

¿Qué tilo consumimos?

Control de calidad macroscópico e identificación botánica de especies de *Tilia spp* comercializadas en Uruguay



Farmacoognosia - UdelaR



Dra. Natalia Besil

Departamento de Química del Litoral

CENUR Litoral Norte

Universidad de la República



CONTENIDO

01

Introducción y planteo del problema

02

Objetivos

03

Diseño experimental y Resultados

04

Conclusiones

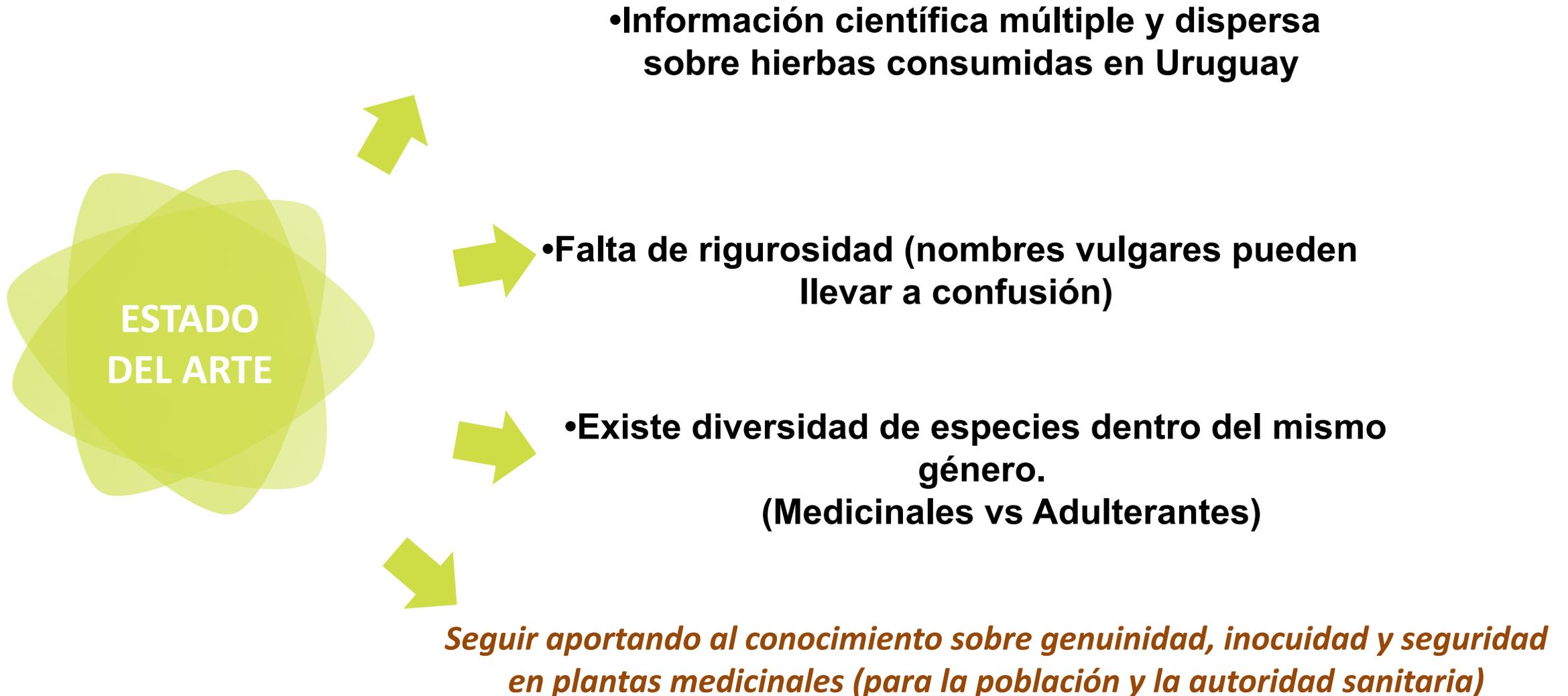




Introducción y planteo del problema



Uso seguro de hierbas medicinales en Uruguay: aseguramiento de la genuinidad y calidad



INTRODUCCIÓN

Métodos Generales de Farmacognosia

HIERBA INOCUA, EFICAZ
Y SEGURA

1. Muestreo
2. Examen visual e inspección macroscópica de las drogas vegetales.
3. Identificación y cuantificación de metabolitos (reacciones químicas de identificación, ensayos específicos e identificación cromatográfica).
4. Cuantificación.
5. Determinación de materia extraña.
6. Determinación de agua en drogas vegetales.
7. Determinación de cenizas
8. Determinación de aceites esenciales.
9. Determinación de aceites fijos.
10. Análisis Microbiológico
11. Residuos de Pesticidas.
12.



DETERMINACIÓN DE MATERIA EXTRAÑA

Se considera materia extraña a cualquier parte de la droga vegetal que no esté comprendida en la definición o en la descripción de la monografía correspondiente.



