



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

# Las tesis de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Farmacia

Comparación Histoanat3mica y Fitoqu3mica  
entre *Hydrocotyle bonariensis* L. y *Centella  
asiatica* (L.) Urb

N° 593

Victoria Emilia S3nchez Temiño

Tutora: Dra. Etila D. Spegazzini

Departamento de Investigaciones  
Tesina aprobada el 23 de agosto de 2013

Universidad de Belgrano  
Zabala 1837 (C1426DQ6)  
Ciudad Aut3noma de Buenos Aires - Argentina  
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533  
e-mail: [invest@ub.edu.ar](mailto:invest@ub.edu.ar)  
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>



## Índice

Resumen .....	6
1. Introducción .....	7
2. Objetivos .....	9
Objetivos Generales .....	9
Objetivos Específicos .....	9
3. Antecedentes.....	10
3.1 Generalidades del Género <i>Hydrocotyle</i> L. ....	10
Usos tradicionales de Algunas especies del Género <i>Hydrocotyle</i> L. ....	10
3.2 <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.....	11
Parte Usada .....	11
Descripción Macroscópica.....	11
Descripción Microscópica.....	12
Droga en Polvo.....	13
Constituyentes Fitoquímicos .....	13
Farmacología .....	14
Usos Terapéuticos y Tradicionales .....	14
Efectos No Deseados.....	15
Interacciones .....	15
Contraindicaciones.....	15
Algunos Productos Medicinales, Cosméticos y Alimenticios Comercializados en el País que Contienen <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb. ....	16
3.3. <i>Hydrocotyle bonariensis</i> L. ....	17
Descripción Macroscópica .....	18
Constituyentes Fitoquímicos .....	18
Usos Tradicionales y Potenciales.....	19
Algunos Productos Medicinales, Cosméticos y Alimenticios Comercializados en el País que Contienen <i>Hydrocotyle bonariensis</i> L.....	20
3.4. Ácido Ursólico y Oleanólico.....	20
4. Materiales y Métodos.....	21
Material Vegetal.....	21
Técnicas Histológicas .....	21
Hojas .....	21
Tallo y Pecíolo .....	22
Fruto .....	22
Droga en Polvo.....	22
Análisis Fitoquímico.....	22
Preparación De Los Extractos.....	22
Cromatografía en Capa Delgada (TLC) .....	23
5. Resultados.....	23
Hoja .....	23
Tallo y Pecíolo .....	24
Fruto .....	25
Droga en Polvo.....	26
Análisis Fitoquímico.....	26
Sistema Cromatográfico para Saponinas.....	26
Sistema Cromatográfico para Triterpenos y Otros Compuestos No Polares .....	28
6. Discusión .....	33
Análisis Botánico .....	33
Diferencias Macroscópicas .....	33
Diferencias Microscópicas.....	33

Análisis Fitoquímico.....	33
Sistema Cromatográfico para Saponinas.....	33
Sistema Cromatográfico para Triterpenos y Otros Compuestos No Polares .....	34
7. Conclusiones .....	36
8. Bibliografía.....	38

## Agradecimientos

- A la Doctora Etile Spegazzini por dirigir este trabajo, su sabiduría, confianza y apoyo incondicional.
- A la Doctora Silvia Debenedetti por su asistencia con el presente trabajo y sus conocimientos.
- Al Profesor Carlos Valle por sus recomendaciones.
- Al Profesor Matías Ghianda por su ayuda y consejo.
- A los chicos de los laboratorios externos por la paciencia y ayuda con los equipos.
- A mis padres por su asistencia en la recolección de las muestras y por acompañarme en todo el camino recorrido hasta ahora.
- A Florencia Clavelli, amiga y colega, por su colaboración en la redacción de este trabajo.
- A la Universidad de Belgrano por permitirme el uso de sus instalaciones e insumos y por toda la formación recibida.

## Resumen

La “Redondita de Agua” (*Hydrocotyle bonariensis* L.) es una planta autóctona del continente americano muy utilizada por los nativos para el tratamiento de las afecciones cutáneas. Debido a su gran parecido físico y a la semejanza de sus propiedades, es muy frecuente su confusión con la “Centella” (*Centella asiatica* (L.) Urb.). El siguiente trabajo tiene por objetivo establecer parámetros macro y microscópicos, así como también fitoquímicos, que permitan la diferenciación de una, de la otra ya sea, en estado seco, entero, fragmentado o en polvo. Se establecieron parámetros histoanatómicos de hoja, tallo, pecíolo y fruto para la caracterización y comparación botánica de *Hydrocotyle bonariensis* L. con *Centella asiatica* (L.) Urb., así como también se desarrollaron cromatografías en capa delgada (TLC) con el mismo fin. Por otra parte, se analizó la presencia de ácido ursólico y oleanólico para el potencial uso de esta especie como materia prima en medicamentos.

## 1. Introducción

Las plantas se han utilizado como herramienta para restablecer la salud desde tiempos antiguos, no sólo por el hombre, sino también incluso por muchos animales. La diferencia entre ambos radica en que el hombre dio un paso más allá del uso instintivo de los animales al tomar una actitud más racional hacia su utilización.

A través de la experiencia, una investigación más exhaustiva y los distintos medios de transmisión de la información, el ser humano fue adquiriendo diversos conocimientos sobre las propiedades medicinales de las plantas. Este variado repertorio de saberes conformó la base de la terapéutica de múltiples culturas a lo largo de la historia.

Los registros escritos más antiguos sobre uso de plantas medicinales fueron confeccionados por el pueblo sumerio hace 5000 años. Dichos registros referían a más de 250 plantas, entre las cuales se destacan la amapola, el beleño y la mandrágora (Bauer Petrovska, 2012). Con el paso del tiempo, estos registros fueron apareciendo en todas las culturas antiguas. Como ejemplo de ésto puede citarse:

- El Papiro de Ebers (pueblo egipcio, 1700 a.C.), donde figura como hierbas medicinales la menta, el ricino, el anís, los áloes, etc. (Pergola, 2009).
- El Pen Tsao (China, 2800 a.C.), primer herbario médico, es una compilación que incluye 365 plantas confeccionado por Shen Nung, también conocido como El Emperador Rojo (Pergola, 2009).
- Los libros sagrados indios, Vedas, también mencionan el tratamiento con plantas medicinales, como por ejemplo la pimienta, la nuez moscada y el clavo de olor (Bauer Petrovska, 2012).
- La Biblia y el Talmud reflejan el uso de la mirra y el incienso en rituales aromáticos que acompañaban a determinados tratamientos (Bauer Petrovska, 2012).

En la Antigua Grecia, varios personajes de importancia histórica se dedicaron al estudio de las plantas medicinales y sus usos en la terapéutica. Como ejemplo pueden citarse a Herodotus (500 a.C.), quien refiere a los usos del ricino, Orpheus, al ajo y al eléboro; y Pitágoras, a la cebolla albarrana, la mostaza y la col. Pero uno de los más importantes fue el padre de la medicina, Hipócrates, en cuyos escritos pueden encontrarse más de 300 plantas clasificadas en función de su acción fisiológica (Bauer Petrovska, 2012).

Con la expansión del Imperio Romano, muchos de los saberes sobre medicina se expandieron por el continente europeo. Pero la personalidad más destacada de esta época fue Galeno (s. II d.C.), quien sentó las bases de la anatomía y clasificó las enfermedades según su origen (internas, externas y por conjugación de ambos tipos). Esta clasificación perduró durante toda la Edad Media hasta la llegada de Vesalio (Pergola, 2009).

Cabe destacar que durante la Edad Media, el conocimiento sobre plantas medicinales, la habilidad para curar y para la preparación de drogas, pasó a los monasterios, donde se manejaban con un número muy limitado de plantas (Bauer Petrovska, 2012). Esto, sumado a la inquisición, generó el poco avance en las ciencias en general (Pergola, 2009). Pero gracias a las invasiones árabes, nuevos conocimientos en la materia serían introducidos en Europa paulatinamente (Pergola, 2009).

Mientras que esto ocurría en el viejo continente, en la América Precolombina, el uso de plantas medicinales ya se había desarrollado. Utilizaban los estigmas del maíz como diurético, el pimiento para las afecciones cutáneas (cocimiento de las hojas), cálculos renales (cocimiento de la corteza), en el tratamiento de heridas (emplastos de la resina) y contra parásitos (supositorios a base de la resina). Otra planta muy utilizada fue la ipecacuana por sus propiedades eméticas. Cabe destacar la obtención de bálsamos del grupo del benjuí, actualmente conocido como bálsamo del Perú (Pergola, 2009).

Superada la Peste Negra, el descubrimiento de América, los viajes de Marco Polo y la invención de la imprenta en el siglo XV, comienza el Renacimiento y surgen las figuras de Paracelso, Samuel Hahnemann y, más adelante, Thomas Sydenham. Estos hombres revolucionaron la terapéutica del Medioevo

y ampliaron el repertorio terapéutico e incluyeron las medicinas que se utilizaban en el Nuevo Mundo (Pergola, 2009; Bauer Petrovska, 2012).

Los distintos aportes de los científicos de la época sentaron las bases de un nuevo movimiento ideológico que marcaría la historia: el Iluminismo. Esta ideología significó un verdadero avance para la ciencia médica, viéndose favorecida también, por la introducción de nuevas plantas medicinales gracias a las expediciones botánicas realizadas por los españoles en América.

Con la implementación de nuevas especies en la terapéutica, fue necesaria su clasificación. Tal tarea fue realizada en el siglo XVIII por el naturalista sueco Carl von Linné. Ésto contribuyó a disminuir los errores en el uso de la fitoterapia, evitándose así la confusión de las especies (Pergola, 2009).

A partir de siglo XIX nuevos elementos se suman a la terapéutica, entre ellos, el aislamiento de muchos principios activos a partir de su fuente vegetal. Como por ejemplo: la morfina y otros alcaloides de la amapola (1806), la quinina (1820), la estricnina (1817), etc (Bauer Petrovska, 2012).

A medida que nos adentramos en el siglo XX, la fitoterapia es dejada de lado y nace la industria farmacéutica, la cual se basa en la utilización del principio activo aislado. Posteriormente, estos fármacos se modificaron para mejorar su acción terapéutica y disminuir sus efectos adversos. Es aquí cuando aparecen los medicamentos de síntesis y semisíntesis (Pergola, 2009).

Hoy en día, la industria farmacéutica es una de las industrias más poderosas a nivel global. Constantemente se encuentra en la búsqueda de nuevos e innovadores fármacos con los cuales responder a la demanda sanitaria actual. Por esta razón, y debido a que la obtención de fármacos a partir de la síntesis es limitada para el desarrollo de moléculas de novo complejas, la industria se ha inclinado hacia la búsqueda de sustancias que proporcionen una estructura básica a partir de la cual trabajar. Estas complejas estructuras abundan en las plantas, quienes de por sí pueden tener actividad terapéutica. Gracias a ello, el uso de plantas medicinales ha tenido un resurgimiento en nuestros tiempos, no sólo como materia prima para la elaboración de medicamentos, sino como un nuevo tipo de medicamentos: Los Medicamentos Fitoterápicos o Medicamentos Herbarios.

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) define a los medicamentos fitoterápicos como aquellos "...que contengan como principio activo drogas vegetales puras y/o mezclas definidas de estas y/o preparados de drogas vegetales, tradicionalmente usadas con fines medicinales, y que no contengan sustancias activas químicamente definidas o sus mezclas aun cuando fuesen constituyentes aislados de plantas, salvo los casos que así se justifiquen" (Res. 144/98, 1998).

Según la base de datos estadísticos sobre el comercio de mercaderías (COMTRADE) de la División de Estadísticas de las Naciones Unidas, en el año 2011, en el mundo se exportaron el equivalente a Us\$ 2.415.643.353 en plantas con fines medicinales, cosméticos o como insecticidas, etc. Siendo que, en el año 2008, sólo se exportaron Us\$ \$1.562.871.976 (UN COMTRADE, s.f.). Lo que refleja la creciente importancia que va adquiriendo el uso de plantas medicinales en la actualidad.

En la Argentina, la utilización de plantas medicinales autóctonas como materia prima para medicamentos apenas está iniciando. Por lo que es de vital importancia realizar una investigación metódica y exhaustiva de la flora local para poder así responder eficientemente a los nuevos desafíos que presenta la terapéutica e, insertarnos y posicionarnos en este creciente mercado a nivel mundial.

