103.05 ppm), manifestados como un par de dobletes en el espectro de RMN-¹H en 4.38 ($J = 8$) y 5.190 ($J = 1.6$); la unión interglicosídica de estos azúcares y con las dos fracciones restantes de la molécula, descritas en párrafos anteriores, se pone de manifiesto por las correlaciones encontradas en los espectros COSY (Espectro 3), HSQC (Espectro 5) y HMBC (Espectro 4). Los monosacáridos correspondieron a la glucosa y ramnosa; el desoximetileno en la posición 6 de éste último azúcar, se localizó en $\delta_H 1.09$ ($\delta_C 18.49$), como un doblete con constante de acoplamiento de 6Hz. El análisis e integración de los datos espectroscópicos descritos permitió la elucidación estructural para esta molécula como el verbascósido (I), el cual es un disacárido que contiene una fracción de ácido cafeico y una molécula de alcohol dimetoxi-fenil-etílico (Andary, 1982).

La Tabla 9 resume los desplazamientos químicos de ¹H y de ¹³C para el verbascósido (I).



Tabla 9. Desplazamientos químicos de las señales de RMN ^{13}C y de ^1H (ppm) del verbascósido en MeOD (patrones de desdoblamiento y valores J (Hz) se encuentran dados entre paréntesis)

Posición	δ C	δ H	Posición	δ C	δ H
1	127.70		1'	131.53	
2	115.29	7.06 (d,2)	2'	117.16	6.70 (d,2)
3	146.88		3'	146.16	
4	149.85		4'	144.71	
5	116.37	6.78 (d,8.4)	5'	116.59	6.68 (d,8)
6	123.24	6.96 (dd,8.2 y 2)	6'	121.30	6.57 (dd,8 y 2)
7	148.06	7.60 (d,16)	7'	36.61	2.79 (td)
8	114.74	6.28 (d,16)	8'	72.30	3.74 (m)
9	168.35				3.92 (m)
1a	104.26	4.38 (d,8)	1'a	103.05	5.19 (d,1.6)
2a	76.26	3.26 (dd, 8 y 9.2)	2'a	72.39	3.74
3a	81.68	3.74	3'a	72.11	3.56
4a	70.45	4.91	4'a	73.85	3.29
5a	76.08	\approx 3.30	5'a	70.65	\approx 3.4(m)
6a	62.40	3.39(dd,8) 3.30(m)	6'a	18.49	1.09 (d,6)

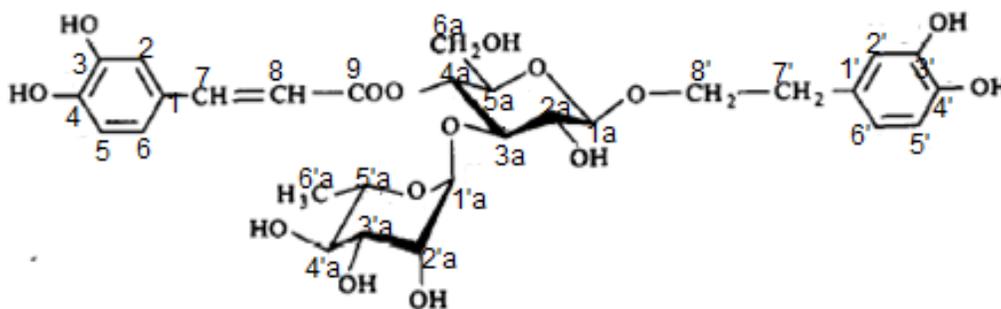
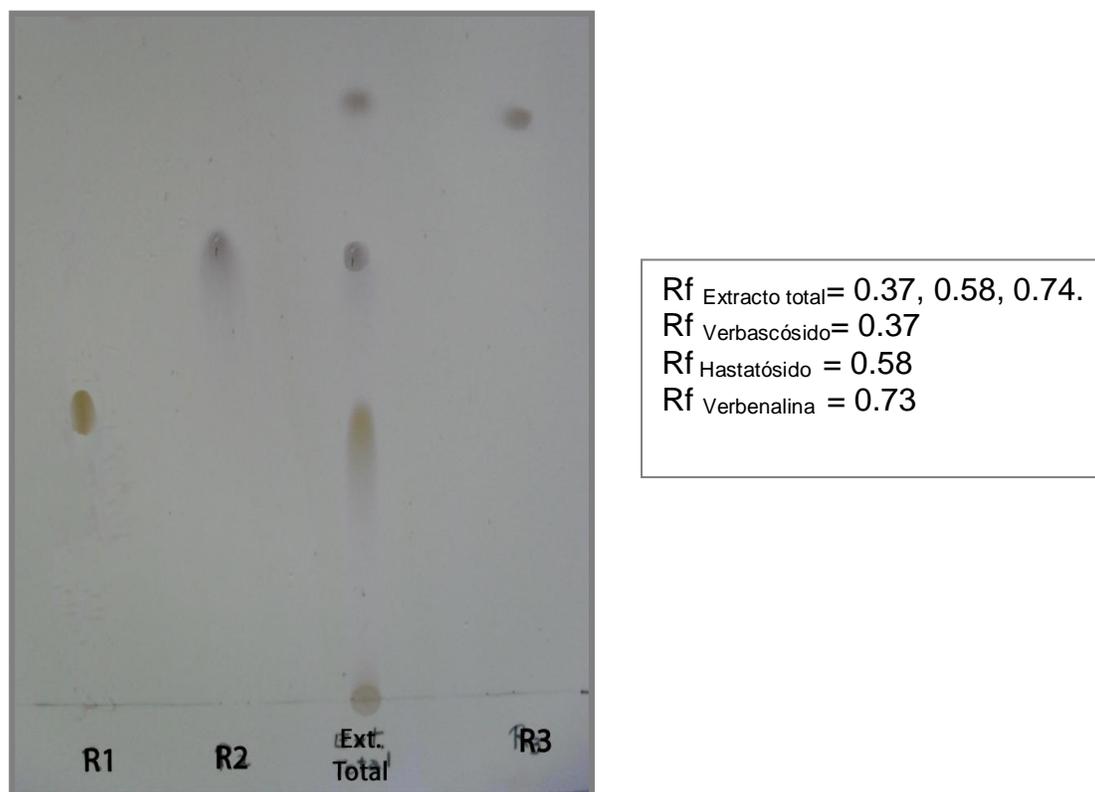


Figura 10. Elucidación estructural del verbascósido (I)



4.1.2.2 Identificación por cromatografía en capa fina de tres compuestos mayoritarios del extracto clorofórmico/metanólico de *V. carolina* L. como prueba de identidad.

En la Figura 11 se muestra la placa cromatográfica en placa fina donde se aprecia la presencia de tres compuestos mayoritarios (verbascósido (1w), hastatósido (1l) y verbenalina (1m)) en el extracto clorofórmico/metanólico. Al compararse el Rf de los estándares obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio con el Rf de las manchas presentes en el extracto, se puede decir que son prácticamente iguales. Teniendo en cuenta que los compuestos empleados como estándares son los principales responsables del efecto biológico asociado a *V. carolina*, se pueden sugerir como estándares para emplearse en las pruebas de composición para el control de calidad mediante el desarrollo de un método de cuantificación de estos por HPLC.



R1= Verbascósido, R2= Hastatósido, R3= Verbenalina

Figura 11. Cromatografía en capa fina del extracto clorofórmico/metanólico comparándolo con los estándares de verbascósido, hastatósido y verbenalina en una fase móvil $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (80:20).



4.2 Ensayos de pureza para *Verbena carolina*.

4.2.1 Determinación de materia extraña

Al realizar la determinación de elementos extraños, la muestra no presentó: enmohecimiento, microorganismos, insectos, malos olores, decoloración, ni signos evidentes de deterioro, por lo que se procedió a la realización de la prueba de acuerdo al procedimiento descrito en materiales y métodos.

En 50g de las partes aéreas de *V. carolina*, no se encontró ningún elemento considerado como extraño, obteniendo así 0% de materia extraña, lo cual evidentemente está por debajo del límite especificado (<2.0%, FHEUM, 2001) por lo que se concluyó que esta determinación cumple con lo establecido.

Es importante destacar que en general es difícil obtener las materias primas vegetales puras ya que siempre vienen acompañadas de impurezas de diferentes fuentes de contaminación, generalmente obtenidas de su hábitat en donde los elementos extraños están constituidos por:

- Partes extrañas: todo elemento de la planta original pero no constituye la droga (hojas, tallos, flores, etc.).
- Materias extrañas: todo elemento ajeno a la planta de procedencia vegetal o mineral (tierra, insectos, restos orgánicos, etc.).

Nuestro resultado en esta prueba puede ser en gran medida porque la muestra no estuvo en contacto directo con el suelo y otro factor importante fue el almacenamiento, ya que se mantuvo en un lugar cerrado y alejado de fuentes de humedad o luz solar.

4.2.2 Metales pesados

En la Tabla 10 se muestran las cantidades encontradas de los elementos analizados, comparando estos valores con los límites recomendados por la OMS; se puede asegurar que no hay posibilidad de intoxicación por metales pesados al emplear este material vegetal para el consumo humano.



La causa principal de presencia de metales pesados en las plantas medicinales es por contaminación en el medio ambiente, en el caso de tratarse de preparados medicinales también pueden influir los procesos de manufactura.

Tabla 10. Determinación de metales pesados en las partes aéreas de *V. carolina*.

Metal determinado	Cantidad (mg/Kg)
Pb	0.49
Cd	0.02
Hg	0.13

Límites recomendados por la OMS (WHO,2007):

- Pb: 10 mg/Kg
- Cd: 0.3 mg/Kg
- Hg: 0.2 mg/Kg

4.2.3 Determinación de cenizas

La determinación de cenizas en *V. carolina* se realizó mediante dos métodos: cenizas totales y cenizas insolubles en ácido.

La determinación de cenizas totales se basa en la relación que existe entre el peso inicial de una muestra y el residuo de las sales inorgánicas finalmente obtenidas después de la ignición de las muestras. Las cenizas inorgánicas están formadas por carbonatos, fosfatos, silicatos y sílice, el contenido de estos elementos varía entre un límite amplio, el valor que se obtenga de esta determinación dependerá del suelo donde creció la planta. Por lo anterior, se tienen que establecer los límites de cenizas para cada especie vegetal considerando diferentes lotes de diferentes lugares de crecimiento.

En la Tabla 11 se pueden observar los resultados obtenidos de esta determinación.

**Tabla 11. Cenizas totales de las partes aéreas de *V. carolina*.**

Peso de la muestra (g)	Peso de cenizas totales (g)	% de cenizas
2.005	0.123	6.135
2.007	0.125	6.228
2.011	0.136	6.763
2.007	0.135	6.726
	Promedio	6.463
	DE	0.328

Al realizar la determinación de cenizas insolubles en ácido se cuantifica la cantidad de sílice, esta determinación se basa en una hidrólisis de algunos componentes orgánicos que posteriormente se volatilizan en la ignición. Del mismo modo que en la determinación de cenizas totales, no existe un límite en esta prueba y para que se pudiera establecer sería necesario considerar diferentes factores en los que se incluyen tiempos de recolección y tipo de tierra. En la Tabla 12 se muestran los resultados de esta determinación.

Tabla 12. Cenizas insolubles en ácido de las partes aéreas de *V. carolina*.

Peso de la muestra (g)	Peso de cenizas totales (g)	% de cenizas
2.005	0.027	1.347
2.007	0.023	1.146
2.011	0.029	1.442
2.007	0.026	1.295
	Promedio	1.308
	DE	0.124



4.2.4 Material extraíble

Esta determinación se llevó a cabo utilizando por separado diferentes disolventes tales como hexano, etanol y una mezcla con etanol-agua 7:3 (Tabla 13), los cuales presentan diferente polaridad y por lo tanto, diferentes capacidades de solvatación de los metabolitos presentes en el material vegetal; esto nos da un rango amplio para obtener todos o casi todos los metabolitos presentes en las partes aéreas de *V. carolina*.