Hongos
Insectos
Contaminaciones de origen animal.

$\leq 2\%$ m/m

Obtener por cuarteo:

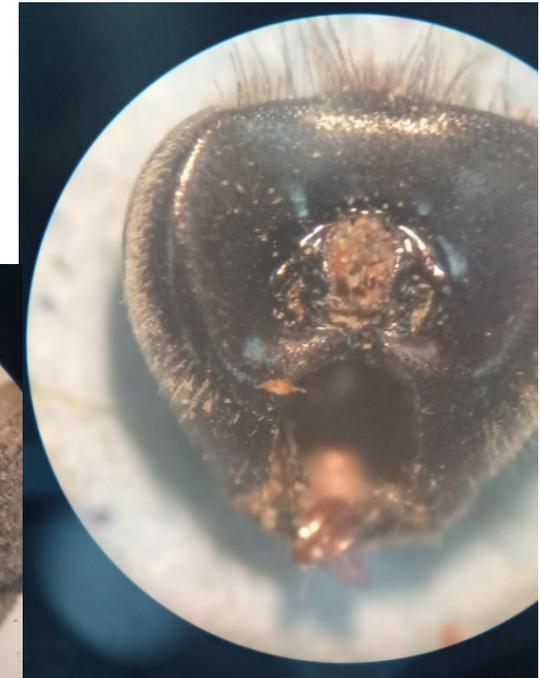
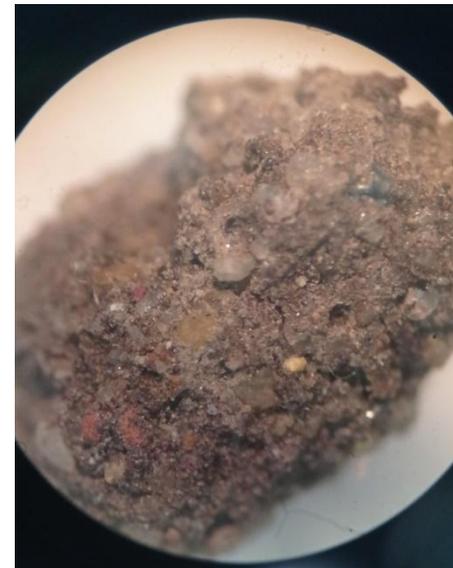
Raíces, rizomas, cortezas, planta entera y partes aéreas: 500 g;

Hojas, flores, frutos y semillas: 250 g;

Drogas vegetales en fragmentos de 0,5 g o menores: 50 g;

Polvos: 25 g

Extender la muestra en una capa delgada y sobre una superficie plana. Separar manualmente la materia extraña a la droga, inicialmente a ojo desnudo y, luego, con auxilio de una lente de aumento (cinco a diez veces). Pesar el material separado.





INTRODUCCIÓN

Decreto N° 403/016

Marco Regulatorio para Hierbas Medicinales, Especialidades Vegetales y Medicamentos Fitoterápicos.

a- **HIERBA MEDICINAL.** **Planta entera o alguna de sus partes con acción farmacológica**, no pulverizada(s) ni molida(s), que puede estar cortada en tamaño tal que permita la identificación macroscópica, y que no se encuentra incluida en el Anexo I (Listado de hierbas cuya comercialización como hierba medicinal se encuentra prohibida).

b- **DROGA VEGETAL.** **Plantas o sus partes, enteras, molidas o pulverizadas** (se incluyen también las talofitas, especialmente líquenes, algas, hongos o plantas superiores), así como ciertos exudados que no han sido sujetos a tratamientos específicos (resinas, gomas, látex, etc.) **las cuales son usadas para propósitos médicos o farmacéuticos**. Las drogas vegetales son consideradas como sustancias activas, se conozcan o no sus constituyentes con actividad terapéutica.

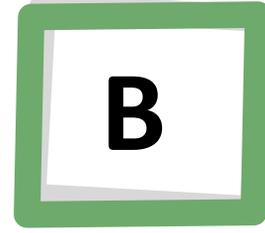
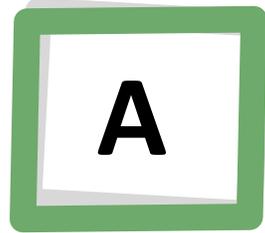
c- **MATERIA PRIMA VEGETAL CON ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA** **Droga vegetal y/o aceites fijos, aceites esenciales, extractos, tinturas o preparados y/o mezclas de las anteriores, empleada en la fabricación de Medicamentos Fitoterápicos.**

d-**ESPECIALIDAD VEGETAL.** Hierba medicinal individual o mezcla de hierbas medicinales en cualquier proporción, finamente cortadas así como Ilex paraguariensis (yerba mate) o Camelia sinensis (té) adicionada de hierbas medicinales. La proporción de hierbas medicinales debe estar claramente definida para cada especialidad vegetal.