Pero desgraciadamente, cuanto más rentable sea este mercado, más factible es la introducción de productos alterados y adulterados. Lo cual es de especial preocupación porque supone un potencial riesgo para la salud de quienes los consumen. Ésto se debe, no sólo a que la cantidad de los principios activos pueda ser menor o nula con respecto a los legítimos, sino también al agregado de otras especies que contengan sustancias nocivas para el individuo.

Por ello, es necesario el desarrollo de métodos eficientes para diferenciar aquellos que son legítimos de los que no lo son, y así poder asegurar la calidad y seguridad de las plantas medicinales que utilizarán tanto los pacientes como los laboratorios para la fabricación de nuevos medicamentos.



## 2. Objetivos

### Objetivos Generales

- Diferenciar macroscópica, microscópica y fitoquímicamente *Hydrocotyle bonariensis* L. de *Centella asiatica* (L.) Urb. a fin de evitar la adulteración de una con la otra.

### Objetivos Específicos

- Analizar los elementos característicos de las hojas, tallos, pecíolos y frutos de *Hydrocotyle bonariensis* L.
- Describir las características diferenciales de hoja, tallo, pecíolo y fruto de *Hydrocotyle bonariensis* L.
- Determinar la presencia de ácido ursólico y/u oleanólico en *Hydrocotyle bonariensis* L. ya sea como aglucón de los principios activos o como triterpenos libres.
- Establecer parámetros histoanatómicos y fitoquímicos que permitan el reconocimiento de *Hydrocotyle bonariensis* L., ya sea, entera, fragmentada, pulverizada o el extracto de la misma.
- Establecer un perfil cromatográfico por Cromatografía en Capa Delgada (TLC) de los metabolitos secundarios presentes en las partes aéreas de *Hydrocotyle bonariensis* L.

### 3. Antecedentes

#### 3.1. Generalidades del Género *Hydrocotyle* L.

El género *Hydrocotyle* L. (Apiaceae, Hydrocotyloideae) se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo y está compuesto por diversas especies herbáceas anuales y perennes adaptadas a varios tipos de humedales (Alvarez et al., 2008). Incluido por primera vez dentro de las Umbelíferas por Tournefort a finales del siglo XVII (Díaz Pita, 2011), actualmente cuenta con alrededor de 80 especies distribuidas a nivel mundial (Lucena et al., 2001), habiendo en Argentina 13 especies (Zuloaga & Morrone, 1999). De estas 13 especies pueden citarse:

- *H. bonariensis* Lam.
- *H. bowlesioides* Mathias & Constance
- *H. chamaemorus* Cham. & Schltld.
- *H. callicephalala* Cham.
- *H. cryptocarpa* Speg.
- *H. exigua* (Urb.) Malme.
- *H. filipes* Mathias.
- *H. indecora* DC.
- *H. leucocephala* Cham. & Schltld.
- *H. modesta* Cham. & Schltld.
- *H. pusilla* A. Rich.
- *H. ranunculoides* L.f.
- *H. verticillata* Thunb.

#### Usos tradicionales de Algunas especies del Género *Hydrocotyle* L.

*Hydrocotyle bonariensis* L.: se destaca su uso tradicional contra los eritemas cutáneos (Lucena et al., 2001). Sus otros usos tradicionales se mencionan en la sección correspondiente.

- *Hydrocotyle ranunculoides* L.f.: Posee similares usos a *H. bonariensis*. La raíz tiene propiedades diuréticas y desobstruyente del hígado. También se utiliza para enfermedades infecciosas (Lucena et al., 2001).

Otras *Hydrocotyles* con ensayos que demuestran actividad terapéutica

- *Hydrocotyle javanica* Thunb.: posee una potente capacidad para neutralizar el veneno de algunos ofidios, por lo que tiene un potencial uso como coadyuvante en la terapia contra el envenenamiento producido por mordeduras de serpientes, especialmente contra los efectos locales del veneno de cobra (Kumarappan et al., 2011).
- *Hydrocotyle leucocephala* Cham. & Schltld.: posee diacetilenos inmunosupresores, ceramidas y cerebrósidos que demostraron ser activos en el ensayo de producción de citoquinas inducida por lipopolisacárido (LPS) para IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$ ; por lo que tendría un potencial uso en el tratamiento de la artritis reumatoidea (Ramos et al., 2006).
- *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam.: demostró actividad antitumoral en ratas (Yu et al., 2007) y efecto protector en el daño hepático y la fibrosis inducida por la ingesta crónica de alcohol en ratas (Huanga et al., 2013).
- *Hydrocotyle umbellata* L.: ha demostrado tener efecto ansiolítico y sedante en ratones (Rocha et al., 2011).

### 3.2. *Centella asiatica* (L.) Urb.

Conocida como Indian pennywort, Gotu kola, Hidrocótile o simplemente Centella (Alfa Beta, s.f.), es una planta herbácea perteneciente al género *Centella* L. (antes *Hydrocotyle asiatica* L.) originaria de la zona paratropical del océano Índico que, con el tiempo, fue expandiéndose a distintas zonas geográficas, incluyéndose el norte de nuestro país (Lucena et al., 2001; Zuloaga & Morrone, 1999) (Fig. 1).

Su amplia distribución a lo largo del mundo ha permitido su variada utilización a través del tiempo, adjudicándole múltiples propiedades en función de la cultura que la ha implementado, coincidiendo todas en su eficacia en el tratamiento de afecciones dérmicas diversas.



Figura 1. *Centella asiatica* (L.) Urb. (Alonso, 2009).

Cabe aclarar, que si bien *Hydrocotyle asiatica* L. es un sinónimo de *Centella asiatica* (L.) Urb., el género al que pertenece actualmente esta planta es el de *Centella* L. y no el de *Hydrocotyle* L. (Zuloaga & Morrone, 1999).

Pese a su gran semejanza, el género *Centella* L. se diferencia del *Hydrocotyle* L. "...por la presencia de vainas foliares y frutos de mayor tamaño con costillas secundarias" (Lucena et al., 2001, p. 28).

#### Parte Usada

Partes aéreas desecadas o la planta entera (WHO, 1999).

#### Descripción Macroscópica

La *Centella asiatica* (L.) Urb. es una planta herbácea, perenne y polimorfa de más-menos 20 centímetros de alto. Posee estolones y tallos postrados de los cuales brotan entre uno y tres pecíolos. Sus hojas verde grisáceas son simples, pecioladas, paralinervadas y su lámina es orbicular-reniformes. Miden 1,5 a 7 centímetros de ancho y de 1 a 6 centímetros de largo. Su ápice es redondeado, obtuso a truncado y de margen crenado. Sus pecíolos fistulosos miden hasta 15 centímetros de largo y están ensanchados en la base (Argentina, Ministerio de Salud de La Nación, s.f.; WHO, 1999).

Sus inflorescencias son pequeñas umbelas simples que contienen generalmente 3 a 5 flores sésiles, de color blanco o rosado pálido y con pedúnculo generalmente corto. El fruto es un diaquenio liso y comprimido con aspecto orbicular. Es tan ancho como largo y está comprimido lateralmente. Posee 7 nervaduras (costillas) por mericarpio, pericarpio muy grueso, reticulado y de color pardo oscuro. Sus semillas son pequeñas y comprimidas (Argentina, Ministerio de Salud de La Nación, s.f.).

### Descripción Microscópica

La epidermis de la hoja posee células poligonales de paredes rectas y estomas en ambas caras, en su mayoría del tipo rubiáceo o paracítico y una pequeña proporción de anisocíticos. Presenta cutícula estriada y tricomas eglandulares simples, uniseriados, retorcidos y generalmente con 2 a 3 células. La diferencia entre la epidermis superior e inferior radica en que esta última posee células de mayor tamaño y escasos tricomas.

La sección transversal de ambas epidermis (Fig. 2) está constituida por células rectangulares, tangencialmente aplanadas y alternadas con células papilosas cuadrangulares.

El parénquima en empalizada abarca 2 a 3 capas de células y el parénquima lagunoso, 6 a 7 capas con varios espacios intercelulares, algunas células incluso presentan drusas de oxalato de calcio. La nervadura muestra 2 o 3 capas de células sin cloroplastos. También puede observarse que el colénquima está constituido por 2 o 3 capas de células. La zona parenquimatoso también posee 7 haces vasculares, los cuales poseen 15-23µm de diámetro. Se puede apreciar rodeando la nervadura media, un número variable de canales secretores.

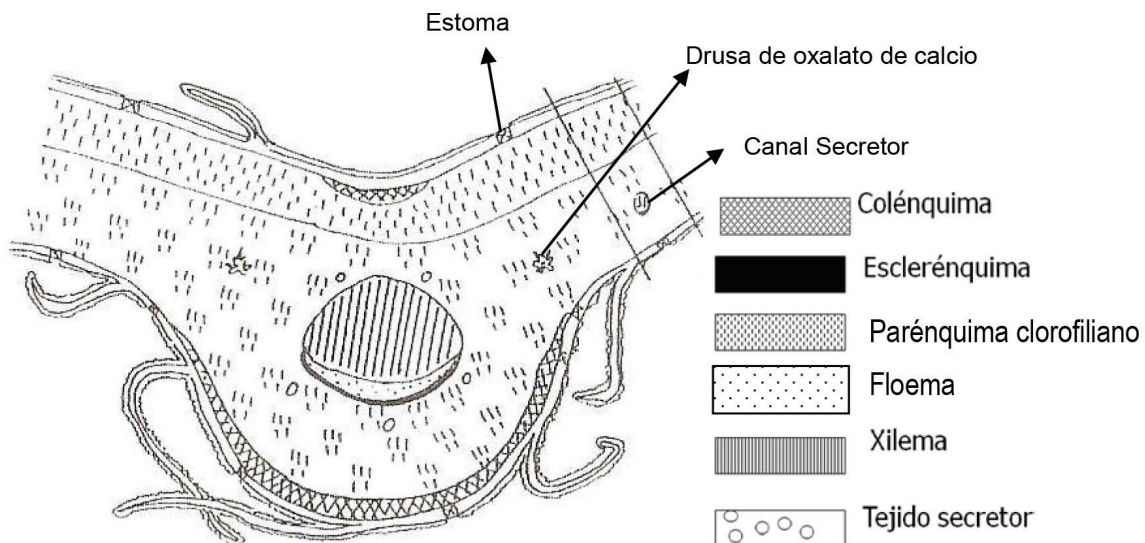


Figura 2. Corte transversal de hoja de *Centella asiatica* (L.) Urb. 40x (Simbología Metcalfe y Chalk) (Argentina, Ministerio de Salud de La Nación, s.f.).

El pecíolo (Fig. 3) posee un contorno circular, levemente aplanado y con un aspecto canaliculado. Las células de la epidermis son cuadrangulares, algo papilosas con tricomas eglandulares y estomas similares a los de la hoja, posee una cutícula delgada y estriada. Mientras tanto, en la posición subepidérmica, se observan entre 2 y 3 filas de colénquima, llegando a 5 en las aristas. Posee 7 haces vasculares colaterales dispuestos en círculo y en el parénquima que los separa, pueden apreciarse drusas de oxalato de calcio y varios canales secretores. Cabe destacar, que cada arista lleva un haz vascular reforzado del lado del floema por fibras (Argentina, Ministerio de Salud de La Nación, s.f.).