Tabla 13. Peso y porcentajes de los extractos hexánicos, etanólicos y de etanol-agua 7:3 de *V. carolina*.

Peso de la muestra (g)	Peso (g) Ext. Hex.	% Ext. Hex.	Peso (g) Ext. EtOH	% Ext. EtOH	Peso (g) Ext. EtOH-H ₂ O (7:3)	% Ext. EtOH-H ₂ O (7:3)
4.007	0.088	2.196				
4.002	0.072	1.800				
4.000	0.072	1.800				
4.010	0.092	2.294				
4.004			0.300	7.493		
4.005			0.324	8.090		
4.000			0.288	7.200		
4.002			0.282	7.047		
4.004					0.668	16.683
4.002					0.668	16.691
4.002					0.644	16.092
4.006					0.640	16.000
	Promedio	2.023	Promedio	7.458	Promedio	16.367
	DE	0.260	DE	0.460	DE	0.372

Como podemos observar en los resultados, la mezcla de etanol-agua extrajo un mayor número de componentes de las partes aéreas de *Verbena carolina* con



respecto a los otros dos disolventes empleados; en el caso del hexano, al ser un disolvente con menor polaridad, extrajo una menor cantidad, este hecho se debe a que el material vegetal empleado presenta un mayor número de metabolitos de naturaleza polar. En este caso también se tienen que establecer los límites para esta especie vegetal considerando diferentes colectas.

4.2.5 Índice de hinchamiento

Muchas de las plantas medicinales tienen su especificidad terapéutica o su uso terapéutico debido a sus propiedades de hinchamiento, especialmente gomas o aquellas que contienen una cantidad importante de mucílago, pectina o hemicelulosa.

El índice de hinchamiento es el volumen en mililitros ocupados por un gramo de material vegetal, incluyendo cualquier mucílago en la probeta, después de ser sometida a un proceso de hinchamiento con agua durante cuatro horas. Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Índice de hinchamiento de las partes aéreas de *V. carolina* L.

Peso de la muestra(g)	mL ocupados por la muestra	mL ocupados del material vegetal hinchado	Diferencia de volúmenes (mL)	Índice de hinchamiento
1.000	4	8	4	100 %
1.000	4	7.5	3.5	87.5 %
1.000	4	8	4	100%
1.000	4	8	4	100%
Promedio				96.88
DE				6.25

Si bien en la literatura no se encuentra reportado que los efectos biológicos relacionados con *Verbena carolina* tengan relación con sus propiedades de hinchamiento, el valor obtenido en esta determinación es considerablemente alto.



4.2.6 Determinación de la pérdida de agua y material volátil

Esta determinación fue llevada a cabo en material fresco sin previo proceso de secado, es así como en la Tabla 15 se muestra que el porcentaje de pérdida al secado es alto, lo cual tiene sentido al tratarse de material fresco. En esta determinación no hay límites especificados y solamente se encuentra referido como un método general en la FHEUM 2001.

Tabla 15. Pérdida al secado en por ciento de *V. carolina*

Peso de la muestra (g)	Peso de la muestra seca (g)	% de pérdida al secado
2.002	1.483	25.924
2.003	1.476	26.311
2.006	1.483	26.072
	Promedio	26.102
	DE	0.195

4.2.7 Determinación de límite microbiano, ausencia o presencia de microorganismos patógenos

Teniendo en cuenta que se trabajó con material vegetal crudo, es pertinente únicamente la identificación de hongos y de *Escherichia coli*, sin embargo se decidió realizar una determinación completa, considerando bacterias mesófilas aerobias y la identificación de otros microorganismos enteropatógenos. Esta determinación nos brindó la información para evaluar la calidad de *Verbena carolina* como materia prima.

En la preparación de las diluciones se empleó una solución de fosfatos con la finalidad de no alterar el número y clase de microorganismos.



4.2.7.1 Recuento de microorganismos mesófilos aerobios

En esta determinación se consideró el recuento de levaduras y hongos y además de microorganismos mesófilos aerobios, utilizando para este último caso, el método de placa y el método del NMP. En las Tablas 16 y 17 se muestran los resultados de dichas determinaciones.

Tabla 16. Recuento de bacterias mesófilas aerobias por el método de placa

Dilución	UFC/placa			Promedio UFC/placa	UFC/g
	10^{-1}	*	*	*	—
10^{-2}	*	*	*	—	—
10^{-3}	22	26	28	25.33	25 330
10^{-4}	2	3	2	2.33	23 300
				Promedio	24 315

*: Crecimiento incontable

Para obtener las unidades formadoras de colonia por gramo se realizó la siguiente operación:

$$\text{UFC/g} = \text{UFC/placa} * \text{factor de dilución}$$

$$\text{UFC/g} = 25.33 * 10^3 = 25\ 330$$

Tabla 17. Recuento de bacterias mesófilas aerobias por el método del NMP

Dilución	Crecimiento 48 horas después			Testigo
10^{-1}	+	+	+	-
10^{-2}	+	+	+	-
10^{-3}	+	+	+	-
			Resultado	NMP > 1100

+ : Tubo con crecimiento (turbidez)

-: Tubo sin crecimiento

*Para obtener el NMP fue necesario consultar el Anexo III



Teniendo en cuenta que el material vegetal no había sufrido ningún proceso de descontaminación previo, era de esperarse una alta cantidad de microorganismos mesófilos, en ambas determinaciones podemos comprobar esto. Considerando los resultados anteriores se puede recomendar que para la determinación de microorganismos mesófilos aerobios en material vegetal crudo sólo se realice la determinación por el método de placa, ya que éste nos brinda un resultado más exacto cuando hay una alta carga microbiana a comparación del método del NMP que sólo indica que es superior a un límite (en este caso > 1100 microorganismos/g).

Como fue mencionado anteriormente, no existe un límite establecido de microorganismos mesófilos aerobios en material vegetal crudo, pero a pesar de que el material de estudio no fue sometido a procesos de descontaminación, la cantidad experimentalmente encontrada en éste fue menor a los límites que se señala para material vegetal pretratado o que eventualmente sería usado en forma tópica (máximo 10^7 por gramo, FHEUM, 2001), o para el material vegetal que tiene uso interno (máximo 10^5 por gramo, FHEUM, 2001). Además, considerando que el uso tradicional de *V. carolina* es en forma de infusión ya sea para su administración oral o tópica, el contacto con el agua caliente disminuiría en gran medida esta carga microbiana.

Tabla 18. Recuento de hongos por el método de placa

Dilución	UFC/placa			Promedio UFC/placa	UFC/g
10^{-1}	*	*	*	—	—
10^{-2}	*	*	*	—	—
10^{-3}	19	19	20	19.33	19 330
10^{-4}	1	1	2	1.33	13 300
				Promedio	16 315

*: Crecimiento incontable



Por lo que respecta a la cantidad presente de levaduras y hongos en la muestra analizada, ésta fue menor al límite establecido para material vegetal crudo (máximo 10^5 por gramo) y a pesar de que el material empleado no fue sometido a procesos de descontaminación, la cantidad encontrada fue menor al límite que se señala para material vegetal pretratado o que sería usado en forma tópica (máximo 10^7 por gramo, FHEUM, 2001), sin embargo, sin un proceso previo de descontaminación, no podría emplearse para uso interno ya que la cantidad presente es superior al límite establecido en ese caso (máximo 10^3 por gramo, FHEUM, 2001) (Tabla 18).

4.2.7.2 Determinación e identificación de microorganismos patógenos (microorganismos objetables).

De acuerdo a la FHEUM (FHEUM, 2001) con respecto a microorganismos patógenos, sólo es necesaria la determinación de *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*, sin embargo se decidió también realizar la determinación de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* considerando las recomendaciones hechas en la FEUM para el análisis de materias primas.

Para la identificación de cada microorganismo se emplearon medios selectivos los cual favorecen su crecimiento, pero un paso importante previo a la inoculación de los medios selectivos fue colocar el material vegetal en un medio de enriquecimiento (caldo lactosa o caldo soya tripticaseína) que favoreciera el crecimiento de los microorganismos patógenos en caso de estar presentes.

La inoculación en los medios selectivos se realizó por triplicado, además se empleó un control positivo y un control negativo. Un control positivo se logró al inocular con una cepa de referencia una placa con medio selectivo, lo que garantizó la seguridad del crecimiento de las bacterias para lo que fueron diseñados; mientras que un control negativo fue incubar una de las placas con medio selectivo sin haber sido inoculado; mediante este control garantizamos la



esterilidad del medio. El uso tanto del control positivo como del negativo, nos permite confirmar que los resultados obtenidos son correctos, y por otra parte asegurar la calidad de los medios empleados.

Para la identificación de *E. coli* se emplearon dos medios selectivos: Agar Levine-eosina-azul de metileno y Agar Mac Conkey. Si bien se pudo sólo haber empleado alguno de los dos, se decidió realizar el experimento en ambos y comparar los resultados. En el agar Mac Conkey ninguna de las placas inoculadas con la muestra vegetal presentó crecimiento (Figura 12), mientras que en el Agar Levine-eosina-azul de metileno las tres placas presentaron crecimiento (Figura 13) pero éste no presentaba las características morfológicas del control positivo (descrito en el Anexo IV), por lo que el crecimiento no se asoció a la presencia de *E. coli*. Con los resultados anteriores se consideró que la muestra vegetal estaba libre de *E. coli*.

Para la identificación de *Salmonella sp.* se utilizó caldo tetracionato el cual es un medio selectivo y de enriquecimiento; en este medio se inhiben las demás enterobacterias presentes que pudieran limitar el crecimiento de *Salmonella sp.* En ninguno de los tres tubos inoculados con el material vegetal se presentó turbidez (Figura 14) por lo que el material vegetal se consideró libre de *Salmonella sp.*

Para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* se empleó el agar cetrimida; en ninguna de las tres placas inoculadas con el material vegetal se presentó crecimiento (Figura 15) por lo que la muestra vegetal se consideró libre de *P. aeruginosa*.

Para la identificación de *Staphylococcus aureus* se emplearon dos medios selectivos: Agar Vogel-Johnson (Figura 16) y Agar Baird-Parker (Figura 17), del mismo modo que en la identificación de *E. coli*, se pudo sólo haber empleado uno



de los dos medios selectivos pero se decidió comparar los resultados en ambos medios.

En ninguno de los dos medios se presentó crecimiento característico de *S. aureus* al inocular la muestra vegetal, por lo que el material vegetal se consideró libre de este microorganismo.

Como fue mencionado anteriormente, la muestra vegetal se encontró libre de microorganismos objetables (dichos resultados se resumen en la Tabla 19) lo cual habla de buenas prácticas de agricultura y cosecha (WHO, 2003).

Tabla 19. Identificación de microorganismos objetables.

Microorganismo	Medio	Placas 48 hrs.			Control positivo	Control negativo
<i>Escherichia coli</i>	EMB	-	-	-	+	-
	MC	-	-	-	+	-
<i>Salmonella sp.</i>	CT	-	-	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	AC	-	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	BP	-	-	-	+	-
	VJ	-	-	-	+	-

+ Con crecimiento

- Sin crecimiento

Mediante los resultados de la determinación de límite microbiano, ausencia o presencia de microorganismos patógenos, se puede garantizar que el material vegetal es seguro para ser usado como materia prima o para su consumo humano directo.

Es importante decir que es necesario analizar cada nuevo lote de material vegetal para así asegurar la ausencia de microorganismos patógenos y que cumpla con los límites establecidos por la FHEUM.