Uso seguro de hierbas medicinales en Uruguay: aseguramiento de la genuinidad y calidad

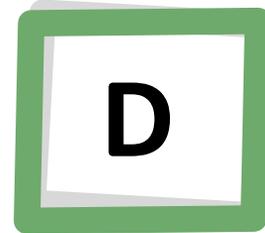
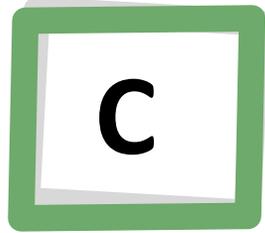
Desarrollar herramientas para garantizar el uso seguro de las hierbas medicinales utilizadas en Uruguay.

Relevamiento de datos de ventas de las hierbas medicinales consumidas por la población uruguaya



Control de calidad PRELIMINAR de las hierbas seleccionadas.

Búsqueda de fitomarcadores



Identificación Botánica

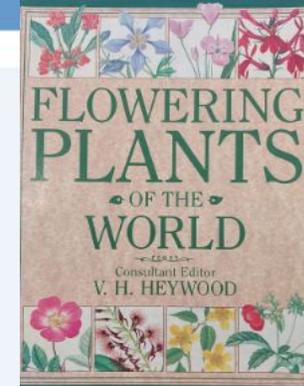
Género *Tilia* spp

Jerarquía taxonómica

Reino	Plantae - plantes, Planta, Vegetal, plantas
subreino	Viridiplantae - plantas verdes
Infreino	Streptophyta - plantas terrestres
Superdivisión	Embriofita
División	Tracheophyta - plantas vasculares, traqueofitas
Subdivisión	Spermatophytina - espermatofitos, plantas con semillas, fanérogames
Clase	Magnoliopsida
superorden	Rosanae
Pedido	Malvales
Familia	Malvaceae - malvas, malvas
Género	Tilia L. - tilo, tilo, tilo, tilleul

Hijos directos:

Especies	Tilia americana L. - tilo americano
Especies	Molino de Tilia cordata - tilo de hoja pequeña
Especies	Tilia X euchlora K. Koch - tilo de Crimea, tilo del Cáucaso
Especies	Tilia X europaea L. (pro. sp.) - tilo europeo, tilo común
Especies	Tilia X flavescens A. Braun ex Döll
Especies	Tilia japonica (Miq.) Simonk. - tilo japonés, tilo japonés
Especies	Tilia X moltkei Spath ex CK Schneid.
Especies	Tilia petiolaris DC. - tilo de plata colgante
Especies	Tilia platyphyllos Scop. - tilo de hoja ancha
Especies	Tilia tomentosa Moench



Nº	COMPENDIO	EDICIÓN	DEF. DROGA VEGETAL
1	Farmacopea Argentina	7ma Ed	Parte Usada: Inflorescencias enteras desecadas- (Aclara en el texto a qué le llama droga vegetal a: la parte usada) Nombre científico: <i>Tilia</i> spp, (Se excluye <i>Tilia argentinensis</i> L) (Tiliaceae)
2	Farmaopea Brasileira	6ma Ed. 2019	No tiene monografía de especies de <i>Tilia</i>
3	Farmacopea Europea	10ma Ed.	Lime flower.Tiliae.flos. Inflorescencia entera y seca de <i>Tilia cordata</i> Miller, de <i>Tilia platyphyllos</i> Scop., de <i>Tilia × vulgaris</i> Heyne o una mezcla de éstas.
4	Farmacopea USP	USP 43 NF 38	No tiene monografía de especies de <i>Tilia</i>
6	American Herbal Pharmacopeia		No tienen monografías de especies de <i>Tilia</i>
7	Farmacopea Británica	2013	Whole, dried inflorescence of <i>Tilia cordata</i> Miller, of <i>Tilia platyphyllos</i> Scop., of <i>Tilia × vulgaris</i> Heyne or a mixture of these.
8	Farmacopea Japonesa	JP XVII	No tienen monografías de especies de <i>Tilia</i>
9	Monografías WHO	NIS 2010	Flos Tiliae consiste en la inflorescencia seca entera o cortada de plantas silvestres o cultivadas de <i>Tilia cordata</i> Mill. y <i>Tilia platyphyllos</i> Scop. (Tiliaceae) recogidas durante la fase de floración (1).
10	ESCOPE		No tiene monografía de especies de <i>Tilia</i>

FARMACOPEA EUROPEA

Droga vegetal de Tilo

LIME FLOWER

Tiliae flos

DEFINITION

Whole, dried inflorescence of *Tilia cordata* Miller, of *Tilia platyphyllos* Scop., of *Tilia × vulgaris* Heyne or a mixture of these.

CHARACTERS

Faint aromatic odour.