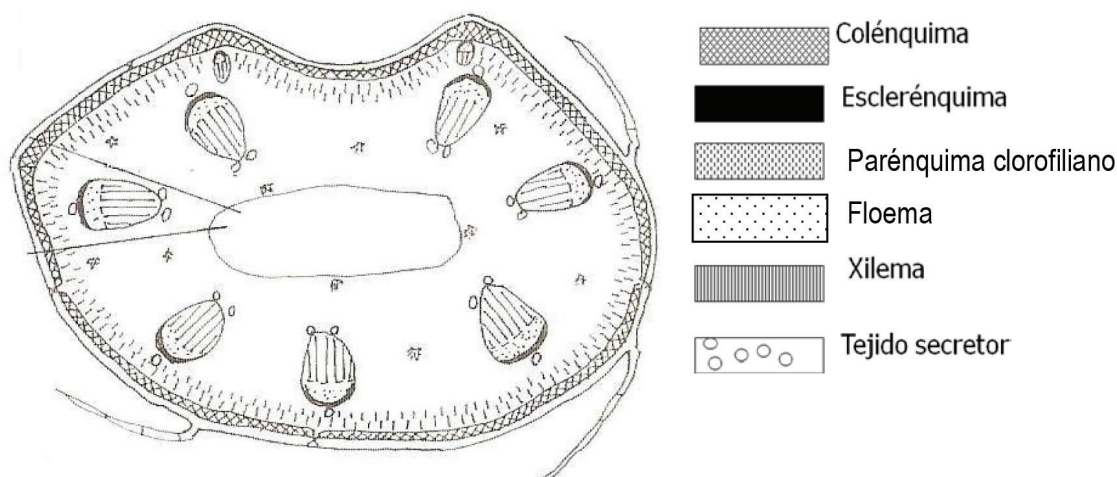


Figura 3. Corte transverso de peciolo de *Centella asiatica* (L.) Urb. 40x (Simbología Metcalfe y Chalk) (Argentina, Ministerio de Salud de La Nación, s.f.).

En el caso de fruto (Fig. 4), éste posee células poligonales en la epidermis, haces de vasos anulares y angostos, y células parenquimatosas que contienen drusas de oxalato de calcio. (WHO, 1999).

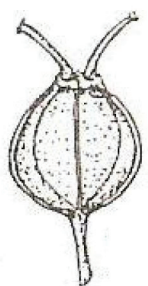


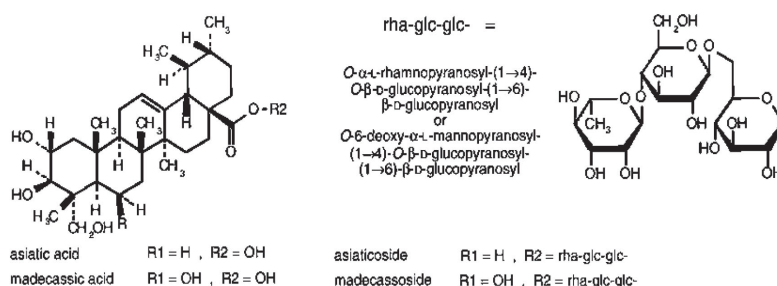
Figura 4. Fruto de *Centella asiatica* (L.) Urb. 25x (Argentina, Ministerio de Salud de la Nación, s.f.).

### Droga en Polvo

La *Centella* en polvo es de aspecto verde grisáceo en el cual se observan fragmentos de epidermis con células poligonales, estomas paracíticos, tricomas eglandulares largos, delgados y retorcidos; células parenquimatosas con drusas de oxalato de calcio; fibras y fragmentos de nervadura con vasos leñosos estrechos y anillados (Argentina, Ministerio de Salud de La Nación, s.f.).

### Constituyentes Fitoquímicos

Los más importantes principios activos de *Centella asiatica* (L.) Urb. son los ácidos triterpénicos asiático y madecásico, y sus ésteres glicosídicos o saponósidos: asiaticósido y madecassósido (Fig. 5) (WHO, 1999).



-Figura 5. Estructura molecular de los ácidos asiático y madecásico, y sus glicósidos (WHO, 1999).

Otros saponósidos: centellósido, brahmósido, brahminó-sido y las centellosaponinas B, C y D.

También posee flavonoides como el kampferol, la quercetina y sus heterósidos, ácidos grasos como linoleico, lignocérico, linolénico, oléico, palmítico, elaídico y esteárico.

Además, contiene aceites esenciales ( $\beta$ -cariofileno, trans- $\beta$ farneseno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -copaeno, germa-creno D, etc.) (Bruneton, 2001), taninos, fitosteroles (campesterol, sitoesterol, estigmaesterol), mucílagos, resinas, aminoácidos libres (alanina, serina, aminobutirato, aspartato, glutamato, lisina y treonina), un alcaloide (hidrocotilina) y un principio amargo (vallerina) (Alonso, 2009).

## Farmacología

Se ha observado en ensayos in vitro de cultivos de fibroblastos humanos, que bajas dosis de asiaticósido, así como de ácido asiático y madecásico, estimulan la producción de colágeno tipo I (WHO, 1999) por parte de los fibroblastos y de mucopolisacáridos (Bruneton, 2001). Algunos autores atribuyen esta actividad sólo al ácido asiático y sus derivados (Bruneton, 2001).

En el caso de la prevención de las cicatrices queloides o hipertróficas, el mecanismo de acción parece ser doble, por un lado incrementa las síntesis de colágeno y mucopolisacáridos ya mencionadas, y por el otro, inhibe la fase inflamatoria de este tipo de cicatrices. También se ha propuesto que los asiaticósidos estimulan la actividad de los miofibroblastos y colágeno inmaduro, lo que interferiría con la formación de cicatrices.

El mecanismo por el cual el extracto de *Centella asiatica* (L.) Urb. es eficaz para el tratamiento de las úlceras estomacales y duodenales inducidas por el estrés, estaría asociado a una actividad depresora del sistema nervioso central por parte de ésta, debido a un incremento en la concentración de GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) en el cerebro.

Otros ensayos clínicos respaldan su uso en los trastornos venosos, en el tratamiento de la lepra, y otras patologías cutáneas (WHO, 1999).

## Usos Terapéuticos y Tradicionales

Los usos terapéuticos, ya sean respaldados por datos clínicos, tradición o datos folklóricos, se aprecian en el siguiente cuadro:

Usos	
<b>Respaldados por datos clínicos</b>	Tratamiento de heridas, quemaduras y úlceras. Prevención de cicatrices queloides e hipertróficas. Aceleración de la curación de heridas post-trauma y postquirúrgicas crónicas. Oralmente, en el tratamiento de úlceras estomacales y duodenales inducidas por el estrés.
<b>Descritos en farmacopeas y medicina tradicional</b>	Tratamiento de úlceras leprosas y desórdenes venosos.

<p><b>Descritos en medicina folclórica, sin respaldo de datos clínicos o experimentales</b></p>	<p>Terapia de albinismo, anemia, asma, bronquitis, cólera, sarampión, constipación, dermatitis, diarrea, mareos, dismenorrea, disentería, disuria, epilepsia, hematemesis, hemorroides, hepatitis, hipertensión, leucorrea, nefritis, desórdenes nerviosos, neuralgia, reumatismo, sífilis, dolor de dientes, ureitis, várices, celulitis, ictericia, y como antipirético, analgésico, antiinflamatorio, agente “cerebrotónico”.</p> <p>Los cataplasmas han sido utilizados en el tratamiento de contusiones, esguinces, fracturas cerradas y furunculosis.</p>
---	---

Cuadro 1. Usos Terapéuticos de *Centella asiatica* (L.) Urb. (WHO, 1999).

Otras acciones respaldados por ensayos clínicos: las geninas tienen acción antifúngica contra el *Pytyrosporum ovale*, acción antibacteriana contra el *Propionibacterium acnes* y otras bacterias patógenas, y acción antifermentativa. Esto permite su aplicación sobre la piel agredida (Alonso, 2009).

### Efectos No Deseados

En el uso tópico e inyección intramuscular, se ha descrito sensación de quemazón y dolor, así mismo y menos frecuente, dermatitis de contacto, esta última pudiéndose deber a algún componente sensibilizante en la preparación. En el uso oral, las sobredosis o su uso prolongado, puede producir irritación gástrica, náuseas, ictericia, aumento de las enzimas hepáticas, daño hepático, afectar el ciclo menstrual, hiperglucemia e hipercolesterolemia (WHO, 1999; EMEA, 2010).

### Interacciones

No se han reportado interacciones (WHO, 1999; EMEA, 2010)

### Contraindicaciones

La *Centella asiatica*(L.) Urb no debe administrarse en mujeres embarazadas debido a que en estudios hechos en animales ha demostrado ser abortivo por vía oral. Su uso tópico no se recomienda a aquellos pacientes que presenten hipersensibilidad a cualquiera de sus componentes o a otras plantas de la misma familia (WHO, 1999; EMEA, 2010).

**Algunos Productos Medicinales, Cosméticos y Alimenticios Comercializados en el País que Contienen *Centella asiatica* (L.) Urb.**

Nombre Comercial	Principio Activo	Forma Farmacéutica	Cantidad	Indicación	Laboratorio
Nio Marine Plus	Algas Marinas + <i>centella asiatica</i> . + asoc.	Crema	200 g	Anticelulítico o Reductor	Lagos
Caramelos con Centella asiatica Gold Nutrinat	Centella asiática	Caramelos	10 unidades	Anticelulítico	San Ceferino
Centella asiática	Centella asiática	Comprimidos	40 unidades	Anticelulítico	Natufarma
Centella asiática	Centella asiática	Comprimidos	20 unidades	Anticelulítico	ISA
Centella asiática	Centella asiática	Comprimidos	30 unidades	Anticelulítico	La Serranita
Centella asiática Garden House	Centella asiática (50 mg)	Comprimidos	60 unidades	Anticelulítico	H. Médica Argentina
Centella asiática Gold Fish	Centella asiática	Cápsulas	30 y 60 unidades	Anticelulítico	Drog. Argentina
Centella asiática Plus	Centella asiática	Comprimidos	12 Blísters de 10 comprimidos cada uno	Suplemento Dietario	Biokosma
Centella asiática WP	Centella asiática	Comprimidos	30 unidades	Bioestimulante	Wunder Pharm
Centella Complex	Centella asiática	Comprimidos	20 y 40 unidades	Anticelulítico	Natural San
Centella Plus	Centella asiática	Comprimidos	30 unidades	Suplemento Dietario	Drog. Argentina
Centella Queen NF	Centella asiática	Crema Emulsión	200 g	Anticelulítico	Temis-Lastaló
		Gel Exfoliante para ducha	200 g		
	Centella asiática + asoc.	Crema fría para piernas	200 g	Bioestimulante	
		Comprimidos Recubiertos	30 unidades	Bioestimulante	
		Crema fría para piernas cansadas	200 g	Anticelulítico	
		Crema para celulitis	200 g	Anticelulítico	
Gel Anticelulítico	Centella asiática	Gel	200 mL	Anticelulítico	Drog. Argentina
Hierbas del Oasis Crema Masajes Reductores	Centella asiática	Crema	240 g	Fitoterápico	Hierbas del Oasis



Hierbas del Oasis Suplemento Dietario	Centella asiática, Té verde, Ginkgo + asociados	Comprimidos	15 Blísters de 10 comprimidos cada uno	Suplemento Dietario	Hierbas del Oasis
No Cell	Centella asiática	Tabletas	60 unidades	Anticelulítico	Empresa Nutrición Arg.
Flebonat	Centella asiática + asoc.	Comprimidos	30 unidades	Flebotónico	Lafarmen
Saint Gottard Tisanas Celulitis	Centella asiática + asoc.	Saquitos	25 unidades	Tisana	Pharmamerican S.R.L.
Centella Queen Complex	Centella asiática + asoc.	Comprimidos	30 unidades	Suplemento Dietario	Temis-Lastaló
Ginkan Baliarda	Centella asiática + miconazol + metronidazol + asoc.	Óvulos	6 y 12 unidades	Antimicrobiano y Reepitelizante Vaginal	Baliarda
Goicoechea Crema mamá	Centella asiática + cacao	Crema	400 g	Venotónico	Genomma Lab.
Clevosan	Centella asiática + Neomicina +	Pomada	10, 30 y 60 g	Cicatrizante y Protector	Baliarda
	Oligómeros procianidólicos	Polvo	10 y 30 g	Dérmico	
	Centella asiática + Tetracaína	Spray	20 mL		

Cuadro 2. Productos en el Mercado argentino que contengan Centella asiatica (L.) Urb. (Clyna S.A., 2013).

### 3.3. *Hydrocotyle bonariensis* L.

También conocida como “redondita de agua”, “paragüita” o “caá-ay” (Vivot et al., 2012), es una planta herbácea ampliamente distribuida en Estados Unidos, Perú, Chile, parte de Brasil y Argentina (Silva et al., 2009) (Fig.6). En la República Argentina, es comúnmente hallada en pajonales, prederas húmedas y en los médanos del este y sur de la Provincia de Buenos Aires (Ouviña et al., 2009).