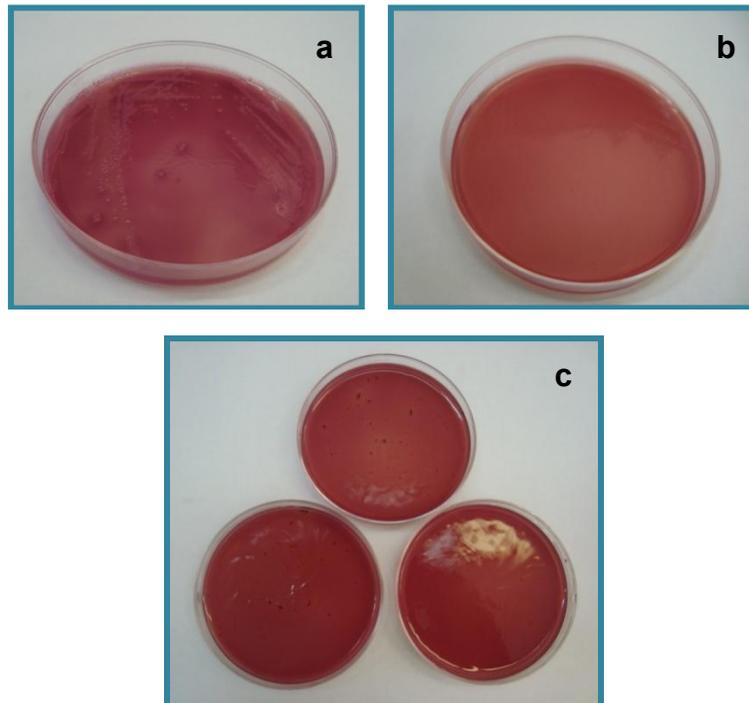


Figura 12. Determinación de *Escherichia coli* en agar Mac Conkey. a) Control positivo. b) Control negativo. c) Medio inoculado con el material vegetal.

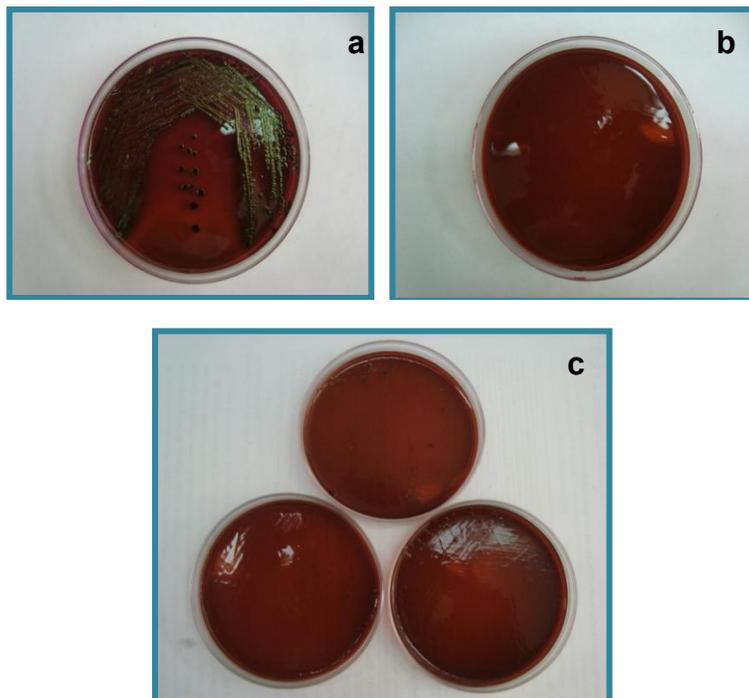




Figura 13. Determinación de *Escherichia coli* en agar Levine-eosina-azul de metileno. a) Control positivo. b) Control negativo. c) Medio inoculado con el material vegetal.

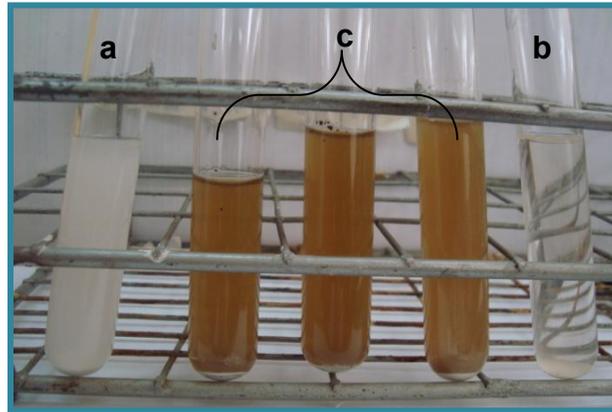


Figura 14. Determinación de *Salmonella sp* en caldo tetratonato. a) Control positivo. b) Control negativo. c) Medio inoculado con el material vegetal.

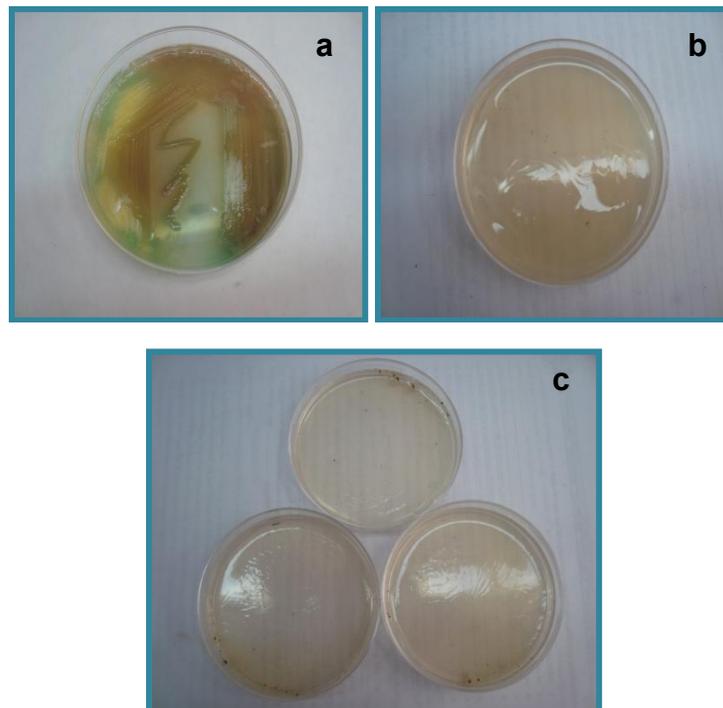


Figura 15. Determinación de *Pseudomonas aeruginosa* en agar Cetrimida. a) Control positivo. b) Control negativo. c) Medio inoculado con el material vegetal.

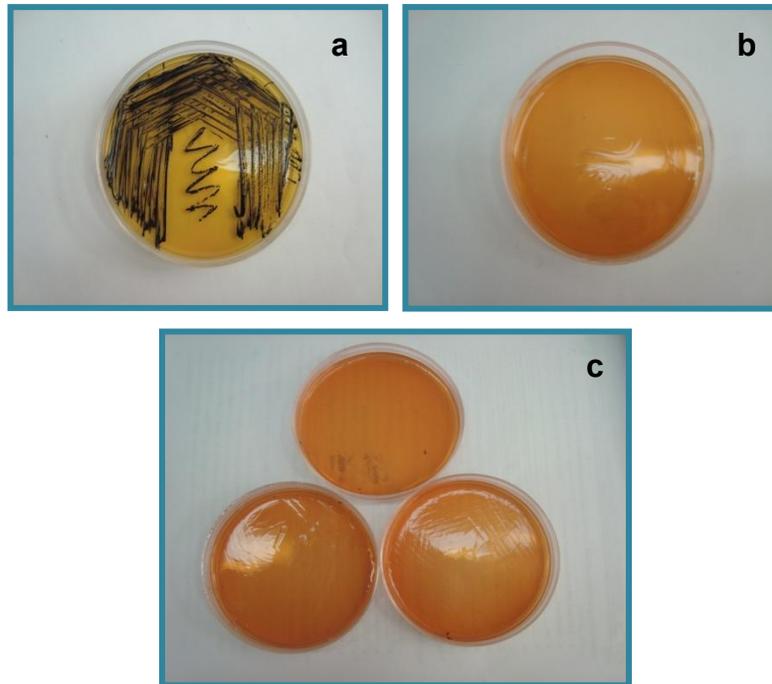


Figura 16. Determinación de *Staphylococcus aureus* en agar Vogel-Johnson. a) Control positivo. b) Control negativo. c) Medio inoculado con el material vegetal.

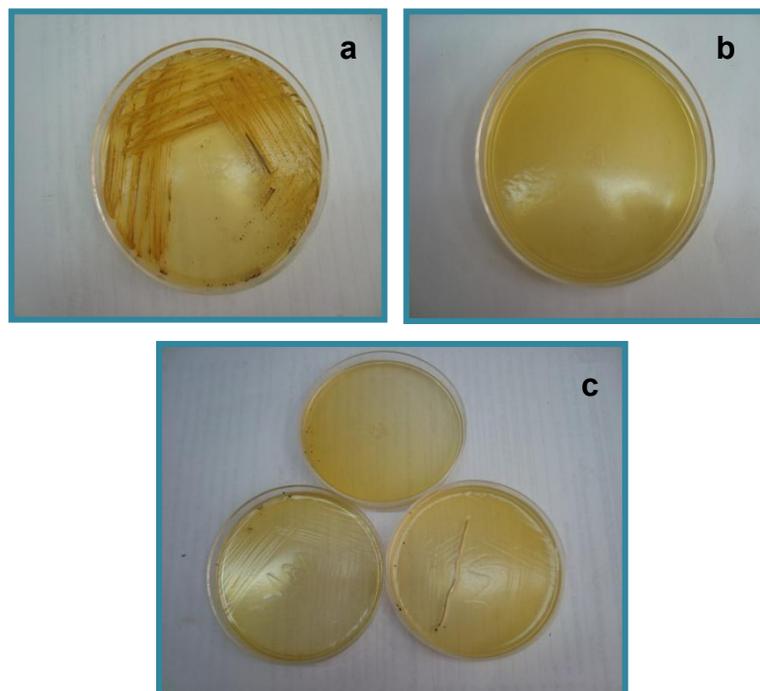


Figura 17. Determinación de *Staphylococcus aureus* en agar Baird-Parker. a) Control positivo. b) Control negativo. c) Medio inoculado con el material vegetal.



Pruebas de identidad y pureza para *Heliopsis longipes*

(A. Gray) S.F. Blake

4.3 Ensayos de identidad para *Heliopsis longipes*.

4.3.1 Descripción microscópica de la anatomía y contenidos celulares de raíz de *H. longipes*.

La descripción se integró considerando a los principales tejidos dérmico, fundamental y vascular; sin embargo, se describe por regiones siguiendo un orden de afuera hacia adentro. De igual modo, en cada tejido descrito se señalan los contenidos celulares encontrados. La descripción está acompañada con fotomicrofotografías.

A. Tejido dérmico

La rizodermis está compuesta de cinco a ocho estratos, excepto en los dos estratos internos, las células tienen paredes engrosadas, ambas células de forma cuadrada a rectangular y tangencialmente extendidas, organizadas en claras hileras radiales (Fig. 18 A). Mediante la reacción con rojo de aceite "O" se manifestó la presencia de suberina en las paredes de las células de la rizodermis (Fig. 18 B).

B. Tejido fundamental

La mayor parte de la raíz está ocupada por este tejido. Sus células son isodiamétricas, ligeramente laxas entre sí y con paredes celulares delgadas, hacia el exterior de este tejido se observa abundantes canales de naturaleza desconocida (Fig. 18 A, B), Se sugiere realizar secciones longitudinales para conocer más acerca de estos. En una célula del tejido fundamental de la corteza se observó un cúmulo de almidón, los cuales no se observaron de manera generalizada en el tejido (Fig. 18 C).

En el tejido fundamental de las secciones analizadas no fue posible observar la presencia de sustancias de almacenamiento, posiblemente debido al tratamiento de las muestras previo al corte, se sugiere realizar pruebas histoquímicas con material fresco.