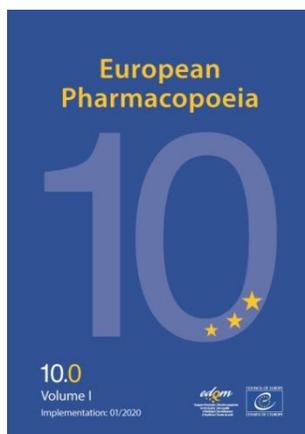
Faint, sweet and mucilaginous taste.

TESTS

Foreign matter (2.8.2): maximum 2 per cent, determined on 30 g. There are no inflorescences with a bract bearing at the abaxial face stellate, five- to eight-rayed trichomes and flowers having an apparent double corolla by transformation of five stamens into petal-like staminoids and having a pistil which is not lobular nor indented. Hexamerous flowers occur only occasionally (*Tilia americana* L., *Tilia tomentosa* Moench).

Loss on drying (2.2.32): maximum 12.0 per cent, determined on 1.000 g of the powdered drug (355) (2.9.12) by drying in an oven at 105 °C for 2 h.

Total ash (2.4.16): maximum 8.0 per cent.



WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS)

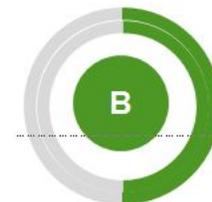
Definition

Flos Tiliae consists of the whole or cut dried inflorescence of wild or cultivated *Tilia cordata* Mill. and *Tilia platyphyllos* Scop. (Tiliaceae) collected during the flowering phase (1).

Note: According to the *European Pharmacopoeia*, Flos Tiliae consists of the whole, dried inflorescences of *Tilia cordata* Miller, of *Tilia platyphyllos* Scop., of *Tilia x vulgaris* Heyne or a mixture of these (Tiliaceae) (2). They are usually supplied whole, but the materials used for commercial purposes may be broken up (3).



EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE MEDICINES HEALTH



22 May 2012
EMA/HMPC/337066/2011
Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)

Community herbal monograph on *Tilia cordata* Miller, *Tilia platyphyllos* Scop., *Tilia x vulgaris* Heyne or their mixtures, flos

Community herbal monograph on *Tilia cordata* Miller, *Tilia platyphyllos* Scop., *Tilia x vulgaris* Heyne or their mixtures, flos

1. Name of the medicinal product

To be specified for the individual finished product.

2. Qualitative and quantitative composition^{1,2}

Well-established use	Traditional use
	With regard to the registration application of Article 16d(1) of Directive 2001/83/EC as amended <i>Tilia cordata</i> Miller, <i>Tilia platyphyllos</i> Scop., <i>Tilia x vulgaris</i> Heyne or their mixtures, flos (lime flower) i) Herbal substance Not applicable. ii) Herbal preparations a) Comminuted herbal substance b) Liquid extract (DER 1:1), extraction solvent ethanol 25% V/V c) Tincture (ratio of herbal substance to extraction solvent 1:5), extraction solvent ethanol 45% V/V



Objetivo

Caracterizar las drogas *Tiliae flos* comercializadas en Uruguay: identificar botánicamente las especies y estudiar su composición fitoquímica