Figura 6. *Hydrocotyle bonariensis* L..

### Descripción Macroscópica

Hierbas con tallos estoloníferos, nudos radicantes, pardos o blancos, rojizos, glabros y entrenudos largos, entre 1,5-9,0 cm long. Hojas largamente pecioladas, lámina peltada, orbicular a suborbicular, glabra, con 11-19 nervios, base levemente emarginada, margen con 11 a 19 lóbulos, cada lóbulo con 3-5; pecíolo y escapo glabros, de igual o mayor diámetro que los estolones, de 3-40 cm long. Pecíolo con inserción levemente excéntrica en la lámina. Estípulas pequeñas, membranáceas, castañas y con puntos rojizos. Umbelas compuestas, con 6-16 radios y con algunas flores cortamente pediceladas entre ellos, las umbélulas con flores hasta de 3° orden (raro 4° o 5° orden). Involucro con brácteas de 2 mm, cóncavas, aovado-trianguulares a aovado-lanceoladas, ápice agudo. Flores con pedicelos filiformes de 1-6 mm long. Pétalos color crema con manchas purpúreas, irregularmente triangular, 0,5-1,0 mm long. por 1,0-1,2 mm lat. Estambres de 1,2 mm long.; filamentos filiformes, atenuados en el ápice. Estilopodio plano, estilo filiforme, después de la antesis levemente atenuado, de 1 mm long. Fruto lateralmente comprimido, orbicular, ápice subemarginado, base emarginada, de 1,8-3,0 mm long. por 1,6-2,0 mm lat. (Lucena et al., 2001, p. 22) (Fig. 7).



Figura 7. *Hydrocotyle bonariensis* L., planta entera.

### Constituyentes Fitoquímicos

En la familia Apiaceae, las saponinas han sido reportadas en pocos géneros, entre ellos el género *Hydrocotyle* L. (Tabopda et al., 2012).

En el caso de *H. bonariensis* L., se han aislado seis saponinas triterpénicas de tipo oleanana, siendo éstas derivadas del barrigenol (Fig. 8).

Sus nombres completos son:

- 3-O-{b-D-glucopyranosyl-(1->2)-[a-L-arabinopyranosyl-(1->3)]-b-D-glucuronopyranosyl}-21-O-(2-methylbutyroyl)-22-O-acetyl-R1-barrigenol
- 3-O-{b-D-glucopyranosyl-(1->2)-[a-L-arabinopyranosyl-(1->3)]-b-D-glucuronopyranosyl}-21-O-(2-methylbutyroyl)-28-O-acetyl-R1-barrigenol
- 3-O-{b-D-glucopyranosyl-(1->2)-[a-L-arabinopyranosyl-(1->3)]-b-Dglucuronopyranosyl}-21-O-acetyl-R1-barrigenol
- 3-O-{b-D-glucopyranosyl-(1->2)-[a-L-arabinopyranosyl-(1->3)]-b-D-glucuronopyranosyl}-R1-barrigenol

- 3-O-{b-D-glucopyranosyl-(1->2)-[a-L-arabinopyranosyl-(1->3)]-b-D-glucuronopyranosyl}-22-O-(2-methylbutyroyl)-A1-barrigenol
- Saniculosido R<sub>1</sub>

Los primeros cinco compuestos han recibido el nombre de bonarienósidos A, B, C, D y E respectivamente (Tabopda et al., 2012).

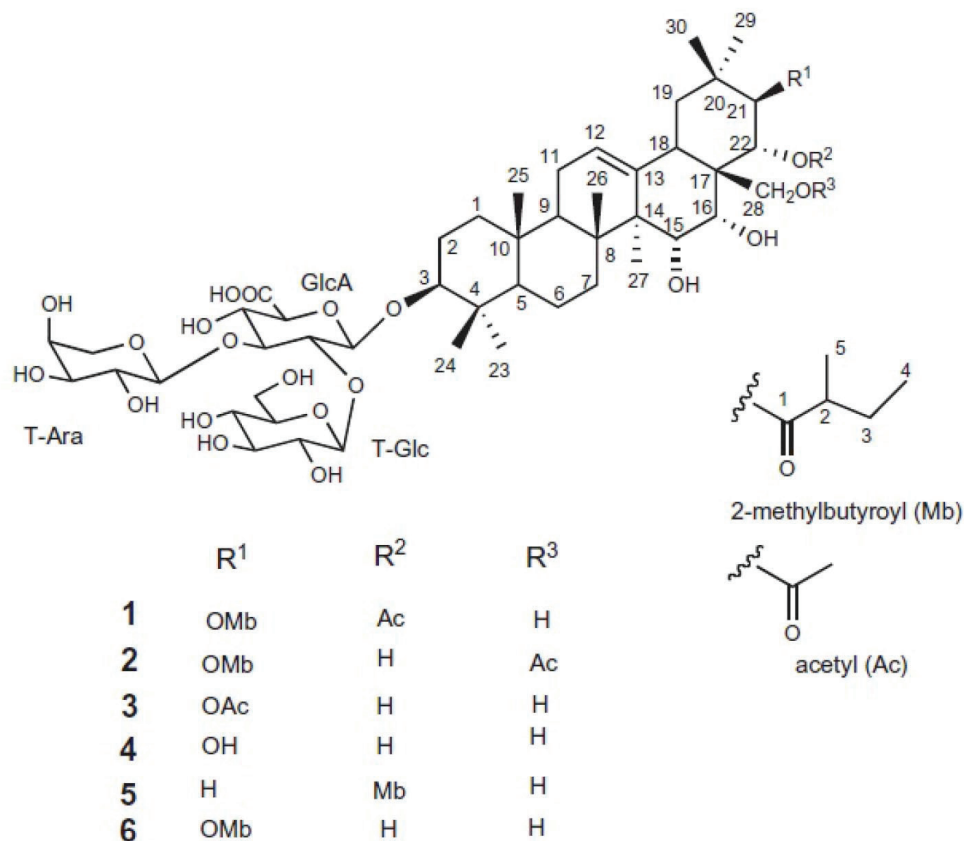


Figura 8. Estructura química de saponósidos de *H. bonariensis* (Tabopda et al., 2012).

También posee otros compuestos como aceites esenciales, los cuales fueron identificados en un 77,1% a partir de la hidrodestilación de las hojas de *Hydrocotyle bonariensis* L.. Los constituyentes volátiles obtenidos fueron en su mayoría monoterpenos (58,1%), siendo el (+)-limoneno el principal y encontrándose libre de su enantiómero. Así mismo se hallaron sesquiterpenos (19%, destacándose el  $\gamma$ -muuroleno) y, en menor concentración, E-cariofileno, sabineno,  $\alpha$ -copaeno,  $\delta$ -cadineno y  $\gamma$ -terpineol (Silva et al., 2009).

### Usos Tradicionales y Potenciales

Las hojas machacadas y en cataplasma se utilizan para tratar heridas infectadas e inflamaciones del cutis. Tiene acción diurética, hepática, antihidrópica y pectoral en infusión y su decocción se aplica externamente para desaparecer las pecas. El jugo también posee propiedades diuréticas y, además, es emético y se lo utiliza para enfermedades de pulmón, hígado, vejiga y bazo (Vivot et al., 2012).

Es la planta más utilizada por las poblaciones indígenas de América del Sur contra los eritemas cutáneos (Lucena et al., 2001).

Además, tanto el extracto metanólico como la infusión obtenidos a partir de las partes aéreas de **H. bonariensis** L., han demostrado tener actividad antiinflamatoria tópica, siendo el extracto metanólico el más activo (Ouviña et al., 2009).

### Algunos Productos Medicinales, Cosméticos y Alimenticios Comercializados en el País que Contienen *Hydrocotyle bonariensis* L.

Nombre Comercial	Principio Activo	Forma Farmacéutica	Cantidad	Indicación	Laboratorio
Sisairos	Hydrocotyle bonariensis + Aloe vera	Crema	50 g	Dermofitoterapéutico	Arcano S.A.

Cuadro 3. Productos en el Mercado argentino que contengan *Hydrocotyle bonariensis* L. (ANMAT, 2010).

### 3.4. Ácido Ursólico y Oleanólico

Los ácidos ursólico y oleanólico (Fig. 9) son ácidos triterpénicos pentacíclicos presentes en una gran variedad de plantas. Estos compuestos han cobrado importancia en los últimos años debido a sus variadas y potencialmente útiles actividades:

El ácido ursólico ha demostrado actividad como inhibidor de la proliferación de algunas líneas celulares tumorales, al igual que algunos derivados del mismo (Ma et al., 2005). También se le han encontrado otros usos potenciales al demostrarse que reduce la atrofia muscular y estimula el crecimiento del músculo en ratón (Kunkel et al., 2011), además tiene función cardioprotectora (Liobikas et al., 2011), hepatoprotectora, antiinflamatoria y antihiperlipidémica (Liu, 1995).

El ácido oleanólico, al igual que el ácido ursólico, ha demostrado tener actividad antitumoral, hepatoprotectora, antiinflamatoria y antihiperlipidémica (Liu, 1995). También se ha comprobado que posee una débil actividad anti-HIV in vitro (Mengoni et al., 2002) y es un débil inhibidor de la entrada del virus de la hepatitis C. Por esta razón, se han estado ensayando derivados del mismo que han demostrado una mayor potencia (Yu et al., 2013).

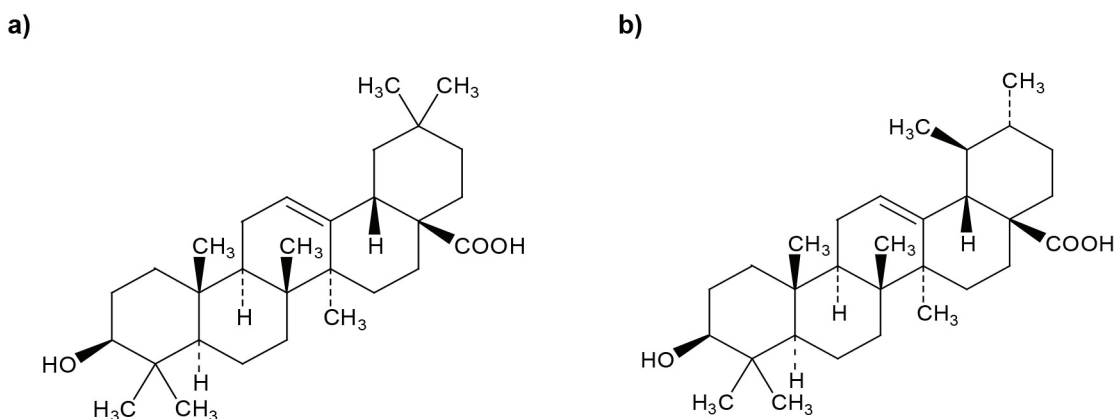


Figura 9. Estructura química de los ácidos oleanólico (a) y ursólico (b) (Merk Research Laboratories, 2001).

## 4. Materiales y Métodos

### Material Vegetal

Las partes aéreas (hoja, tallo y pecíolo) de *Hydrocotyle bonariensis* L. fueron recolectadas en las dunas al norte de la ciudad de Villa Gesell, Provincia de Buenos Aires, durante el mes de noviembre del año 2012. Mientras que los frutos fueron recolectados en la misma localidad en la Avenida 6 y Paseo 102, durante los meses de enero y febrero del año 2013.

Las partes aéreas desecadas de *Centella asiatica* (L.) Urb. fueron provistas por la Universidad de Belgrano.

### Técnicas Histológicas

El material vegetal fue identificado por la Dra. Etilé Spegazzini y secado a temperatura ambiente. La siguiente sección sólo se aplicó a *Hydrocotyle bonariensis* L., salvo el cálculo del Índice de Estomas y de Empalizada, que se le realizó también a *Centella asiatica* (L.) Urb..

### Hojas

- 1- Vista Superficial: Para la observación de las epidermis foliares (superior e inferior) e inervación a través de un microscopio óptico (MO), se procedió a diafanizar y eliminar la cutina con la técnica de Carpano et al. (1994). Para determinar el Índice de Estomas se calculó a través de la siguiente fórmula (Wallis, 1968):

$$IE = \left[ \frac{E}{(C_{ep.} + E)} \right] \times 100$$

Donde IE es el índice estomático; E es el número de estomas por campo de observación y  $C_{ep.}$  es el número de células epidérmicas por campo de observación.