C. Tejido vascular

Ubicado en el centro de la raíz. Floema hacia el exterior, organizado en seis paquetes, cada uno con un casquete de fibras, elementos cribosos y células



acompañantes (Fig. 18 D, E). Xilema inmerso en células parenquimáticas de paredes engrosadas; los elementos de vaso del metaxilema con un diámetro considerablemente mayor (Fig. 18 E, F)

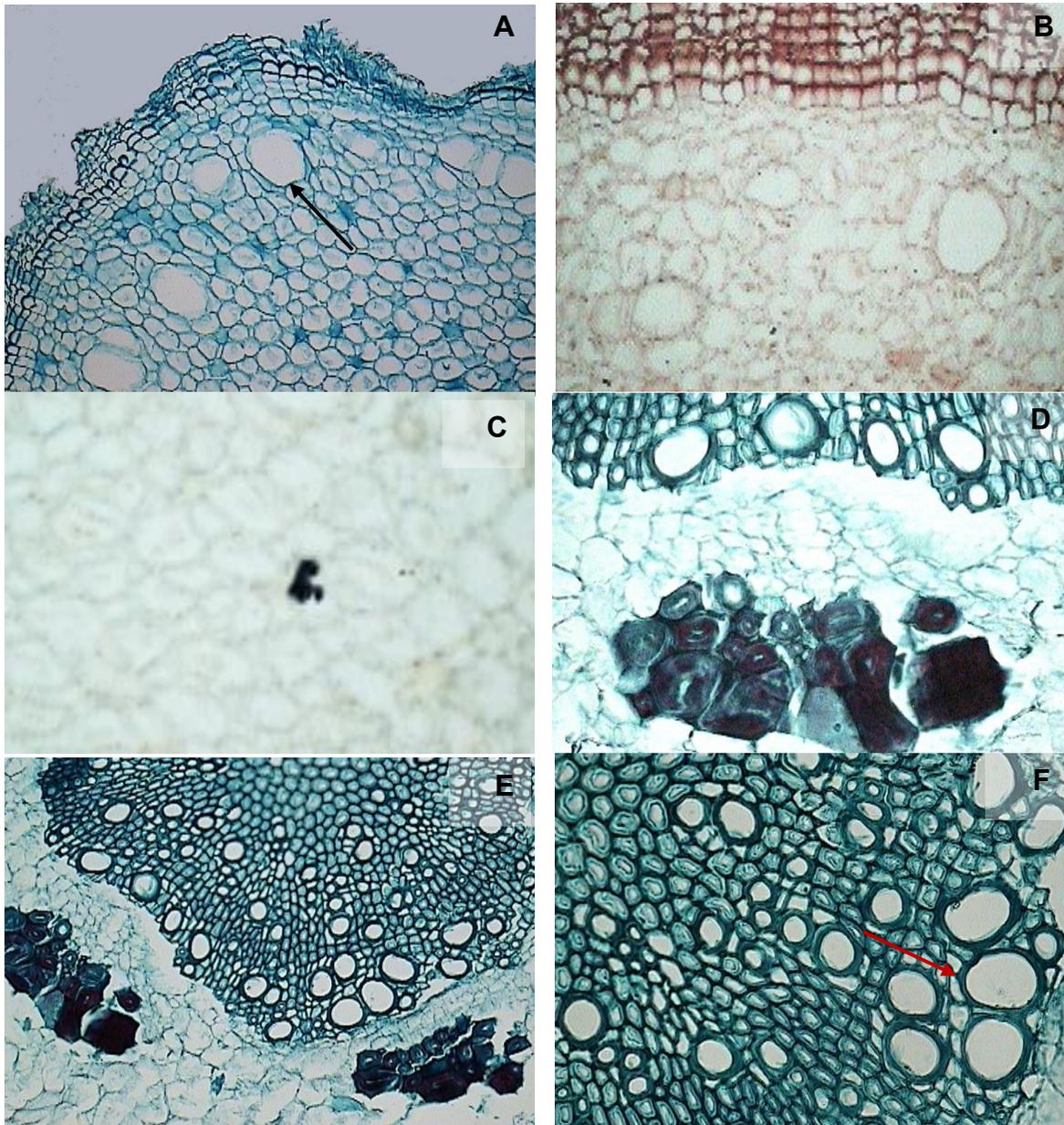


Figura 18. Secciones transversales de raíz de *Heliopsis longipes*.
A) Rizodermis suberizada, canales de naturaleza desconocida en tejido fundamental (flecha negra), X100. B) Reacción positiva al rojo de aceite "O", X200. C) Reacción positiva con lugol (cúmulo de almidón en tejido fundamental), X200. D) Floema con fibras, X400. E) Floema hacia el exterior. Xilema inmerso en células parenquimáticas de paredes engrosadas, X 200. F) Xilema con elementos de vaso del metaxilema de mayor tamaño (flecha roja) que los del protoxilema, X400.



4.3.2. Ensayo de identidad en cromatografía capa fina para *Heliopsis longipes*

4.3.2.1 Identificación por cromatografía en capa fina del componente mayoritario del extracto clorofórmico de *H. longipes* (A. Gray) S.F. Blake como prueba de identidad

En la Figura 19 se muestra la placa cromatográfica en capa fina donde se aprecia la presencia del compuesto mayoritario (afinina (Figura 4a)) en el extracto clorofórmico. Al compararse el Rf del estándar obtenido con anterioridad en nuestro laboratorio con el Rf de la mancha mayoritaria en el extracto, se puede decir que son prácticamente iguales.



R1= Afinina

Rf _{Extracto total}	= 0.51
Rf _{Afinina}	= 0.51

Figura 19. Cromatoplaça en capa fina del extracto clorofórmico comparándolo con el estándar de afinina en una fase móvil hexano/AcOEt (70:30).



4.4 Ensayos de pureza para *Heliopsis longipes*

4.4.1 Determinación de materia extraña

Al realizar la determinación de elementos extraños, la muestra no presentó: enmohecimiento, microorganismos, insectos, malos olores, decoloración, ni signos evidentes de deterioro, por lo que se procedió a la realización de la prueba de acuerdo al procedimiento descrito en materiales y métodos.

De acuerdo a la FHEUM, la determinación de materia extraña debió realizarse en 500 g del material, pero teniendo como limitante la poca cantidad de éste, esta determinación se realizó con 50 gramos. Se encontraron 0.78 g de materia extraña correspondiente a tierra, el porcentaje de materia extraña respecto al total de material vegetal fue 1.56% el cual es menor al límite establecido (2%).

4.4.2 Metales pesados

En la Tabla 20 se muestran las cantidades encontradas de los elementos analizados, comparando estos valores con los límites recomendados por la OMS; se puede asegurar que no hay posibilidad de intoxicación por metales pesados al emplear este material vegetal para el consumo humano.

Tabla 20. Determinación de metales pesados en las raíces de *H. longipes*.

Metal determinado	Cantidad (mg/Kg)
Pb	1.53
Cd	0.06
Hg	0.13

Límites recomendados por la OMS (WHO,2007):

- Pb: 10 mg/Kg
- Cd: 0.3 mg/Kg
- Hg: 0.2 mg/Kg

4.4.3 Determinación de cenizas

Se realizó la determinación de cenizas totales en *H. longipes*.



Hay que hacer notar que se tienen que establecer los límites de cenizas para cada especie vegetal considerando diferentes lotes de diferentes lugares de crecimiento. Sin embargo, esto no fue posible ya que solamente se contó con una sola colecta del material vegetal.

En la Tabla 21 se pueden observar los resultados obtenidos de esta determinación.

Tabla 21. Cenizas totales de las raíces de *H. longipes*.

Peso de la muestra (g)	Peso de cenizas totales (g)	% de cenizas
2.001	0.152	7.596
2.002	0.171	8.541
2.001	0.165	8.246
2.003	0.167	8.337
	Promedio	8.180
	DE	0.408

4.4.4 Índice de hinchamiento

Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Índice de hinchamiento de las raíces de *H. longipes*.

Peso de la muestra(g)	mL ocupados por la muestra	mL ocupados del material vegetal hinchado	Diferencia de volúmenes (mL)	Índice de hinchamiento
1.000	3	6	3	100.00 %
1.000	3	6	3	100.00 %
1.000	3	6.5	3.5	116.67%
1.000	3	6	3	100.00%
			Promedio	104.17
			DE	8.34

El valor obtenido en esta determinación es considerablemente alto y se relaciona con las sustancias presentes en la raíz que tienen capacidad de almacenar agua



5. CONCLUSIONES

Del estudio sobre pruebas de identidad y pureza de las plantas medicinales *Verbena carolina* y *Heliopsis longipes* se concluyó lo siguiente:

1. El estudio histológico realizado mediante pruebas microscópicas mostró las características tisulares de las estructuras vegetales estudiadas lo cual nos brinda una idea general de su anatomía, mientras que el estudio histoquímico evidenció la presencia y ubicación de algunos de los metabolitos primarios y secundarios presentes en la materia vegetal como fueron lípidos, pectinas y almidón (taninos y proteínas solamente en el caso de *Verbena*). La identificación de taninos fue hecha sobre el material vegetal sin tratamiento previo a la técnica de corte, ya que estas substancias son sensibles a este tratamiento.
2. De una fracción cromatográfica obtenida previamente de un extracto *n*-butanólico (Morales, 2009) fue posible aislar e identificar al verbascósido, este compuesto fue utilizado como estándar en la prueba de cromatografía en capa fina.
3. En la prueba de cromatografía en capa fina como prueba de identidad de las dos especies vegetales estudiadas, se establecieron los parámetros de R_f para los metabolitos secundarios principales: los iridoides verbenalina, hastatósido y verbascósido para la especie *V. carolina* mientras que para *H. longipes*, la alcanida afinina constituyó el compuesto principal. Estos compuestos se podrían emplear como de referencia de las mencionadas especies.
4. Dentro de las pruebas de pureza realizadas, al haber estudiado solamente un lote de las especies vegetales no fue posible establecer parámetros en las diferentes pruebas (cenizas totales, pérdida al secado, índice de hinchamiento, material extraíble, metales pesados y determinación del límite microbiano, ausencia o presencia de microorganismos objetables), sin embargo, el desarrollo de estas pruebas servirá como base de comparación con otros lotes de las



mismas plantas y de este modo, se podrán establecer parámetros con especificación de sus límites.

5. Los resultados en la determinación del límite microbiano, ausencia o presencia de microorganismos objetables, indica que mientras el empleo de *V. carolina* sea mediante la elaboración de una infusión o decocción, no existirá riesgo en su consumo.

6. Las determinaciones realizadas a los lotes estudiados de ambas especies, permitieron evaluar la calidad de las drogas crudas. Estas determinaciones están dirigidas al aseguramiento de su calidad y podrán servir como base complementaria para un estudio más elaborado para la obtención de una monografía de la planta.

7. La aplicación de conocimientos de anatomía vegetal y de química en el estudio interdisciplinario de las plantas medicinales, es una herramienta útil para el desarrollo de parámetros de calidad.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Acree, F., Jacobson, M. y Haller, L. (1945). "The structure of affinin, the insecticidal amine from *Erigeron affinos* D.C. ". *Journal of Organic Chemistry*, 10, 449-451.
2. Andary, C., Wilde, R., Laffite, R., Privat, G. y Winternitz, F. (1982). "Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobanche rapum-genistae*". *Phytochemistry*. Vol. 21, No. 5, pp 1123-1127.
3. Ardakani, M., Mosaddegh, M., Shafaati, A. (2003). "Volatile Constituents from the Aerial Parts of *Verbena Officinalis* L. (Vervain)". *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. pp. 39-42.
4. Argueta, V.A., Cano, A.M.C. y Rodarte, M.E. (1994). "Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana" 1ª. edición., Instituto Nacional Indigenista, México., Vol. III, pp. 1374-1380.
5. Bilia, A.R., Giomi, M., Innocenti, M., Gallori, S., Vincieri, F.F. (2007). "HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 46: 463-470.
6. Bilkova, J., Albrechtova, J. y Opatma J. (1999). "Histochemical detection and image analysis of non-specific esterase activity and the amount of polyphenols during annual bud development in Norway spruce". *Journal of Experimental Botany*, 50: 1129-1138.
7. Bonzani, N.E., Barboza, G.E., Bugatti, M.A. y Ariza, L. (2003 a). "Morpho-histological studies in the aromatic species of *Chenopodium* from Argentina". *Fitoterapia*. 74: 207-225.