03

Diseño experimental Y
RESULTADOS

a-Control de calidad

b-Identificación botánica

c-Characterización fitoquímica



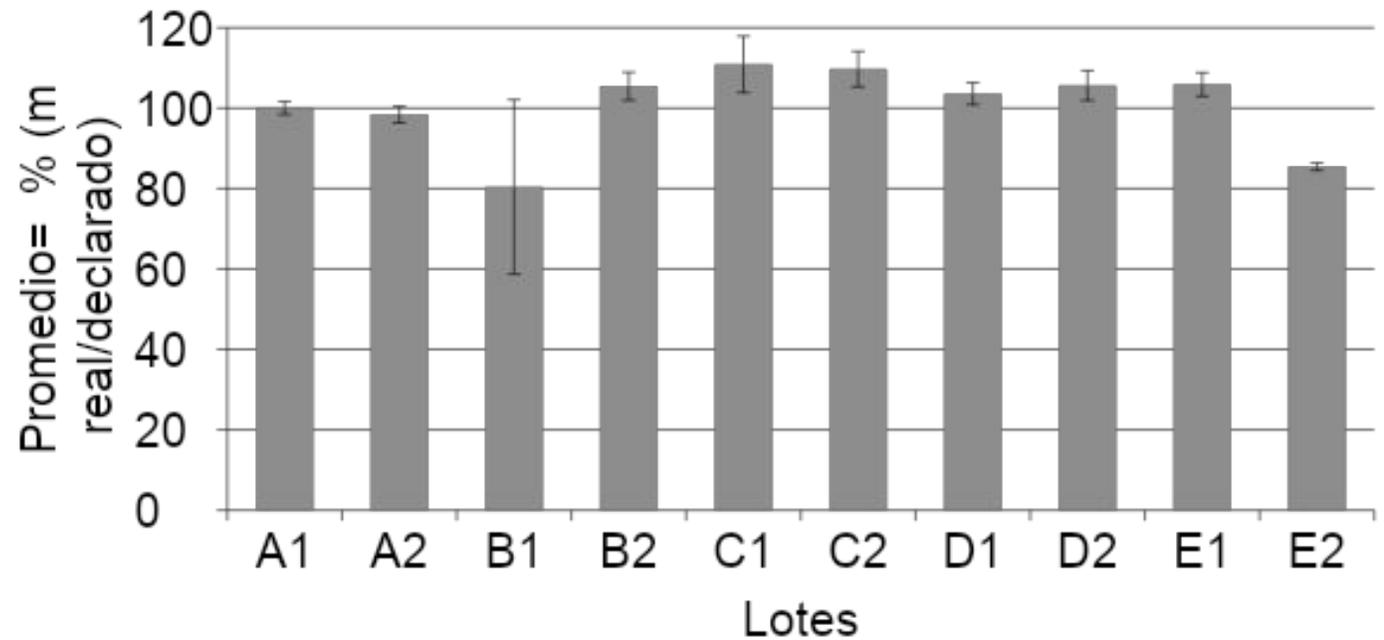
Muestreo material de estudio

Proveedor A		Proveedor B		Proveedor C		Proveedor D		Proveedor E	
Lote A1	Lote A2	Lote B1	Lote B2	Lote C1	Lote C2	Lote D1	Lote D2	Lote E1	Lote E2
A1-1	A2-1	B1-1	B2-1	C1-1	C2-1	D1-1	D2-1	E1-1	E2-1
A1-2	A2-2	B1-2	B2-2	C1-2	C2-2	D1-2	D2-2	E1-2	E2-2
A1-3	A2-2	B1-3	B2-3	C1-3	C2-3	D1-3	D2-3	E1-3	E2-3
A1-4	A2-4	B1-4	B2-4	C1-4	C2-4	D1-4	D2-4	E1-4	E2-4
A1-5	A2-5	B1-5	B2-5	C1-5	C2-5	D1-5	D2-5	E1-5	E2-5

Tamaño de la muestra-
50 bolsas de hierbas *in natura* TILO.
Peso neto oscila entre 10g y 25g

a-Control de calidad

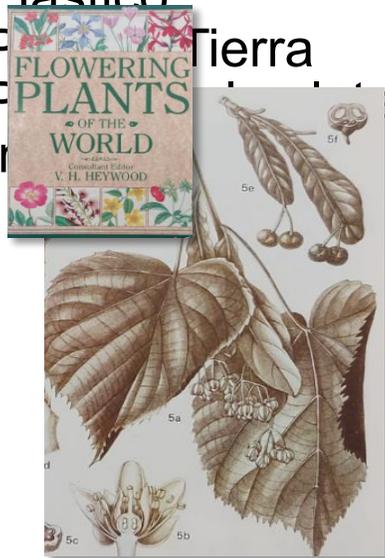
Masa de material vegetal (Tilo) respecto al valor declarado en etiqueta para cada lote ($n=5$)



**Materia
extraña**

a-Control de calidad

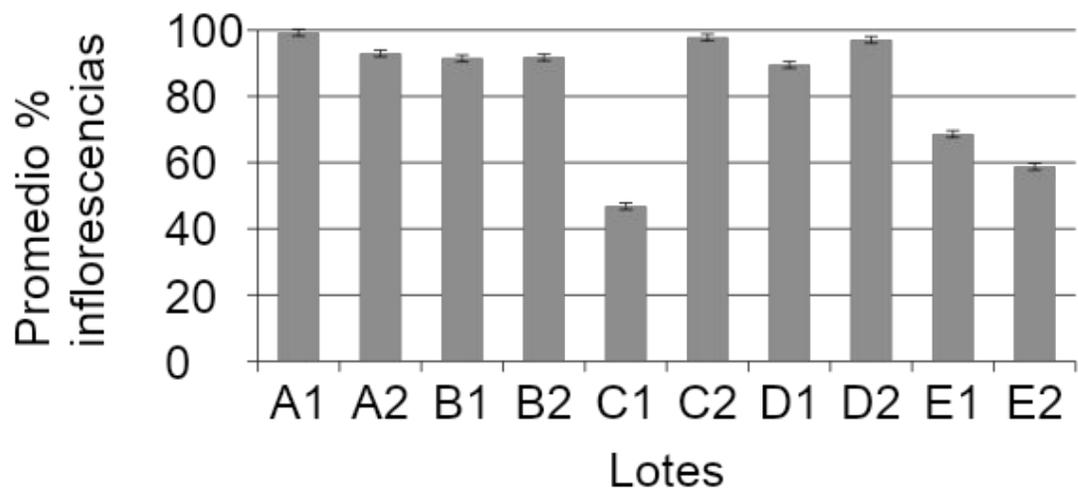
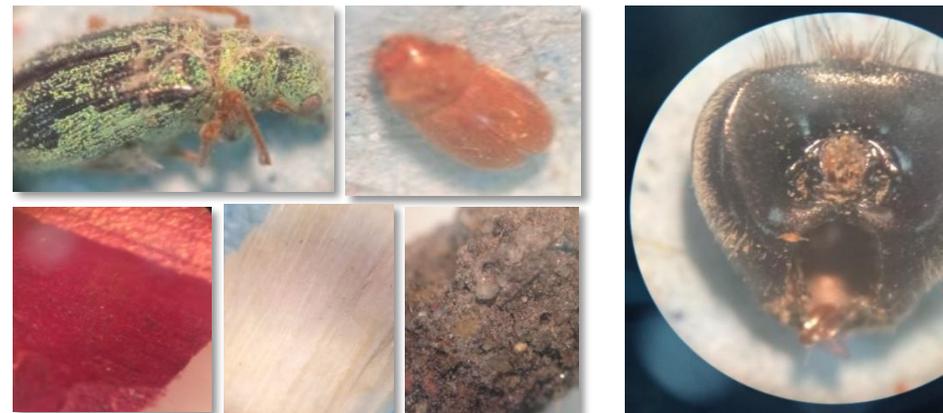
- ¿Cuál es la droga vegetal en tilo?
 - Brácteas + flores = Inflorescencia
- ¿Cuáles son los **MATERIAS EXTRANAS** más comunes?
 - Plástico
 - Tierra
 - Flores de otras plantas que no son DV.
 - Insectos