El recuento se realizó diez veces tal y como señala la técnica de Wallis (1968).

Para el cálculo del índice de empalizada, se enfocó la epidermis superior y se dibujaron cuatro células epidérmicas adyacentes y luego se enfocó el parénquima en empalizada subyacente, sin mover el preparado, para dibujar las células que correspondían a las epidérmicas seleccionadas anteriormente. Se procedió luego a contar las células en empalizada que se hallaban en el área delimitada por las células epidérmicas. Si una célula estaba interceptada por el límite externo del área considerada, ésta se incluía en el cálculo sólo si más de la mitad se encontraba dentro este área.

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$IE_{mp} = \frac{C_{emp}}{4}$$

Siendo  $IE_{mp}$  el índice en empalizada y  $C_{emp}$ , el número de células en empalizada, debajo de 4 células epidérmicas (Albrecht et al., 2005).

Esta medición se realizó en diez campos distintos y se promediaron los índices obtenidos.

- 2- Transcortes: Se realizaron cortes transversales con un micrótopo de Ranvier a partir del material seco. Los cortes se diafanizaron y se colorearon con safranina para poder distinguir los distintos tejidos.

### Tallo y Pecíolo

Transcortes: Se practicaron cortes transversos con un micrótopo de Ranvier. Los cortes se diafanizaron y colorearon con safranina.

### Fruto

Transcortes: Se practicaron cortes transversos con un micrótopo de Ranvier. Los cortes se diafanizaron y colorearon con safranina.

### Droga en Polvo

- 1- Se llevaron a polvo los tallos y hojas del material vegetal.
- 2- El polvo se diafanizó y se observó al microscopio.
- 3- Se establecieron elementos histológicos de diagnóstico de cada órgano.
- 4- Se realizaron reacciones histoquímicas sobre el polvo con Anisaldehído Sulfúrico.

### Análisis Fitoquímico

#### Preparación De Los Extractos

Tanto para la preparación de los extractos de *Centella asiatica* (L.) Urb. como de *Hydrocotyle bonariensis* L., se utilizó el material seco y molido de las partes aéreas (hojas, tallos y pecíolos).

Se realizaron ocho extractos, cuatro de cada planta, con las siguientes técnicas:

- a- **Extracción de saponinas:** A partir del método modificado de Wagner y Bladt (1996), se maceró por tres días, 2 g de la droga seca y fragmentada con 10 mL de etanol al 70%. El filtrado se evaporó a 5 mL y 20-40  $\mu$ L de esta solución se utilizaron para la Cromatografía en Capa Delgada (TLC).

Aproximadamente 3 mL del extracto anterior fue mezclado y agitado en una ampolla de decantación con 5 mL de n-butanol saturado con agua. La fase con n-butanol se separó y concentró a 1 mL; 20  $\mu$ L fueron utilizados para la TLC.

- b- **Extracción de triterpenos y otros compuestos no polares:** Se maceraron 2 g de la droga fragmentada y desecada con 10 mL de cloruro de metileno durante tres días. El filtrado se evaporó a 3 mL y 20  $\mu$ L fueron utilizados para la TLC.

- c- **Extracción de triterpenos, saponinas hidrolizadas y otros compuestos no polares:** Siguiendo el método modificado de Wagner y Bladt (1996), se tomaron 2g de la droga fragmentada y desecada y se la calentó bajo reflujo durante una hora con 30 mL de una solución 0,5 M de ácido sulfúrico. El filtrado fue mezclado dos veces con 20 mL de cloruro de metileno. El extracto combinado de cloruro de metileno fue deshidratado con sulfato de sodio anhidro, filtrado y llevado a sequedad.

El residuo se disolvió en 2 mL de una solución cloruro de metileno-metanol (1:1), y 10  $\mu$ L de esta solución se utilizaron para la observación de los aglicones de las saponinas, los triterpenos y otros compuestos no polares por TLC.

## Cromatografía en Capa Delgada (TLC)

Solución Muestra: Extracto etanólico, extracto butanólico (saponinas semipurificadas), extracto de cloruro de metileno (triterpenos libres) y extracto hidrolizado de saponinas de *Centella asiatica* (L.) Urb. e *Hydrocotyle bonariensis* L..

### Preparación de las Soluciones Estándares:

Se preparó una solución estándar que contenía 3,0 mg/mL de ácido ursólico y 2,0 mg/mL de ácido oleanólico en metanol (Tian et al., 2010).

### Sistema Cromatográfico para Saponinas:

Extractos Utilizados: Extractos etanólicos y butanólicos de *Centella asiatica* (L.) Urb. e *Hydrocotyle bonariensis* L..

Fase Estacionaria: Cromatofolios Silicagel Merk HF 254 (250 mm).

Fase Móvil: cloroformo-ácido acético glacial-metanol-agua (60:32:12:8).

Desarrollo: Hasta una distancia de 10 cm.

Revelado: Una vez retirada la placa de la cámara, se marcó el frente del solvente y se la dejó secar al aire y se la observó bajo la luz UV-254 nm. A continuación se roció el reactivo anisaldehído-ácido sulfúrico y se calentó la placa a 100 °C durante 5 a 10 minutos. Luego se examinó la placa al visible.

### Sistema Cromatográfico para Triterpenos y Otros Compuestos No Polares:

Extractos Utilizados: Extractos hidrolizados y sin hidrolizar de cloruro de metileno de *Centella asiatica* (L.) Urb. e *Hydrocotyle bonariensis* L..

Estándar Utilizado: Solución estándar de ácido ursólico y oleanólico.

Fase Estacionaria: Cromatofolios Silicagel Merk HF 254 (250 mm).

Fase Móvil: tolueno-acetato de etilo (9:1).

Desarrollo: Hasta una distancia de 10 cm.

Revelado: Se utilizó el mismo procedimiento señalado en el sistema anterior.

## 5.Resultados

### Hoja

En vista superficial (Fig. 10) se observaron: epidermis con células de bordes rectos, siendo la superior más estriada. En ambas se apreciaron estomas paracíticos.

*Epidermis superior*



*Epidermis inferior*

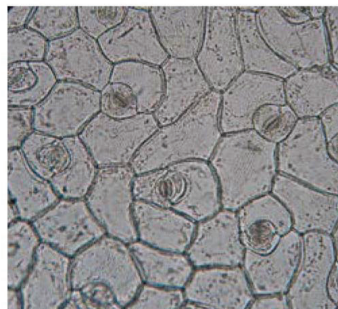


Figura 10. Vista superficial de estomas en Epidermis de *Hydrocotyle bonariensis* L.

El Índice de estomas para la epidermis superior dio un valor promedio de 14, mientras que para la inferior dio 20; siendo el promedio igual a 17. También se observaron tricomas glandulares unicelulares.

Los transcortes de hojas (Fig.11 y 12) mostraron una estructura bifasial y se apreció una hipodermis por debajo de la epidermis superior. Cabe destacar la presencia de varios canales secretores.

El Índice de empalizada dio un valor promedio de 3,50.

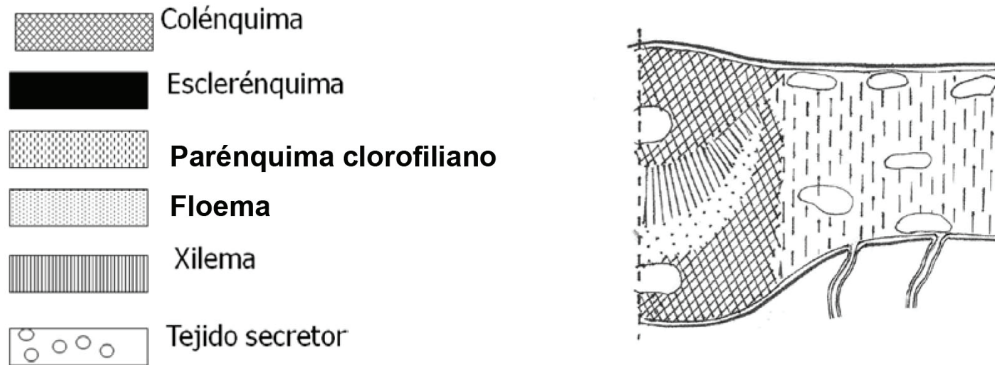


Figura 11. Corte transversal de hoja de *Hydrocotyle bonariensis* L. 40x (Simbología Metcalfe y Chalk).

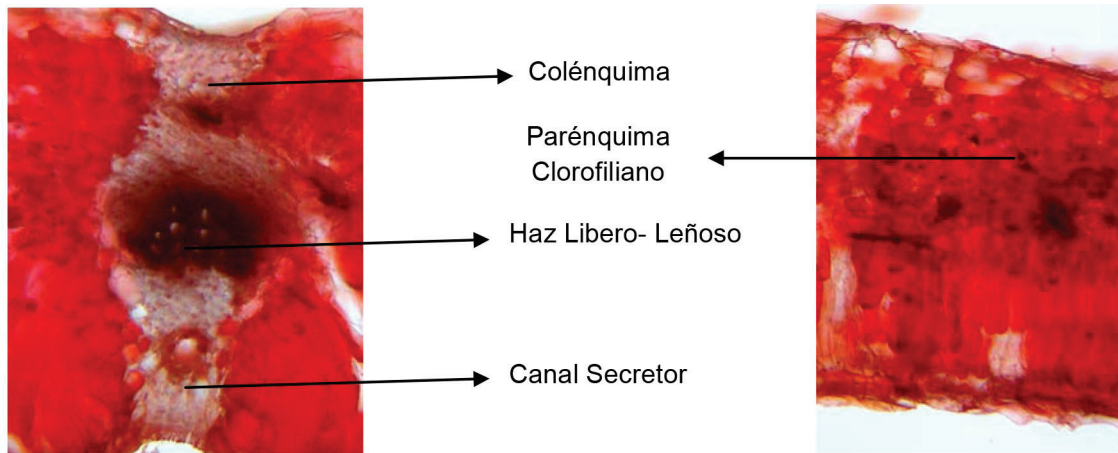


Figura 12. Hoja: Canal secretor y haz Libero-Leñoso, mesófilo

### Tallo y Pecíolo

El tallo (Fig. 13) presentó haces Libero-leñosos de estructura biclateral y se detectaron abundantes canales secretores.

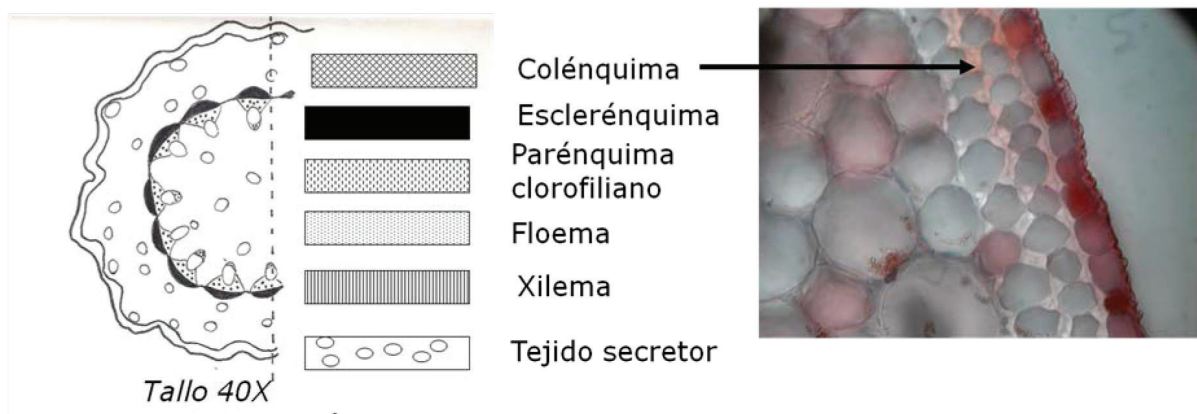


Figura 13. Corte transversal de tallo de *Hydrocotyle bonariensis* L. 40x (Simbología Metcalfe y Chalk) y detalle del microscopio óptico.



El peciolo no presento médula, poseía más de siete haces libero-leñosos y abundantes canales secretores.