8. Bonzani, N.E., Filippa, E.M. y Barboza, G.E. (2003 b). "Estudio anatómico comparativo de algunas especies de tallo de Verbenaceae". *Anales del Instituto de Biología*. Serie botánica 74(1): 31-45.
9. Calvo, M.I., San Julián, A., Fernández, M. (1997). "Identification of the Major Compounds in Extracts of *Verbena officinalis* L. (Verbenaceae) by HPLC with Post-Column Derivatization". *Chromatographia*. 46: 241-244.
10. Casanova, E., García-Mina, J.M., Calvo, M.I. (2008). "Antioxidant and Antifungal Activity of *Verbena officinalis* L. Leaves". *Plant Foods Hum Nutr*. 63: 93-97.
11. Castillo, E. y Martínez, I. (2007). "Manual de Fitoterapia" Elsevier Masson. Barcelona, España. Pp. 3-6.
12. Castillo, O. N. (2009). "Desarrollo y validación de un método por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para la cuantificación de afinina en la planta medicinal *Heliopsis longipes* (Compositae)". Tesis de licenciatura (Químico Farmacéutico-Biólogo), Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.
13. CONABIO (2008). "Capital Natural de México. Vol I: Conocimiento actual de la Biodiversidad. CONABIO. México.
14. Deepak, M. y Handa, S. (2000 a). "Anti-inflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*". *Phytotherapy Research* 14, 463-465.
15. Deepak, M. y Handa, S. (2000 b). "Quantitative Determination of the Major Constituents of *Verbena officinalis* using High Performance Thin Layer



Chromatography and High Pressure Liquid Chromatography". *Phytochemical Analysis*. 11: 351-355

16. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2008). 9a. edición. SSA. México, pp. 410-417.

17. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. (2001). SSA. México, pp. 19-69.

18. Franke, A. y Rimpler, H. (1987). "Vebraside, an iridoid glucoside from *Verbena brasiliensis*". *Phytochemistry*. 11: 3015-3020.

19. Favari, P.L., Nava, A. R. y Meléndez, C.M. (2007). "Posible efecto hepatoprotector de la Verbena en la hepatitis inducida por tetracloruro de carbono en la rata". *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Julio-Septiembre, año/vol. 38, num. 003, 19-25.

20. Gamboa, C., Castro, O. (2004). "Iridoids from the aerial parts of *Verbena littoralis* (Verbenaceae)". *Phytochemistry*. 65: 2369-2372

21. García-Chávez, A., Ramírez, C.E. y Molina-Torres, J. (2004). "El género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcanidas presentes en sus raíces." *Acta Botánica Mexicana*. 69: 115-131.

22. Gersbach, P. V., Wyllie, S. G. y Sarafis, S. V. (2001). "A new histochemical method for localization of the site of monoterpene phenol accumulation in plant secretory structures". *Annals of Botany*. 88: 521-525.

23. Gershenzon, J., Maffei, M. y Croteau, R. (1989). "Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*)". *Plant Physiology*, 89: 1351-1355.



24. González-Tejero, M.R., Casares, M. y Molero, J. (1987). "Estudio anatómico de algunas plantas medicinales de la provincia de Granada". *STVDIA BOTÁNICA*. 6: 173-184.
25. González-Tejero, M.R. y Casares-Porcel, M. (1996). "La anatomía vegetal como medio de identificación en etnobotánica". *Monograf. Jard. Bot. Córdoba*. 3:33-37.
26. Gopalakrishnan, S., Vadivel, E. y Dhanalakshmi, K. (2009). "Phytochemical and Pharmacognostical studies of *Teprhosia purpurea* Linn. aerial and root parts". *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* .3 (2) 73-78.
27. Gutiérrez-Lugo, M., Barrientos-Benitez, T., Luna, B., Ramírez-Gama, R., Bye, R., Linares, E. y Mata, R. (1996). "Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican medicinal plants". *Phytomedicine*. 2:341-347.
28. Lewis, W. H. y R. L. Oliver. 1961. "Cytogeography and phylogeny of North American species of *Verbena*". *American Journal of Botany*. 48: 638-643.
29. Li, Y., Matsunaga, K., Kato, R., Ohizumi, Y. (2001). "Verbenachalcone, a Novel Dimeric Dihydrochalcone with Potentiating Activity on Nerve Growth Factor-Action from *Verbena littoralis*". *J. Nat. Prod.* 64(6): 806-808
30. Little, E. (1948). "El chilcuague (*Heliopsis longipes*). Planta insecticida". *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 7:23-27.
31. Luna, S., Sandoval, E. y Lozoya X. (1986). "Estudio anatómico de la hoja del guayabo (*Psidium guajava*) para propósitos de control de la calidad del medicamento herbolario." *Fitoterapia*. 57 (4): 223-229.
32. Makino, Y., Kondo, S., Nishimura, Y., Tsukamoto, Y., Huang, Z. y Urade, Y. (2009). "Hastatoside and verbenalin are sleep-promoting components in *Verbena officinalis*". *Sleep and Biological Rhythm*. 7: 211-217.



- 33.** Martínez, M., (2005). “Las plantas medicinales de México”. Ediciones Botas. Tomo I. México. Pp. 113-115.
- 34.** Manzanero, M.G. (1995). “Estudio de siete raíces medicinales frescas del mercado de Sonora. Distrito Federal. México”. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Vegetal), Facultad de Ciencias, División de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.
- 35.** Metcalfe, C.R. y Chalk, L. (1979). “Anatomy of the Dicotyledons”. 2a. edición. Editorial Oxford University Press. Londres, RU.
- 36.** Molina-Torres, J., Salgado-Garciglia, R., Ramírez-Chávez, E. y del-Río, R. (1995). “Presence of the bornyl ester of deca-2*E*,6*Z*,8*E*-trienoic acid in *Heliopsis longipes* roots”. *Journal of Natural Products*. 58: 1590-1591.
- 37.** Molina-Torres, J., Salgado-Garciglia, R., Ramírez-Chávez, E. y del-Río, R. (1996). “Purely Olefinic Alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia* .” *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol. 24, No. 1, pp. 43-47.
- 38.** Molina-Torres, J., García-Chávez, A. y Ramírez-Chávez, E. (1999). “Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin”. *Journal of Ethnopharmacology*. 64: 241-248.
- 39.** Molina-Torres, J. y García-Chávez, A. (2001). “Alcamidas en plantas: distribución e importancia”. *Avance y Perspectiva*. 20: 377-387.
- 40.** Molina, J., Salazar, C., Armenta, C., Ramírez, E. (2004). “Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduced amides”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 4700–4704.



41. Morales, R.A. (2009). "Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de la planta medicinal *Verbena carolina* L. (Verbenaceae)". Tesis de licenciatura (Químico Farmacéutico-Biólogo), Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.
42. Müller, A., Ganzera, M., Stuppner, H. (2004). "Analysis of the Aerial Parts of *Verbena officinalis* L. by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography". *Chromatographia*. 60: 193-197.
43. National Research Council of the Philippines (NRCP). (1980). "Anatomy and histochemistry of some Philippine medicinal plants". *NRCP Bulletin*. 9: 23-29.
44. O'Leary, N., Múlgura M., Morrone O. (2007). "Revisión Taxonómica de las especies del género *Verbena* (Verbenaceae): Serie *Pachystachyae*". *Ann. Missouri Bot. Gard.* 94: 571-62
45. Ono, M., Oishi, K., Abe, H., Masuoka, C., Okawa, M., Ikeda, T., Nohara, T. (2006). "New Iridoid Glucosides from the Aerial Parts of *Verbena brasiliensis*". *Chem. Pharm. Bull.* 54(10): 1421-1424.
46. Ramírez-Chávez, E., Lucas-Valdez, L., Virgen-Calleros, G. y Molina-Torres, J. (2000). "Actividad fungicida de afinina y extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* sobre dos especies de *Sclerotium*". *Agrociencias*. 34:207-217.
47. Rehecho, S., Hidalgo, O., García-Iñiguez, M., Navarro, I., Astiasarán, I., Ansorena, D., Caverro, R.Y. y Calvo, M.I. (2011). "Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L.", *Food Science and Technology*. 44 (4): 875-882.
48. Ríos, L. G. (2000). "Control de calidad de una droga de origen vegetal: *Iostephane heterophylla* (Cav.) Hemsl". Tesis de maestría (Maestría en Ciencias



Químicas), Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.

49. Ríos, M. Y., Aguilar, B. y Gutiérrez, M. (2007). "Analgesic activity of affinin, an alkalamide from *Heliopsis longipes* (Compositae)." *Journal of Ethnopharmacology*. 110:364-367.

50. Romero, M., Del-Castillo, A., Martínez, A. y Calderón, J. (1989). "Preliminary studies on the antibacterial, insecticidal and toxicological effects of the chilcuan root *Heliopsis longipes*". *Veterinaria*. 20:151-156.

51. Rzedowski, J., Rzedowski, G. C. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. edición. Instituto de Ecología A.C., México, pp. 622-624.

52. Rzedowski, J., Rzedowski, G. C. (2002). "*Verbena*". *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*. Fasc. 100. Instituto de Ecología. Centro Regional del Bajío, México. pp. 118-139.

53. Salgado-Garciglia, R., Molina-Torres, J., López Meza, J. y Loeza-Lara, P. (2008). "Efecto del extracto crudo y de los compuestos aislados de *Heliopsis longipes* sobre la incidencia de la antracnosis, microrrización y nodulación del frijol". *Agrociencia*. Vol. 42, No.6, pp. 679-688.

54. Sandoval, E., Bye, R., Ríos, G. y Aguilar, M.I. (2005 a). "Microscopic analysis and histochemical observations of the medicinal root of *Isoetes heterophylla* (Cav.) Benth. ex Hemsl. (Asteraceae)". *Bol. Soc. Bot. Méx.* 77:65-73

55. Sandoval, E., Rojas, A., Gúzman, C., Carmona, L., Ponce, R., León, C., Loyola, C., Vallejo, M. y Medina, A. (2005 b). "Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuaderno de Biología No. 38". Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.



- 56.** Umaña, E., Castro, O. (1990). "Chemical Constituents of *Verbena littoralis*". *Int. J. Crude Drug Res.* 3: 175-176.
- 57.** Valento, P., Andrade, P., Areias, F., Ferreres, F., Seabra, R. (1999). "Análisis of Vervain Flavonoids by HPLC/Diode Array Detector Method. Its Application to Quality Control". *J. Agric. Food Chem.* 47: 4579-4582.
- 58.** Van Breemen, R., Fong, H.S. y Farnsworth, N. (2007). "The role of quality assurance and Standardization in the Safety of Botanical Dietary Supplements". *Chem Res Toxicol.* 20(4): 577-582.
- 59.** Venkatesh, S., Reddy, Y., Ramesh, M., Swamy, M., Mahadevan, N. y Suresh, B. (2008). "Pharmacognostical studies on *Dodonaea viscosa* leaves". *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* Vol .2(4). pp. 083-088.
- 60.** Wills, R., Bone, K. y Morgan, M. (2000). "Herbal products: active constituents, mode of action and quality control". *Nutrition Research Reviews.* 13: 47-77.
- 61.** World Health Organization. (1998). "Quality control methods for medicinal plants materials". World Health Organization. Geneva, Swiss.
- 62.** World Health Organization. (2000). "Situación Reglamentaria de los Medicamentos. Una Reseña Mundial ". World Health Organization. Geneva, Swiss.
- 63.** World Health Organization. (2002). "Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005". World Health Organization. Geneva, Swiss.
- 64.** World Health Organization. (2003). "WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants". World Health Organization. Geneva, Swiss.



65. World Health Organization. (2007 a). "WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues". World Health Organization. Geneva, Swiss.

66. World Health Organization. (2007 b). "WHO monographs on selected medicinal plants . Volumen 3". World Health Organization. Geneva, Swiss.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

-Integrated Taxonomic Information System. <http://www.itis.gov/>
(acceso Enero 23, 2011)



Anexo I: Preparación de soluciones, colorantes y reactivos para la realización de las técnicas de histoquímica e histología.