Materia extraña es cualquier material que no esté comprendida en la definición de droga de la monografía correspondiente. Las drogas deben estar libres de hongos, de insectos y de otras contaminaciones de origen animal.

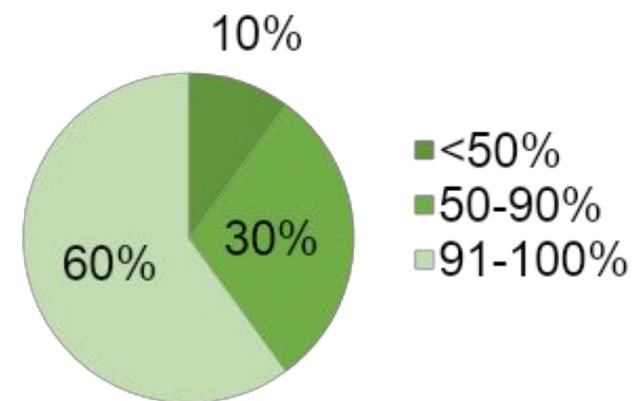
≤2% m/m

Droga vegetal:
inflorescencia
(brácteas y flores)



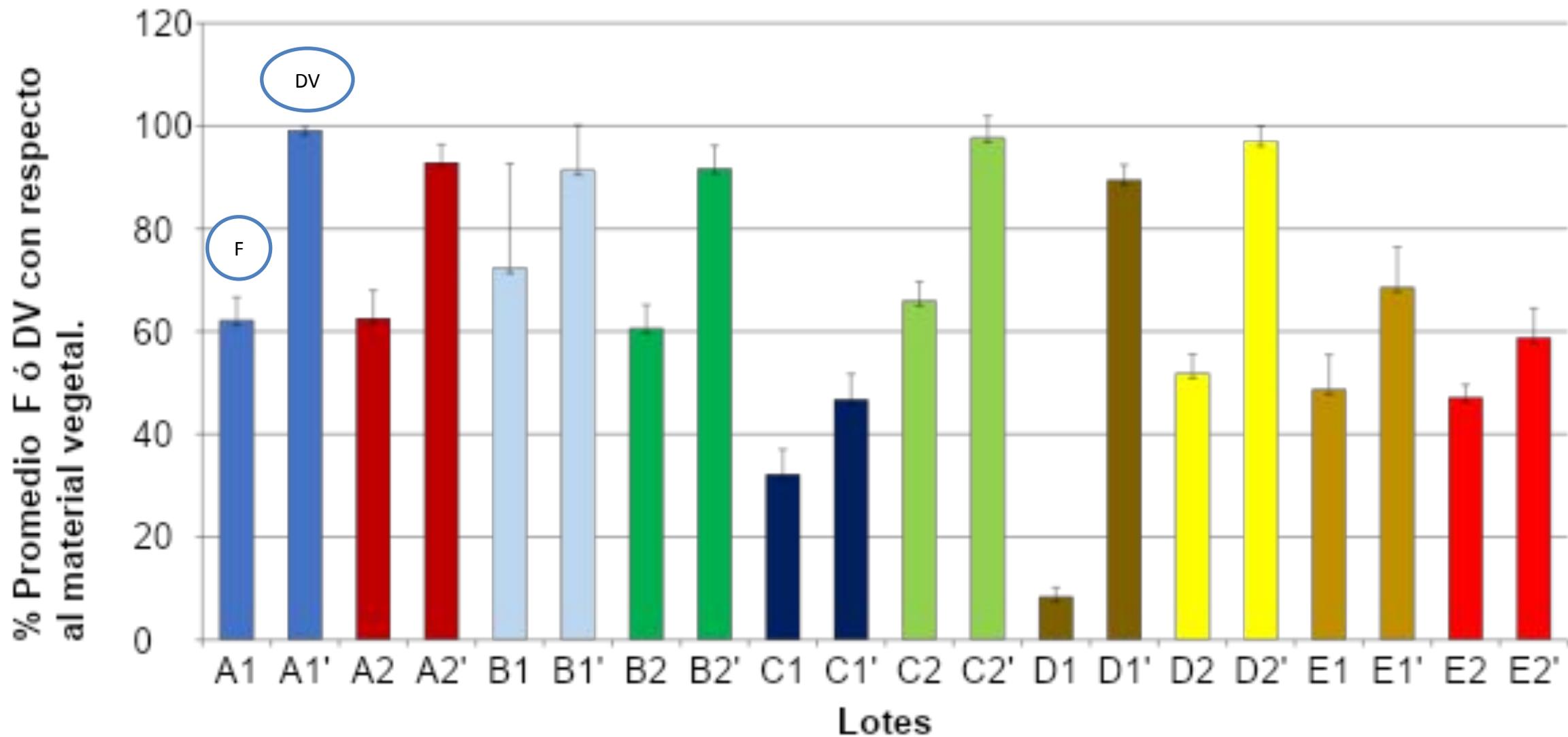
Masa de droga vegetal respecto al material vegetal para cada lote ($n=5$)