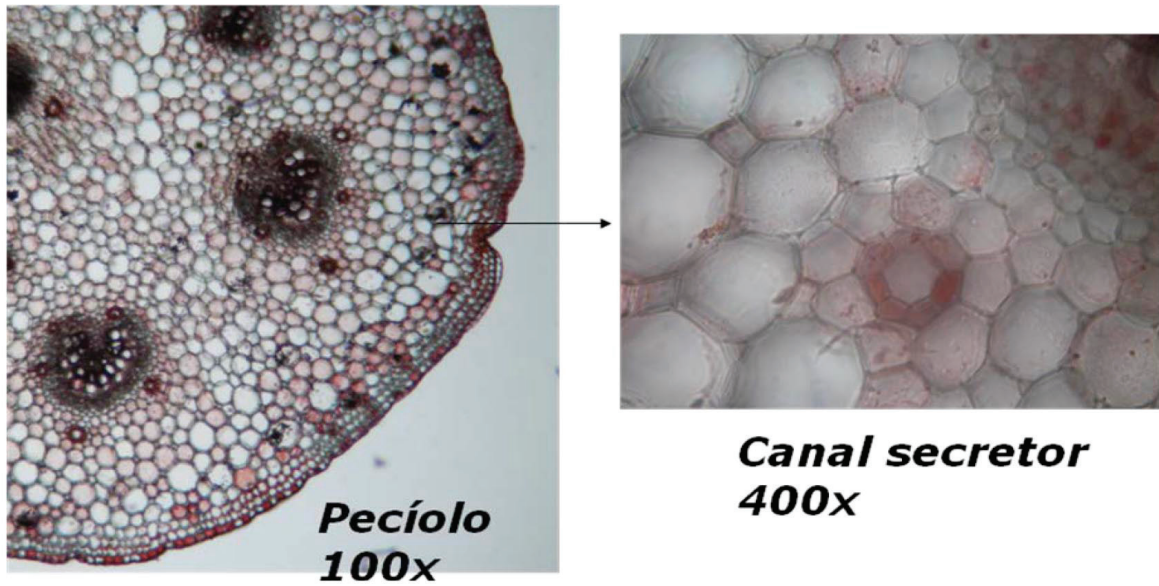


Figura 14. Corte transverso del peciolo de *Hydrocotyle bonariensis* L. 100x y un canal secretor 400x.

### Fruto

El fruto (Fig. 15), fuertemente comprimido lateralmente, poseía mericarpo glabro y canales incóspicuos y rudimentarios.

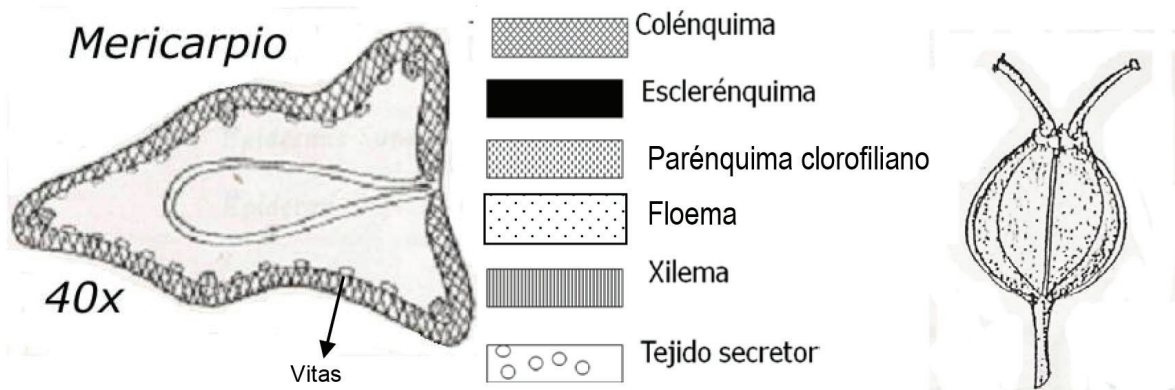


Figura 15. Corte transverso de fruto de *Hydrocotyle bonariensis* L. 40x (Simbología Metcalfe y Chalk) y vista externa a 25x.

En su exterior pudieron apreciarse cinco costillas primarias, estando la dorsal notablemente más desarrollada que las laterales y éstas, a su vez, más que las medianas que aparecían simplemente arqueadas. Las vallecucas más profundas eran las comprendidas entre las costillas medianas y laterales. Cabe destacar que su cara comisural era plana.

### Droga en Polvo

*Hydrocotyle bonariensis* L. en polvo se observaron fragmentos de epidermis con células poligonales, estomas paracíticos, tricomas eglandulares largos y unicelulares; células parenquimatosas; fibras y fragmentos de nervadura con vasos leñosos anillados y reticulados.

### Análisis Fitoquímico

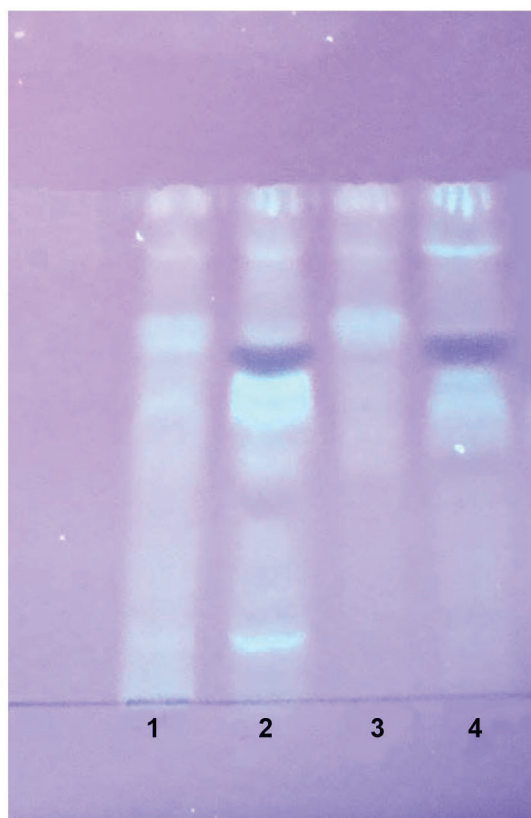
Los distintos extractos ensayados fueron comparados a través de distintos sistemas cromatográficos y revelados con luz UV-254 nm y anisaldehído sulfúrico. Obteniéndose así, un perfil característico para cada uno.

### Sistema Cromatográfico para Saponinas

Fase Móvil: cloroformo-ácido acético glacial-metanol-agua (60:32:12:8).

Fase Estacionaria: Cromatofolios Silicagel Merk HF 254 (250 mm).

Revelado: Uv 254 nm



#### Referencias

- 1: Extracto Etanólico de *Centella asiatica* (L.) Urb.
- 2: Extracto Etanólico de *Hydrocotyle bonariensis* L.
- 3: Extracto Butanólico de *Centella asiatica* (L.) Urb.
- 4: Extracto Butanólico de *Hydrocotyle bonariensis* L.

Figura 16. TLC del sistema para saponinas revelado con luz Uv 254 nm.

Extracto Etanólico de <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.		Extracto Etanólico de <i>Hydrocotyle bonariensis</i> L.		Extracto Butanólico de <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.		Extracto Butanólico de <i>Hydrocotyle bonariensis</i> L.	
R <sub>f</sub>	Color	R <sub>f</sub>	Color	R <sub>f</sub>	Color	R <sub>f</sub>	Color
0,12	Celeste	0,11	Celeste	0,75	Celeste	0,57	Celeste
0,57	Celeste	0,46	Celeste	0,87	Rojo	0,62	Celeste
0,71	Celeste	0,57	Celeste	1	Rojo	0,67	Azul oscuro
0,75	Celeste	0,62	Celeste			0,87	Celeste
0,87	Rojo	0,67	Azul oscuro			1	Celeste
1	Rojo	0,71	Celeste				
		0,87	Celeste				
		1	Celeste				

Tabla 1. R<sub>f</sub> y colores de las bandas de la TLC para saponinas revelada con luz Uv 254 nm.

Revelado: Anisaldehído sulfúrico al visible



#### Referencias

1: Extracto Etanólico de *Centella asiatica* (L.) Urb.

2: Extracto Etanólico de *Hydrocotyle bonariensis* L.

3: Extracto Butanólico de *Centella asiatica* (L.) Urb.

4: Extracto Butanólico de *Hydrocotyle bonariensis* L.

Figura 17. TLC del sistema para saponinas revelado con anisaldehído sulfúrico.

Extracto Etanólico de <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.		Extracto Etanólico de <i>Hydrocotyle bonariensis</i> L.		Extracto Butanólico de <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.		Extracto Butanólico de <i>Hydrocotyle bonariensis</i> L.	
R <sub>f</sub>	Color	R <sub>f</sub>	Color	R <sub>f</sub>	Color	R <sub>f</sub>	Color
0	Marrón claro	0	Marrón oscuro	0,1	Gris	0,28	Gris claro
0,03	Gris claro	0,18	Gris claro	0,25	Gris claro	0,46	Gris
0,1	Gris oscuro	0,25	Gris	0,28	Gris claro	0,63	Marrón claro
0,18	Gris claro	0,32	Gris oscuro	0,41	Gris oscuro	1	Gris oscuro
0,28	Gris	0,37	Gris oscuro	0,46	Gris		
0,41	Gris oscuro	0,41	Gris oscuro	0,55	Azul		
0,46	Gris oscuro	0,46	Gris oscuro	0,7	Gris claro		
0,55	Azul	0,56	Marrón claro	0,95	Azul		
0,7	Azul	0,63	Marrón	1 claro	Gris	oscuro	
0,95	Azul	0,95	Azul				
1	Gris oscuro	1	Gris oscuro				

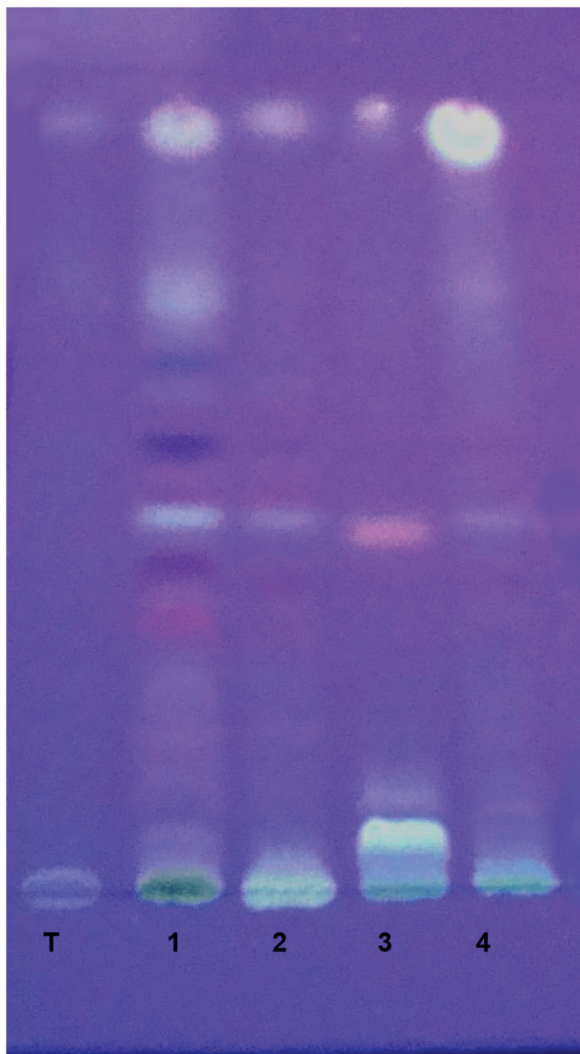
Tabla 2. R<sub>f</sub> y colores de las bandas de la TLC para saponinas revelada con anisaldehído sulfúrico.

### Sistema Cromatográfico para Triterpenos y Otros Compuestos No Polares

Fase Movil: Tolueno-Acetato de Etilo (9:1)

Fase Estacionaria: Cromatofolios Silicagel Merk HF 254 (250 mm).