1. Preparación de soluciones alcohólicas en concentraciones graduales.

A partir de alcohol etílico absoluto

Para 100 mL:

- Alcohol 95%: 95 mL de alcohol + 5 mL de agua destilada.
- Alcohol 70%: 70 mL de alcohol + 30 mL de agua destilada.
- Alcohol 50%: 50 mL de alcohol + 50 mL de agua destilada
- Alcohol 30%: 30 mL de alcohol + 70 mL de agua destilada.

2. Safranina "O"

Safranina "O"	1 g
Metielosolve	50 mL
Alcohol al 96%	25 mL
Agua destilada	25 mL
Acetato de sodio	1 g
Formaldehido al 37%	2 mL

Disolver la safranina en el metielosolve y agregar los reactivos en el orden marcado. Mezclar y filtrar la solución.

3. Verde rápido

Solución A	
Verde rápido	4 g
Alcohol etílico absoluto	75 mL
Metielosolve	25 mL

Se disuelve en el alcohol y se agrega el metielosolve.

Solución B	
Alcohol etílico absoluto	25 mL
Aceite de clavo	75 mL

Mezclar ambas soluciones y finalmente filtrar la solución final.



- **Reactivos para pruebas histoquímicas**

- Pectatos de calcio

- a) Ácido tánico

Preparar una solución de ácido tánico al 1%, disolver 1 g de ácido tánico en 100 mL de agua destilada, agregar unas gotas de fenol para prevenir crecimiento de hongos.

- b) Cloruro férrico

Preparar una solución de cloruro férrico al 1%, disolver 1 g de cloruro férrico en 100 mL de agua destilada.

- Lignina

- a) Colorante

Disolver 0.1 de floroglucina en 10 mL de alcohol etílico al 95%, agitar todo el tiempo, filtrar y almacenar en una botella de color ámbar. Mantener en refrigeración.

- b) Ácido clorhídrico

Diluir 7.5 mL de ácido clorhídrico en 30 mL de agua destilada.

El colorante y el ácido deben mezclarse justo en el momento de aplicar sobre la muestra.

- Polisacáridos y proteínas

- a) Ácido peryódico al 1%

Ácido peryódico	1 g
Aforar con agua destilada	100 mL

Esta solución requiere refrigeración

- b) Reactivo de Schiff

Fucsina básica	1g	HCl 1 N	30 mL	Carbón activado	200 mg
Metabisulfito de sodio	3.8 g	Agua destilada	200 mL		



Hervir el agua y disolver la fucsina; dejar enfriar aproximadamente a 50 °C, filtrar. Añadir el ácido clorhídrico, enfriar hasta 25 ° C y agregar el metabisulfito de sodio; agitar un poco a intervalo de dos horas, agregar carbón activado y dejar reposar toda la noche. Filtrar y conservar la solución incolora en la oscuridad y en refrigeración.

c) Azul negro naftol

Azul negro naftol	1 g
Alcohol etílico 50%	100 mL

- Almidón

a) Lugol

Yoduro de potasio	2 g
Yodo	1 g
Agua destilada	300 mL

Esta solución debe guardarse en un frasco ámbar.

- Taninos condensados

a) Vainillina al 10 %- HCl

Vainillina al 10%	0.5 g
Alcohol etílico absoluto	5 mL

Para preparar el ácido clorhídrico 6 M es necesario tomar 3.6 mL d HCl y aforar con 20 mL de agua destilada.

- Taninos hidrolizables

a) Sulfato ferroso

Sulfato ferroso	2 g
Agua destilada	89 mL
Formaldehído	10 mL



- Aceites, grasas y cutina

a) Solución saturada de rojo "O" en aceite

Rojo O	0.1 g
Butanol	25 mL
Etilenglicol	75 mL

Esta solución se debe mantener en frasco color ámbar y en refrigeración.

• **Sustancias ablandadoras y fijadoras**

a) GAA

Glicerina	1 parte
Alcohol etílico al 96%	2 partes
Agua destilada	3 partes

b) FAA

Para 100 mL:

Formaldehído (37-40%)	10 mL
Alcohol (96 %)	50 mL
Agua destilada	35 mL
Ácido acético glacial	5 mL

c) Navashin

Solución A	
Trióxido de cromo	1 g
Ácido acético glacial	7 mL
Agua destilada	92 mL

Solución B	
Formaldehído (37-40%)	30 mL
Agua destilada	70 mL

La solución A y B se mezclan en el momento que se desea fijar la muestra.



Anexo II: Preparación de soluciones y medios de cultivo para la realización de límites microbianos

Preparar los medios de cultivo a partir de mezclas deshidratadas comerciales respetando estrictamente las indicaciones del fabricante. Cuando sea necesario preparar los medios de cultivo a partir de los ingredientes señalados en su fórmula y de acuerdo a las siguientes instrucciones: disolver los sólidos solubles en el agua, calentar hasta la disolución completa.

Determinar el pH a 25°C \pm 2°C y ajustar si es necesario con soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 1,0 N según sea el caso.

Los medios de cultivo y soluciones deben esterilizarse usando procesos válidos (FEUM, 2008).

1. Solución amortiguadora de fosfatos pH 7,2

- *Solución concentrada*

Fosfato monobásico de potasio	34 g
Agua purificada	500mL

En un matraz volumétrico de 1 000 mL, disolver el fosfato en el agua y ajustar el pH a 7,2 \pm 0,1 con una solución de NaOH 1,0 N (aproximadamente 175 mL) llevar a volumen, mezclar, envasar y esterilizar. Almacenar en refrigeración.

- *Solución de uso*

Diluir 1,25 mL de la solución concentrada en 1 000 mL de agua purificada. Envasar en volúmenes de 90 mL y 9mL y esterilizar.

2. Agar soya tripticaseína

Digerido pancreático de caseína	15 g
Digerido papaínico de soya	5,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua purificada	1 000 mL
pH después de esterilizar	7,3 \pm 0,2



3. Caldo soya-tripticaseína

Digerido pancreático de caseína	17,0 g
Digerido papaínico de soya	3,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato dibásico de potasio	2,5 g
Glucosa	2,5 g
Agua purificada	1 000 mL
pH después de esterilizar	7,3 ±0,2

Disolver los ingredientes en aproximadamente 500 mL de agua, calentando suavemente hasta que la disolución sea completa y llevar al volumen con agua. Ajustar el pH, filtrar, envasar en tubos adecuados y esterilizar.

4. Agar Baird-Parker- medio base

Digerido pancreático de caseína	10,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Cloruro de litio	5,0 g
Agar	20,0 g
Glicina	12,0 g
Piruvato de sodio	10,0 g
Agua purificada	950 mL
pH después de esterilizar	6,8 ±0,2

Disolver los ingredientes en el agua, calentar con agitación constante, hervir durante 1 min y esterilizar a 121°C durante 15 min, enfriar el medio entre 45 °C y 50 °C. Agregar 10 mL de solución estéril de telurito de potasio (1:100) y 50 mL de emulsión de yema de huevo, mezclar suavemente y preparar las placas.

- *Preparación de la emulsión de yema de huevo.* Desinfectar el cascarón de los huevos con solución de tintura de yodo al 2,0 %, romperlos; en una probeta estéril separar en condiciones asépticas las yemas, añadir solución salina estéril en una proporción de 3 a 7 (yema de huevo-solución salina). Homogeneizar. El medio estéril puede conservarse en refrigeración.



5. Agar Vogel-Johnson

Digerido pancreático de caseína	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Manitol	10,0 g
Fosfato dibásico de potasio	5,0 g
Cloruro de litio	5,0 g
Glicina	10,0 g
Agar	16,0 g
Rojo de fenol	25,0 mg
Agua purificada	1 000 mL
pH después de esterilizar	7,2 ±0,2

Mezclar los ingredientes, hervir durante 1 min, esterilizar y enfriar entre 45°C y 50°C, adicionar 20 mL de una solución estéril de telurito de potasio (1:100).

6. Agar cetricimida

Digerido pancreático de gelatina	20,0 g
Cloruro de magnesio	1,4 g
Sulfato de potasio	10,0 g
Agar	13,6 g
Bromuro de cetil trimetilamonio (cetricimida)	0,3 g
Glicerina	10,0 mL
Agua purificada	1 000 mL
pH después de esterilizar	7,2 ±0,2

Disolver en el agua los componentes sólidos, adicionar la glicerina, calentar con agitación constante y hervir durante 1 min, esterilizar.

7. Caldo lactosa

Extracto de carne	3,0 g
Digerido pancreático de gelatina	5,0 g

Lactosa	5,0 g
Agua purificada	1 000 mL
pH después de esterilizar	6.9±0,2

Después de esterilizar, enfriar el medio de cultivo lo más rápido posible.



8. Caldo tetratonato

Digerido pancreático de caseína	2,5 g
Digerido péptico de tejido animal	2,5 g
Sales biliares	1,0 g
Carbonato de calcio	10,0 g
Tiosulfato de sodio	30,0 g
Agua purificada	1 000 mL

Disolver los ingredientes sólidos en agua, calentar a ebullición con agitación constante. Añadir 10 mL de SI de verde brillante (1:1000). Una vez adicionada la SI de verde brillante el medio no debe calentarse. Envasar en tubos estériles con tapón rosca, porciones de 10 mL.

Antes de inocular la muestra adicionar a cada tubo 0,2 mL de una solución yodo-yodurada.

- *Solución yodo-yodurada*

Yoduro de potasio	5,0 g
Yodo	6,0 g
Agua purificada	20 mL

Conservar la solución en un frasco ámbar.

9. Agar Levine-eosina azul de metileno

Digerido pancreático de gelatina	10,0 g
Fosfato dibásico de potasio	20,0 g
Agar	15,0 g
Lactosa	10,0 g
Eosina	400,0 mg
Azul de metileno	65,0 mg
Agua purificada	1 000 mL
pH después de esterilizar	7,1 ±0,2

Disolver los ingredientes en el agua, calentar a ebullición con agitación contante durante 1 min y esterilizar.



10. Agar Mac Conkey

Digerido pancreático de gelatina	17,0 g
Digerido pancreático de caseína	1,5 g
Digerido péptico de tejido animal	1,5 g
Lactosa	10,0 g
Mezcla de sales biliares	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	13,5 g
Rojo neutro	30,0 mg
Cristal violeta	1,0 mg
Agua purificada	1 000 mL
pH después de esterilizar	7,1 ±0,2

Para disolver los ingredientes hervir durante 1 min.

11. Agar dextrosa Sabouraud

Dextrosa	40,0 g
Digerido pancreático de caseína	5,0 g
Digerido péptico de tejido animal	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua purificada	1 000 mL
pH después de esterilizar	5,6 ±0,2

Mezclar los ingredientes con en el agua, hervir hasta disolución, esterilizar.

**Anexo III: Tabla para la determinación del NMP**

Número de tubos con crecimiento microbiano			Número más probable de microorganismos por gramo o mililitro
100 mg ó 0.1 mL / tubo	10 mg ó 0.01 mL / tubo	1 mg ó 0.001 mL / tubo	
3	3	3	>1100
3	3	2	1100
3	3	1	500
3	3	0	200
3	2	3	290
3	2	2	210
3	2	1	150
3	2	0	90
3	1	3	160
3	1	2	120
3	1	1	70
3	1	0	40
3	0	3	95
3	0	2	60
3	0	1	40
3	0	0	23

(FHEUM, 2001)



Anexo IV: Características morfológicas de las bacterias empleadas sobre medios selectivos-diferenciales.

- *Staphylococcus aureus*

Medio de Cultivo	Morfología colonial	Morfología microscópica y reacción al Gram
Agar Vogel-Johnson	Colonias negras rodeadas de zona amarilla.	Cocos Gram positivos agrupados en racimos.
Agar Baird-Parker	Colonias negras lustrosas brillantes rodeadas de zonas claras de 2mm a 5 mm.	Cocos Gram positivos agrupados en racimos.