Porcentaje de droga vegetal en los 50 lotes estudiados



60% de las 50 muestras estudiados contienen más del 90% de droga vegetal

Variabilidad del contenido de flores o droga vegetal con respecto al material vegetal en cada lote estudiado.



b-Identificación botánica

Relevamiento de documentación botánica para la tipificación de las hierbas seleccionadas y elaboración de guías de identificación rápida y de fichas por especie.



Fichas FARMACOBOTÁNICAS de identificación rápida

- Lupa
- Microscopio
- Caracteres diagnóstico
- Identificación b

FICHA TÉCNICA RÁPIDA DE IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA T1



Nombre científico: *Tilia platyphyllos* Scop.

Foto: Plants of the Word Online.org
(Plants of the



FICHA TÉCNICA RÁPIDA DE IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA T2

Nombre científico: *Tilia cordata* Mill.

Nombre común: Tilo de hoja pequeña.

JERARQUÍA TAXONÓMICA

REINO	Plantae
SUBREINO	Viridiplantae
INFREINO	Streptophyta
SUPERDIVISION	Embryophyta
DIVISION	Tracheophyta
SUBDIVISION	Spermatophytina
CLASE	Magnoliopsida
SUPERORDEN	Rosanae

RANGO NATIVO.

Casi toda Europa, excepto en el extremo N (Aedo, 1993).

Foto: Plants of the Word Online.org
(Plants of the Word Online)

Fichas FARMACOBOTÁNICAS de identificación rápida

FICHA TÉCNICA RÁPIDA DE IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

T2



Foto: Plants of the Word Online.org (Plants of the Word Online)

Nombre científico: *Tilia cordata* Mill.

Nombre común: Tilo de hoja pequeña.

JERARQUÍA TAXONÓMICA

REINO	Plantae
SUBREINO	Viridiplantae
INFREAREINO	Streptophyta
SUPERDIVISION	Embryophyta
DIVISION	Tracheophyta
SUBDIVISION	Spermatophytina
CLASE	Magnoliopsida
SUPERORDEN	Rosanae
ORDEN	Malvales
FAMILIA	Malvaceae

RANGO NATIVO.

Casi toda Europa, excepto en el extremo N (Aedo, 1993).

CARACTERES MACRO Y MICROANATÓMICOS DIAGNÓSTICOS

IDENTIFICACIÓN INEQUÍVOCA DE LA ESPECIE

Foto: Plants of the Word Online.org (Plants of the Word Online)

Las ilustraciones pertenecen a: Plants of the Word Online



Fig 1: pelos rojizos en el envés de la hoja



Fig 2: Frutos inmaduros.



Fig 3: Cimas de flores erectas.

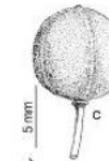


Fig 4: Fruto de *Tilia cordata* Mill.