Revelado: Uv 254 nm



#### Referencias

**T:** Solución Estándar de Ácido Ursólico y Oleanólico

**1:** Extracto de Cloruro de Metileno de *Centella asiatica* (L.) Urb.

**2:** Extracto de Cloruro de Metileno de *Hydrocotyle bonariensis* L.

**3:** Extracto Hidrolizado de *Centella asiatica* (L.) Urb.en Cloruro de Metileno

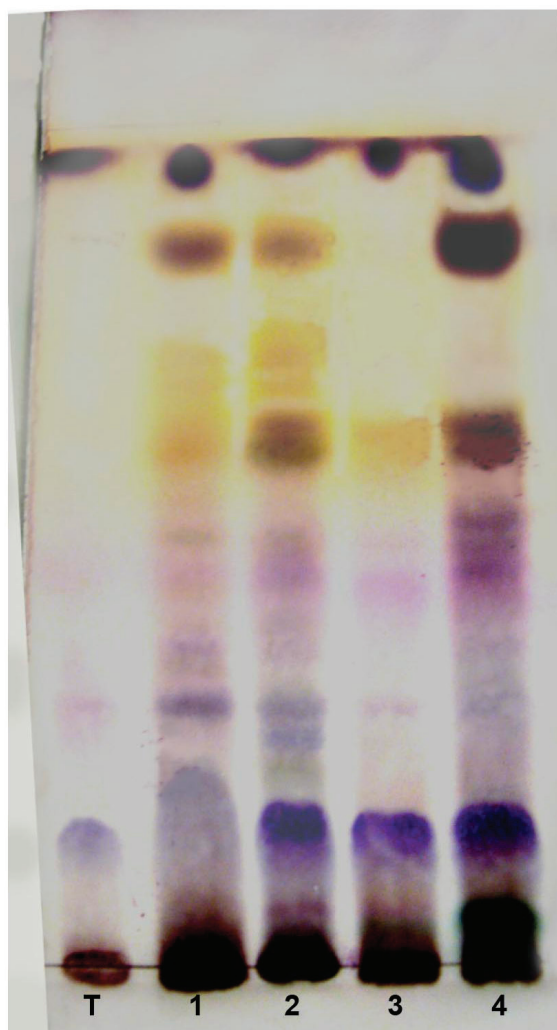
**4:** Extracto Hidrolizado de *Hydrocotyle bonariensis* L. en Cloruro de Metileno

Figura 18. TLC del sistema para triterpenos y otros compuestos no polares revelado con luz Uv 254 nm.

Testigo		Extracto de Cloruro de Metileno de <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.		Extracto de Cloruro de Metileno de <i>Hydrocotyle bonariensis</i> L.		Extracto Hidrolizado de <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb. en Cloruro de Metileno		Extracto Hidrolizado de <i>Hydrocotyle bonariensis</i> L. en Cloruro de Metileno	
R <sub>f</sub>	Color	R <sub>f</sub>	Color	R <sub>f</sub>	Color	R <sub>f</sub>	Color	R <sub>f</sub>	Color
0	Blanco	0	Verde oscuro	0	Verde	0	Verde oscuro	0	Verde oscuro
1	Blanco	0,35	Rojo	0,4	Marrón	0,07	Celeste	0,47	Celeste
		0,42	Marrón	0,47	Celeste	0,13	Blanco	1	Blanco
		0,47	Celeste	0,50	Rojo	0,46	Rosa		
		0,50	Rojo	0,57	Marrón	1	Blanco		
		0,57	Marrón oscuro	1	Blanco				
		0,59	Rojo						
		0,67	Azul						
		0,76	Blanco						
		1	Blanco						

Tabla 3. R<sub>f</sub> y colores de las bandas de la TLC para triterpenos y otros compuestos no polares revelada con luz UV-254 nm.

Revelado: Anisaldehído sulfúrico al visible



#### Referencias

**T:** Solución Estándar de Ácido Ursólico y Oleanólico

**1:** Extracto de Cloruro de Metileno de *Centella asiatica* (L.) Urb.

**2:** Extracto de Cloruro de Metileno de *Hydrocotyle bonariensis* L.

**3:** Extracto Hidrolizado de *Centella asiatica* (L.) Urb.en Cloruro de Metileno

**4:** Extracto Hidrolizado de *Hydrocotyle bonariensis* L. en Cloruro de Metileno

Figura 19. TLC del sistema para triterpenos y otros compuestos no polares revelado con anisaldehído sulfúrico.

Testigo		Extracto de Cloruro de Metileno de <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.		Extracto de Cloruro de Metileno de <i>Hydrocotyle bonariensis</i> L.		Extracto Hidrolizado de <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb. en Cloruro de Metileno		Extracto Hidrolizado de <i>Hydrocotyle bonariensis</i> L. en Cloruro de Metileno	
R <sub>f</sub>	Color	R <sub>f</sub>	Color	R <sub>f</sub>	Color	R <sub>f</sub>	Color	R <sub>f</sub>	Color
0	Marrón oscuro	0	Marrón oscuro	0	Marrón oscuro	0	Marrón oscuro	0	Marrón oscuro
0,17	Violeta oscuro	0,22	Gris claro	0,06	Marrón oscuro	0,06	Marrón oscuro	0,06	Marrón oscuro
0,32	Lila	0,31	Violeta	0,17	Violeta oscuro	0,17	Violeta oscuro	0,17	Violeta oscuro
1	Marrón oscuro	0,38	Lila	0,25	Gris claro	0,31	Lila	0,31	Violeta
		0,47	Lila	0,27	Azul	0,47	Lila	0,47	Lila
		0,51	Marrón claro	0,32	Violeta	0,51	Marrón claro	0,51	Lila
		0,63	Amarillo	0,39	Lila	0,63	Amarillo	0,53	Lila
		0,72	Amarillo	0,41	Lila	1	Marrón oscuro	0,63	Marrón oscuro
		0,88	Marrón	0,49	Lila			0,88	Marrón oscuro
		1	Marrón oscuro	0,51	Lila			1	Marrón oscuro
				0,62	Marrón				
				0,65	Marrón				
				0,70	Amarillo				
				0,74	Amarillo				
				0,88	Marrón				
				1	Marrón oscuro				

 Tabla 4. R<sub>f</sub> y colores de las bandas de la TLC para triterpenos y otros compuestos no polares revelada con anisaldehído sulfúrico.



## 6. Discusión

### Análisis Botánico

#### Diferencias Macroscópicas

La hoja de *C. asiatica* (L.) Urb. presentó forma orbicular, mientras que la de *H. bonariensis* L. es redonda.

En cuanto al fruto, *Centella asiatica* presentó 7 costillas e *Hydrocotyle bonariensis*, 5.

#### Diferencias Microscópicas

Hoja:

La hoja, *Centella asiatica* (L.) Urb. presentó estomas paracíticos y anisocíticos, cristales de oxalato de calcio (drusas), vasos anillados, tricomas eglandulares pluricelulares; mientras que *Hydrocotyle bonariensis* L., estomas paracíticos, vasos anillados y reticulados, tricomas eglandulares unicelulares y ausencia de cristales de oxalato de calcio.

Valores Cuantitativos de Hoja:

Índice de Estomas:

*Centella asiatica* (L.) Urb.: 8,0 – **8,6** – 9,2      *Hydrocotyle bonariensis* L.: 12 – **17** – 22

Índice de Empalizada:

*Centella asiatica* (L.) Urb.: 2 – **4** – 6      *Hydrocotyle bonariensis* L.: 3 – 3,5 – 4

Pecíolo:

*Centella asiatica* (L.) Urb. presentó médula y un número de haces vasculares igual a siete e *Hydrocotyle bonariensis* L., no poseía médula y sus haces vasculares eran mayores a siete.

### Análisis Fitoquímico

#### Sistema Cromatográfico para Saponinas

Revelado al Uv 254 nm (Fig. 16)

Se pudo apreciar que los extractos etanólicos sólo tenían en común las bandas correspondientes a los  $R_f$  iguales a 0,57 y 0,71 (las bandas en 0,87 se excluyeron por ser de distinto color). La banda de  $R_f$  igual a 0,67 en los extractos de *Hydrocotyle bonariensis* L. fue muy característica, permitiendo así una fácil diferenciación de los de *Centella asiatica* (L.) Urb.. Otras bandas que permitieron la diferenciación de *Hydrocotyle bonariensis* L. de *Centella asiatica* (L.) Urb., fueron las bandas de  $R_f$  0,11; 0,46 y 0,62 de los extractos etanólicos, únicamente presentes en el perfil de la primera, y la ausencia de una banda celeste a 0,75, presente en el perfil de la segunda.

En los extractos butanólicos, prácticamente se mantuvieron los mismos perfiles con respecto a sus equivalentes etanólicos a excepción de los  $R_f$  de menor valor, los cuales estaban ausentes.

Revelado con Anisaldehído Sulfúrico (Fig. 17)

En el caso de los extractos etanólicos de *Centella asiatica* (L.) Urb. (1) e *Hydrocotyle bonariensis* L. (2), se pudieron apreciar bandas comunes en ambos perfiles y otras que los diferenciaba. Ambos perfiles presentaban las correspondientes a los  $R_f$  0,18; 0,41; 0,46 y 0,95. Siendo el resto de los  $R_f$  indicados en la Tabla 1, distintos. Cabe destacar a las bandas con  $R_f$  iguales a 0,1; 0,55 y 0,7 del extracto 1 como

diferenciales de *Centella asiatica* (L.) Urb. y a las de  $R_f$  iguales a 0,25; 0,32; 0,37; 0,56 y 0,63 del extracto 2 como diferenciales de *Hydrocotyle bonariensis* L..

En lo referente a los extractos butanólicos de *Centella asiatica* (L.) Urb. (3) e *Hydrocotyle bonariensis* L. (4), las bandas gris oscuro ( $R_f = 0,41$ ) y azul ( $R_f = 0,55$ ) del extracto 3 eran exclusivas de *C. asiatica* (L.) Urb., mientras que la banda marrón claro ( $R_f = 0,63$ ) del extracto 4, era propia de *Hydrocotyle bonariensis* L..

Al comparar los extractos butanólicos con sus respectivos extractos etanólicos, se observó que, en el caso de *Hydrocotyle bonariensis* L. se mantuvieron las bandas marrones ( $R_f = 0,63$  y  $0,46$ ), perteneciendo éstas muy probablemente a las saponinas de la misma. Mientras que en el caso de *Centella asiatica* (L.) Urb., las bandas que más se destacaron y mantuvieron fueron las bandas con los  $R_f$  iguales a  $0,41$ ;  $0,46$  y  $0,55$ , las cuales también, muy probablemente correspondían a las saponinas propias de esta planta.

### Sistema Cromatográfico para Triterpenos y Otros Compuestos No Polares

Revelado al Uv 254 nm (Fig. 18)

A la luz ultravioleta no se observó la banda correspondiente a la solución estándar de los ácidos ursólico y oleanólico dado que éstos absorben a 210 nm (Tian et al., 2010).

Al comparar los perfiles de los extractos sin hidrolizar, se apreciaron las marcadas diferencias entre ambos. Se pueden citar las bandas roja, marrón, azul y blanca correspondientes a los  $R_f$   $0,35$ ;  $0,42$ ;  $0,67$  y  $0,76$ ; sólo presentes en *C. asiatica* (L.) Urb. (1). Mientras que en *H. bonariensis* L. (2) no se apreciaron bandas que sean exclusivas de este extracto, sino más bien comunes al de *C. asiatica* (L.) Urb. (1).

En el caso de los extractos hidrolizados, en ambos casos se observó un menor número de bandas, destacándose de manera diferencial las de  $R_f$  igual a  $0,07$ ;  $0,13$  y  $0,46$  de color celeste, blanco y rosa respectivamente, en el extracto de *C. asiatica* (L.) Urb. (3), y  $0,47$  de color celeste en el de *H. bonariensis* L. (4). Ésto permitiría una diferenciación más sencilla entre ambos extractos que en el caso anterior, donde se comparaban ambos extractos sin hidrolizar. Además se evitaría la necesidad de recurrir al anisaldehído sulfúrico para revelar la placa.

Revelado con Anisaldehído Sulfúrico (Fig. 19)

Pudo observarse que la solución estándar de ácido ursólico y oleanólico corrió hasta un  $R_f$  igual a  $0,17$ .