FEUM, 2008.

- *Escherichia coli*

Medio de Cultivo	Morfología colonial	Morfología microscópica y reacción al Gram
Agar Mac Conkey	Colonias grandes rosas a rojas rodeadas de una zona de precipitado.	Bacilos Gram negativos.
Agar Levine-eosina-azul de metileno	Colonias pequeñas azul-negro con brillo metálico de color verde.	Bacilos Gram negativos.

FEUM, 2008.

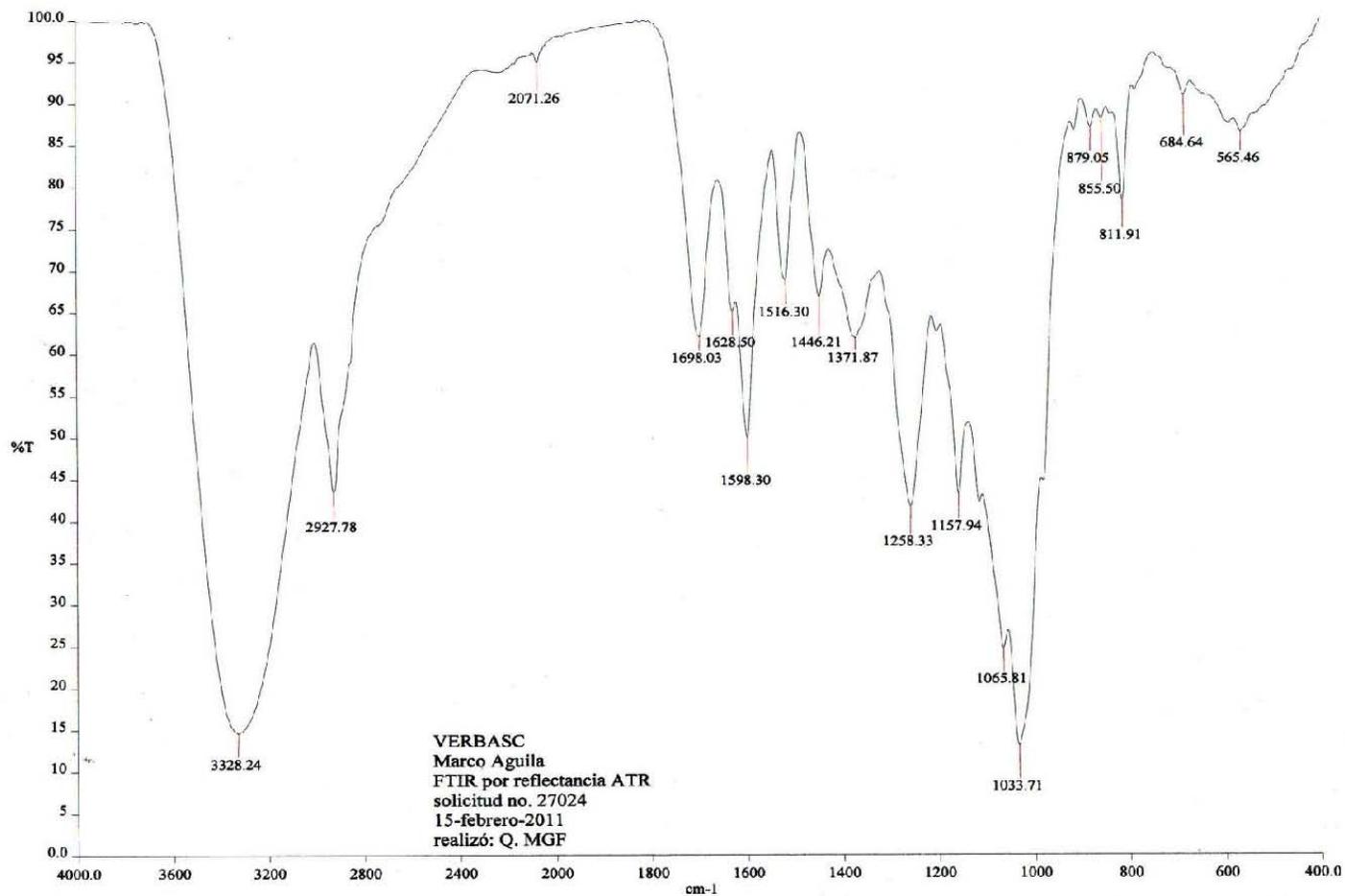
- *Pseudomonas aeruginosa*

Medio de Cultivo	Morfología colonial	Morfología microscópica y reacción al Gram
Agar cetrimida	Colonias verdosas.	Bacilos Gram negativos.

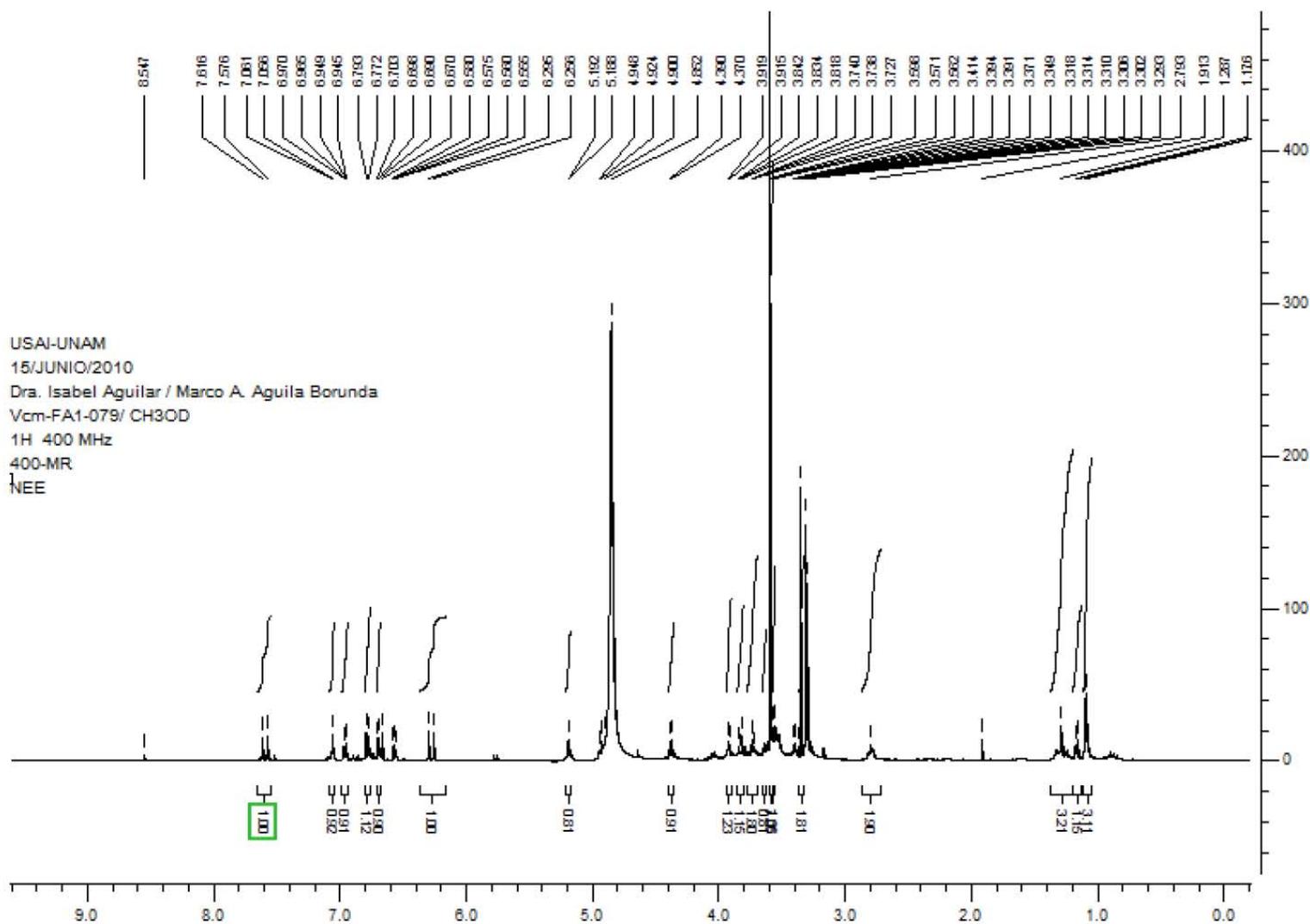
FEUM, 2008.

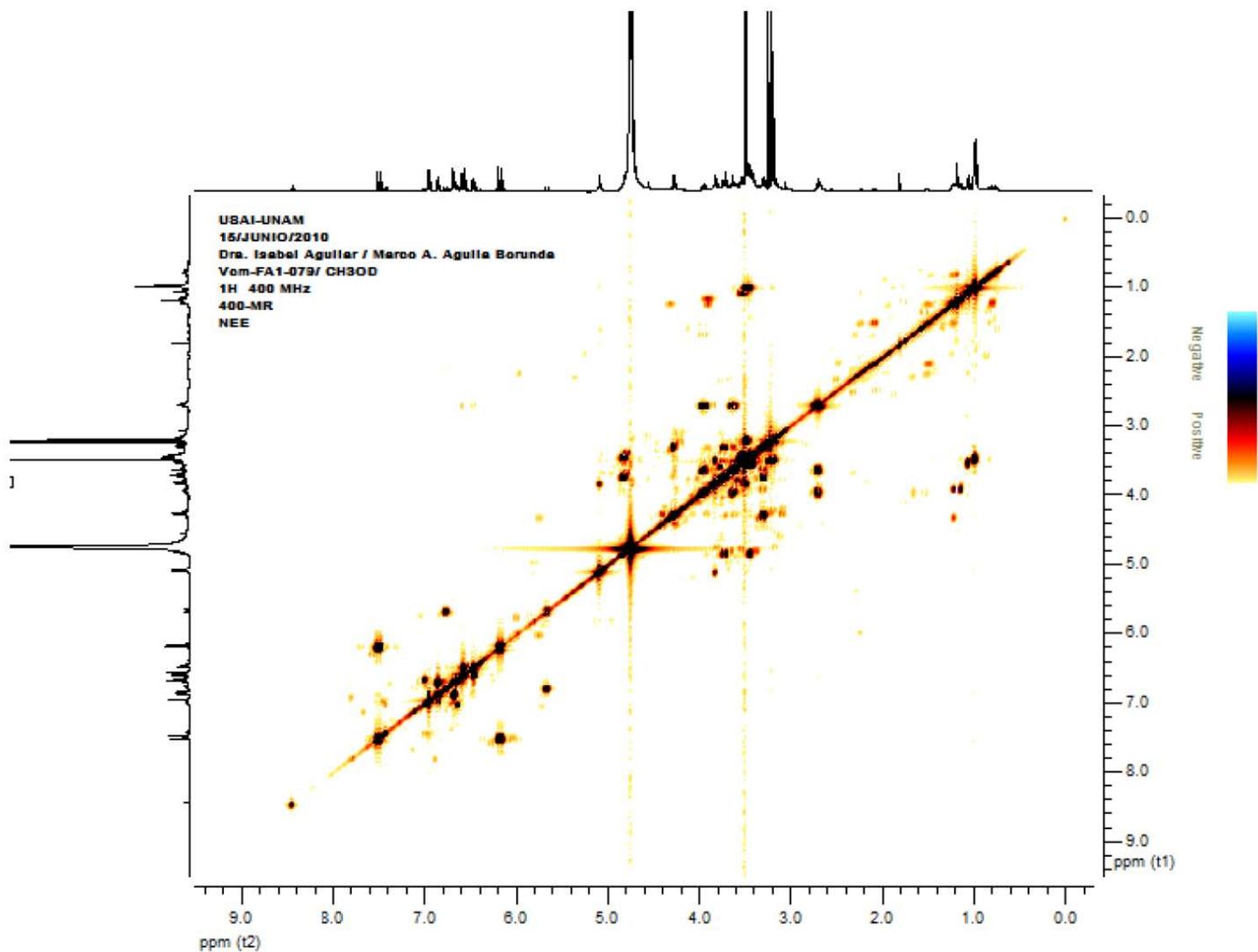


Anexo V: Espectros

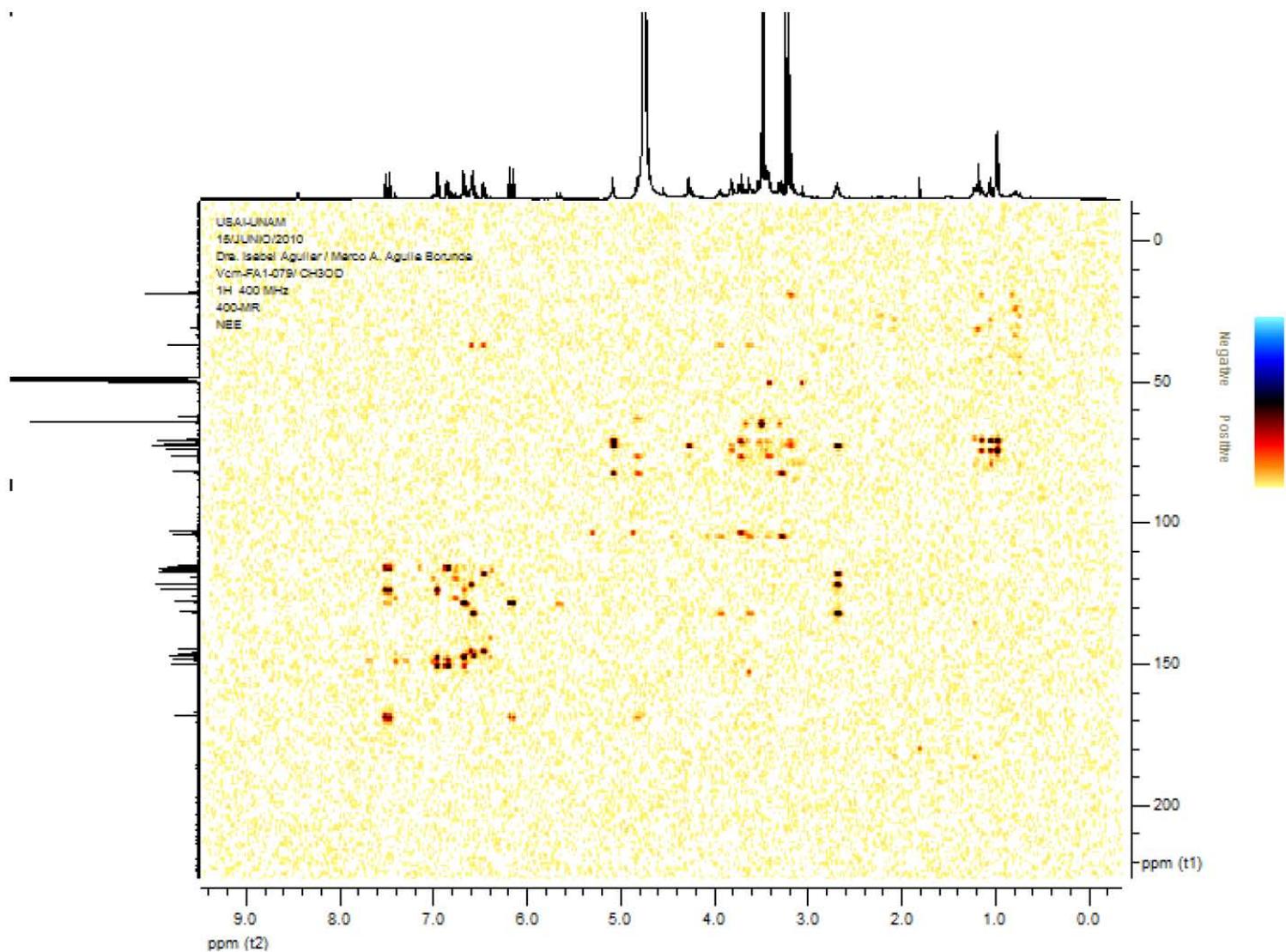


Espectro 1. IR del verbascósido.

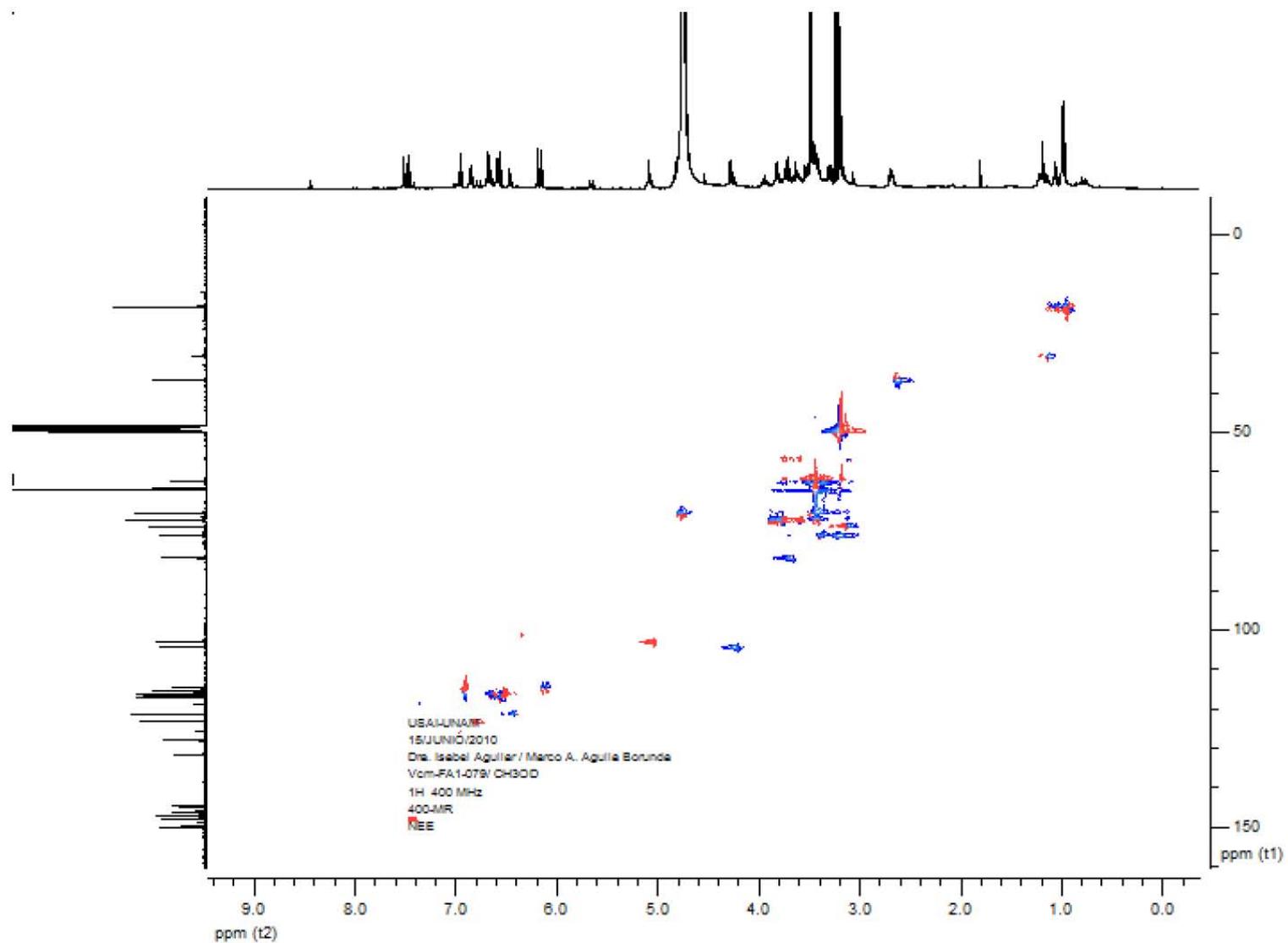
Espectro 2. RMN-¹H del verbascósido.



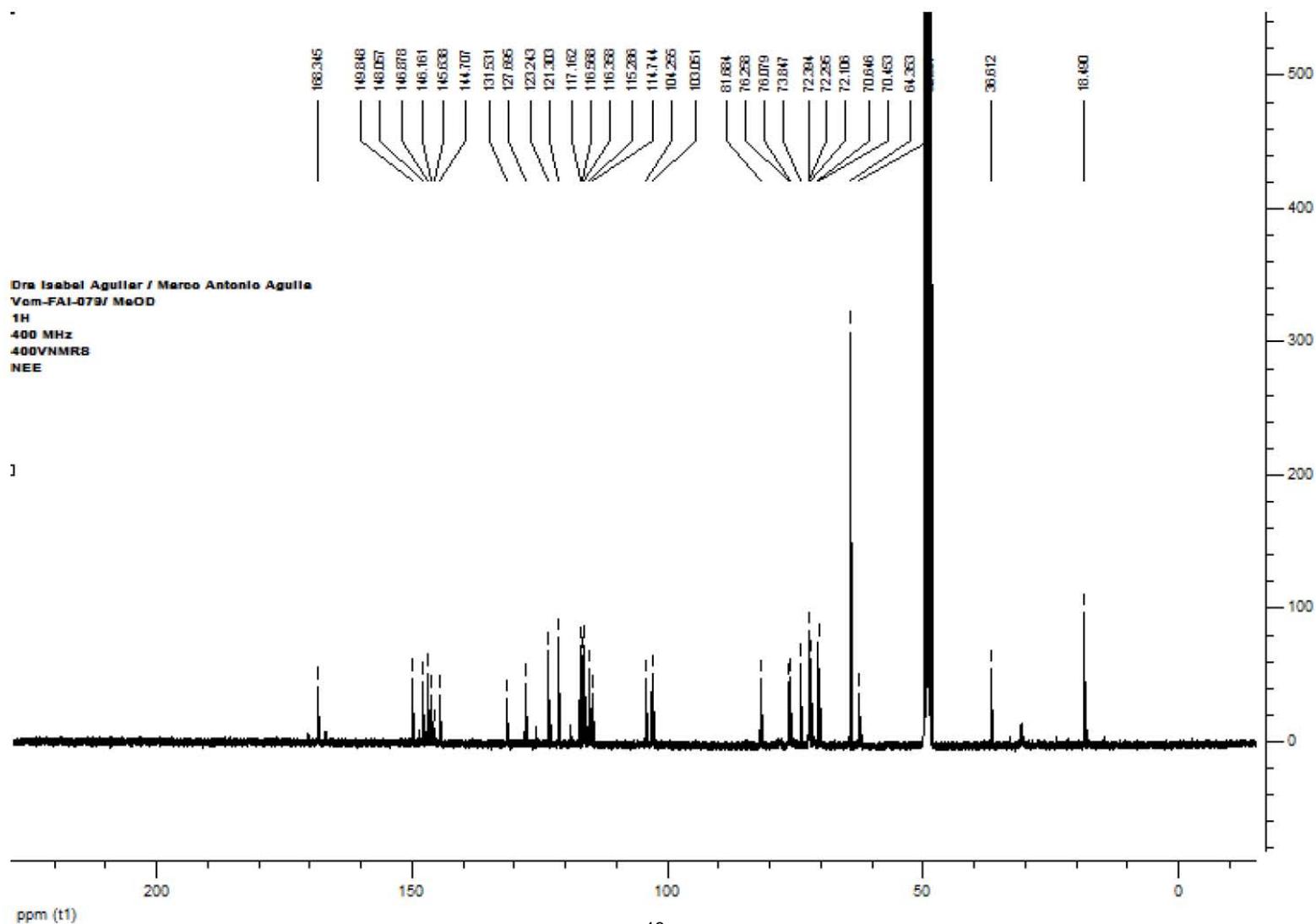
Espectro 3. COSY del verbascósido.



Espectro 4. HMBC del verbascósido.



Espectro 5. HSQC del verbascósido.



Espectro 6. RMN-¹³C del verbascósido.