Refiriéndose a los extractos, se observó un perfil mucho más complejo que en la TLC anterior. A excepción del extracto de cloruro de metileno de *Centella asiatica* (L.) Urb. (1), todos los demás presentaron una banda violeta oscuro a un  $R_f$  igual a  $0,17$ . Ésto confirmaría la presencia de ácido ursólico y oleanólico como tal en *Hydrocotyle bonariensis* L. y, posiblemente, formando parte de alguna de las saponinas u otra de las estructuras triterpénicas.

En el caso del extracto hidrolizado de *Centella asiatica* (L.) Urb. (3), la razón por la que se apreció esa banda a ese  $R_f$  pudo ser porque, a partir de la hidrólisis de alguno de sus componentes, se obtuvo ácido oleanólico y/o ursólico.

A partir de lo analizado anteriormente, puede afirmarse que *C. asiatica* L. no posee cantidades significativas de ácido ursólico y/u oleanólico como tal, sino que como parte de uno de sus componentes, y que *H. bonariensis* L. posee ácido ursólico y/u oleanólico libre y posiblemente formando parte de otros componentes (para esto último sería necesario cuantificar).

Volviendo a la comparación entre los perfiles cromatográficos, para los extractos de cloruro de metileno sin hidrolizar las bandas que más se destacaron fueron, la ya mencionada a  $R_f$  igual a  $0,17$ , la banda azul a  $0,27$ , y las bandas marrones a  $0,62$  y  $0,65$  presentes sólo en *H. bonariensis* L. (2), mientras que en *C. asiatica* (L.) Urb. (1) sólo estuvieron presentes las banda amarilla de  $R_f$  igual a  $0,63$ .

Al comparar los perfiles de los extractos hidrolizados, sólo se apreciaron tres diferencias, la presencia de una banda marrón a un  $R_f$  igual a 0,88 y una lila a 0,53 solamente en el extracto de *H. bonariensis* L. (4). Mientras que en el extracto de *C. asiatica* (L.) Urb. (3), la banda al  $R_f$  igual a 0,63 era amarilla.

Se pudo observar la conservación, la desaparición y la concentración de algunas bandas, además de lo referido a la banda de  $R_f=0,17$ . Esto último ocurrió de manera notable en el caso del extracto hidrolizado de *H. bonariensis* L. (4), en las bandas de  $R_f$  igual a 0,63 y 0,88. Por lo que varios de los componentes que se hidrolizaron, se transformaron en otros que ya se encontraban como tales en la planta. Sería interesante en un trabajo posterior la identificación y cuantificación de dichos componentes y evaluar su utilidad, si la tuviesen.

## 7. Conclusiones

Dado los caracteres macroscópicos y microscópicos enunciados en el Cuadro 4, se diferencian las dos especies, ya sean enteras, fragmentadas o pulverizadas.

Diferencias	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	<i>Hydrocotyle bonariensis</i> L.
<b>Macroscópicas</b>		
<b>Hoja</b>	Orbicular	Redonda
<b>Fruto: Número de Costillas</b>	7	5
<b>Microscópicas</b>		
<b>Índice de Estomas</b>	8.0- <u>8,6</u> -9.2	12- <u>17</u> -22
<b>Índice de Empalizada</b>	2- <u>4</u> -6	3- <u>3,50</u> -4
<b>Tricomas</b>	Eglandulares Pluricelulares	Eglandulares Unicelulares
<b>Estomas</b>	Paracíticos y algunos Anisocíticos	Sólo Paracíticos
<b>Cristales</b>	Drusas de Oxalato de Calcio	No se observan
<b>Vasos Leñosos</b>	Anillados	Anillados y Reticulados

Cuadro 4. Diferencias Macro y Microscópicas entre *Centella asiatica* (L.) Urb. e *Hydrocotyle bonariensis* (L.).

Las cromatografías en capa delgada (TLC) de los diversos extractos de *Hydrocotyle bonariensis* L. y *Centella asiatica* (L.) Urb., permitieron la obtención de un perfil característico de la primera y su diferenciación con el de la segunda. Así mismo, se destaca la alta probabilidad de que *Hydrocotyle bonariensis* L. contenga ácido oleanólico y/o ursólico, lo que permitiría su uso como materia prima para la obtención de éstos.

Los resultados obtenidos facilitarán el control de calidad de ambas especies además de proveer elementos botánicos y características fitoquímicas anteriormente no descritos para *H. bonariensis* L..

Un estudio más exhaustivo de los componentes fitoquímicos de *H. bonariensis* L. (identificación, cuantificación, ensayos de actividad, etc.) nos permitiría aprovechar de manera eficiente esta especie cuya importancia terapéutica y económica es ignorada y que, por sus usos tradicionales, podría ser considerada como la "Centella Americana".

## 8. Bibliografía

- Albrecht, R. A., Bassols, G. y Gurni, A. A. (2005). Aplicación de Parámetros Cuantitativos en el Estudio de *Aloysia citrodora Palau* (Verbenaceae). *Acta Farm. Bonaerense*, 24(2), 239-241.
- Alfa Beta. (s.f.). *Centella asiatica* (L.) Urb. Recuperado el 8 de junio de 2013, de <http://web.alfabeta.net/>
- Alonso, M. J. (2009). Centella asiática: una planta con historia e interesantes propiedades. *Offarm*, 28(5), 98-104.
- Alvarez, M., Ramirez, C. y Deil, U. (2008). Ecología y Distribución De *Hydrocotyle cryptocarpa* sp. en Sudamérica. *Gayana Bot.*, 65(2), 139-144.
- Assessment report on Centella asiatica (L.) Urban, herba. (2010). European Medicines Agency [EMA]. Recuperado el 7 de agosto de 2013 de [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-\\_HMPC\\_assessment\\_report/2012/06/WC500128144.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2012/06/WC500128144.pdf)
- Bauer Petrovska, B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev.* 6(11), 1-5.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. Zaragoza: Editorial ACRIBIA S. A.
- Carpano, S., Stella, M., Spegazzini, E., Najera, M. (1994). Nueva técnica de eliminación de cutina en órganos foliares. *Rojasiana*, 2(1), 9-12.
- Clyna S.A. (2013). *Revista K@iros. Revista de ciencia y tecnología para la farmacia del Siglo XXI* (Vol. 418). Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Clyna S.A.
- Díaz Pita, M. P. (2011). *Revisión Taxonómica del género Hydrocotyle L. (Apiaceae) para Colombia*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.
- Disposición N° 6061/10. (2010). Argentina, Ministerio de Salud de La Nación. Recuperado el 29 de Julio de 2013 de [http://www.anmat.gov.ar/boletin\\_anmat/octubre\\_2010/Dispo\\_6061-10.pdf](http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/octubre_2010/Dispo_6061-10.pdf)
- Especialidades Medicinales (Res. 144/98, 1998, 9 de Marzo). *Boletín Oficial de La República Argentina*, 1998, 6 de Mayo.
- Farmacopea Argentina (8ª ed.). (s.f.). Argentina, Ministerio de Salud de La Nación. Recuperado de [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/octava\\_edicion/Tercer\\_Volumen.pdf](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/octava_edicion/Tercer_Volumen.pdf)
- Huanga, Q., Huangb, R., Zhangb, S., Linb, J., Weib, L., Heb, M. et al. (2013). Protective effect of genistein isolated from *Hydrocotyle sibthorpioides* on hepatic injury and fibrosis induced by chronic alcohol in rats. *Toxicology Letters*, 217(2), 102-110.
- Kumarappan, C., Jaswanth, A. y Kumarasunderi, K. (2011). Antihemolytic and snake venom neutralizing effect of some Indian medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(9), 743-747.
- Kunkel, S. D., Suneja, M., Ebert, S. M., Malmberg, S. E., Alipour, F., Shields, R. K. et al. (2011). mRNA Expression Signatures of Human Skeletal Muscle Atrophy Identify a Natural Compound that Increases Muscle Mass. *Cell Metabolism* 13(6), 627-638.
- Liobikas, J., Majiene, D., Masteikova, R., Kopustinskiene, D. M., Savickas, A., Bernatoniene, J. et al. (2011). Uncoupling and antioxidant effects of ursolic acid in isolated rat heart mitochondria. *J Nat Prod.* 74(7), 1640-1644.
- Liu, J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 49(2), 57-68.
- Lucena, I. D., Novara, L. J. y Cuezco, A. R. (2001), Apiaceae Lindl. En Herbario MCNS. *Flora del Valle de Lerma* (vol. 6, cap. 10, pp. 21-28). Buenos Aires: Universidad Nacional de Salta.

Ma, C. M., Cai S. Q., Wang, R. Q., Tu, P. F., Hattori, M. Daneshtalab, M. et al. (2005). The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. *Eur. J. Med. Chem* 40(6), 582–589.

Mengoni, F., Lichtner, M., Battinelli, L., Marzi, M., Vullo, V., Mazzanti, G. et al. (2002). In vitro anti-HIV activity of oleanolic acid on infected human mononuclear cells. *Planta medica* 68(2), 111–114.

Merk Research Laboratories, (2001). *The Merk Index* (13 ed.). Whitehouse Station, New Jersey, USA: Merk & Co. Inc.

Metcalfe, C.R. y Chalk, L. (1957). *Anatomy of dicotyledons*. Londres: Oxford at the Clarendon Press.

Ouviña, A., Gorzalczany, S., Acevedo, C. y Ferraro, G. (2009). Actividad Antiinflamatoria Tópica de Extractos de *Hydrocotyle bonariensis* L. Lam. (Apiaceae). *Lat. Am. J. Pharm.* 28 (6), 941-944.

Pergola, F. M. (2009). *Historias de Medicamentos*. Buenos Aires: J.C. Toer & Asociados.

Ramos, F., Takashi, Y., Sato, M., Okamoto, M., Oshikawa, T., Ahmed SU. et al., (2006). Immunosuppressive diacetylenes, ceramides and cerebrosides from *Hydrocotyle leucocephala*. *Phytochemistry*, 67(11), 1143-1150.

Rocha, F. F., Almeida, C. S., Santos, R. T. dos, Santana, S. A., Costa, E. A., Paula, J. R. de et al. (2011). Anxiolytic-like and sedative effects of *Hydrocotyle umbellata* L., Araliaceae, extract in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(1), 115-120.

Silva, C. B. da, Simionatto, E., Hess, S. C., Peres, M. T. L. P., Simionatto, E. L., Júnior, A. W. et al. (2009). Composição química e atividade alelopática do óleo volátil de *Hydrocotyle bonariensis* Lam (Araliaceae). *Quim. Nova*, 32(9), 2373-2376.

Tabopda, T. K., Mitaine-Offer, A. C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Mirjolet, J. F., Duchamp, O., et al. (2012). Triterpenoid saponins from *Hydrocotyle bonariensis* L. Lam. *Phytochemistry*, 73(2012), 142-147.

Tian, S., Shi, Y., Yu, Q., Upur, H. (2010). Determination of oleanolic acid and ursolic acid contents in *Ziziphora clinopodioides* Lam. by HPLC method. *Phcog Mag* 2010(6), 116-119.

UN COMTRADE (s.f.). *Data Query: Plants and parts of plants (including seeds and fruits), of a kind used primarily in perfumery, in pharmacy or for insecticidal, fungicidal or similar purposes, fresh or dried, whether or not cut, crushed or powdered*. Recuperado el 17 de marzo de 2013, de <http://comtrade.un.org/>

Vivot, E. P., Sánchez, C., Cacik, F. y Sequin, C. (2012). Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia, Docencia y Tecnología* 23(45), 165-185.

Wagner, H y Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* (2a ed.). Alemania: Springer.

World Health Organization [WHO]. (1999). (vols. 1-4) *WHO monographs on selected medicinal plants*. Ginebra: WHO Library Cataloguing in Publication Data.

Yu, F., Wang, Q., Zhang, Z., Peng, Y., Shi, Y., Zheng, Y., Xiao, S. et al. (2013). Development of Oleanane-Type Triterpenes as a New Class of HCV Entry Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 56(11), 4300-4319.

Yu, F., Yu, F., McGuire, P. M., Li, R. y Wang, R. (2007). Effects of *Hydrocotyle sibthorpioides* extract on transplanted tumors and immune function in mice. *Phytomedicine*, 14(2-3), 166-171.

Zuloaga, F. & Morrone, O. (1999). Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina. II. Dicotyledoneae (Acanthaceae-Euphorbiaceae) y (Fabaceae-Zygophyllaceae). Missouri Bot. Garden. St. Louis.