Fig 5. Sección transversal del fruto

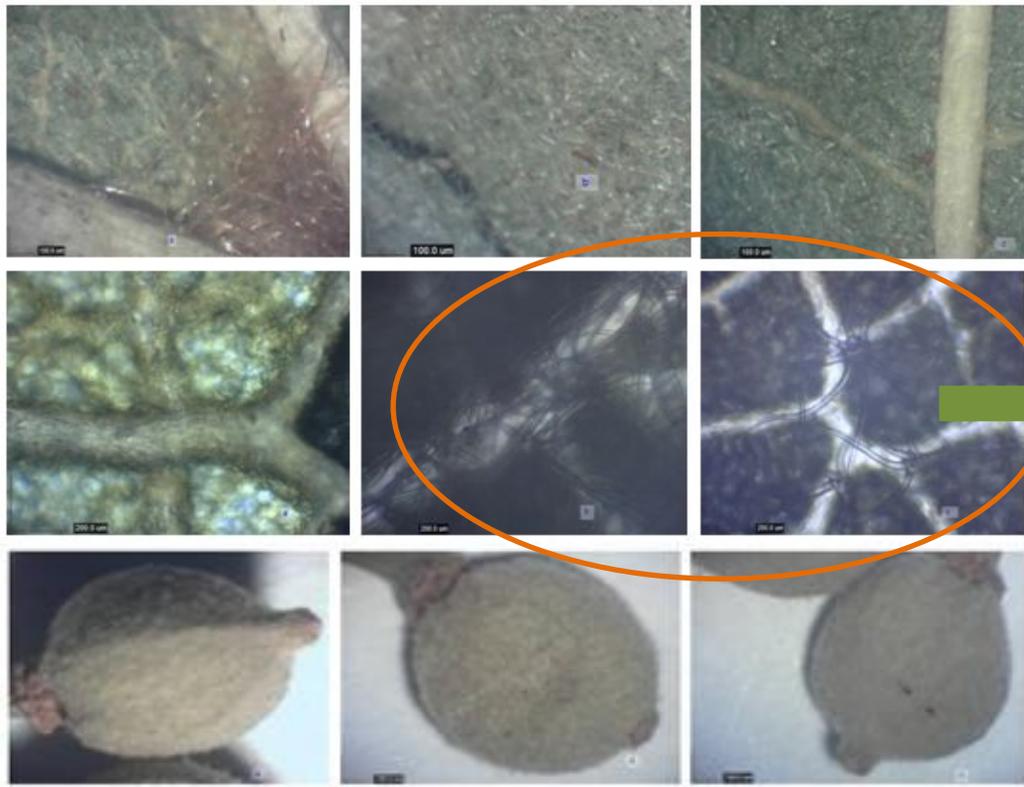
Las ilustraciones pertenecen a: Lám 53. *Tilia cordata*. Herrerías (Cantabria) MA 486313

b-Identificación botánica

Tilia cordata
Mill

Tilia tomentosa
Moench.

Tilia × moltkei
Späth ex
C.K.Schneid.



Envés de las hojas.

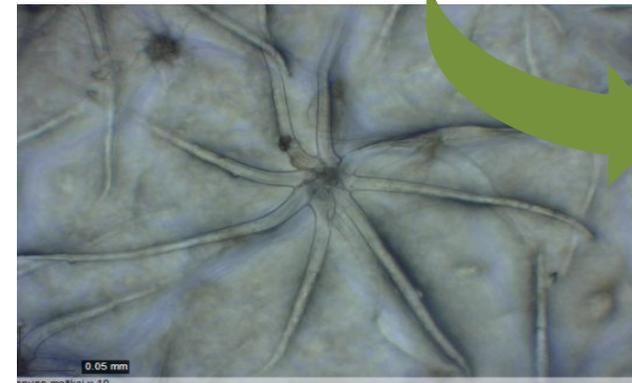
Estaminodios en *Tilia tomentosa* Moench.



Tricomas estrellados en envés de hoja (*Tilia tomentosa* Moench y *x moltkei* Späth ex C.K.Schneid)

Presencia o ausencia de costillas bien marcadas en el fruto

Difieren en densidad de tricomas estrellados en envés de hoja (*Tilia tomentosa* Moench y *x moltkei*)



b-Identificación botánica

Lote Tilo	Especie declarada según rotulado	Especie por Ident. Botánica
A1	Tilia tomentosa Moench. Inflorescencia	<i>Tilia cordata</i>
A2	Tilia tomentosa Moench. Inflorescencia	<i>Tilia cordata</i>
B1	Tilo	<i>Tilia tomentosa</i>
B2	Tilo	<i>Tilia tomentosa</i>
C1	Tilo. Tilia tomentosa Moench	<i>Tilia tomentosa</i>
C2	Tilo. Tilia tomentosa Moench	<i>Tilia cordata</i>
D1	Tilo	<i>Tilia × moltkei.</i>
D2	Tilo. Tilia tomentosa Moench.	<i>Tilia cordata</i>
E1	Tilo (Tilia spp)	<i>Tilia × moltkei</i>
E2	Tilo (Tilia spp)	<i>Tilia × moltkei</i>

De los 10 lotes estudiados, solamente **UNO SOLO** declara inequívocamente la especie contenida.

c-Characterización fitoquímica

Preparación de muestra:



Fenoles totales: Folin-Ciocalteu

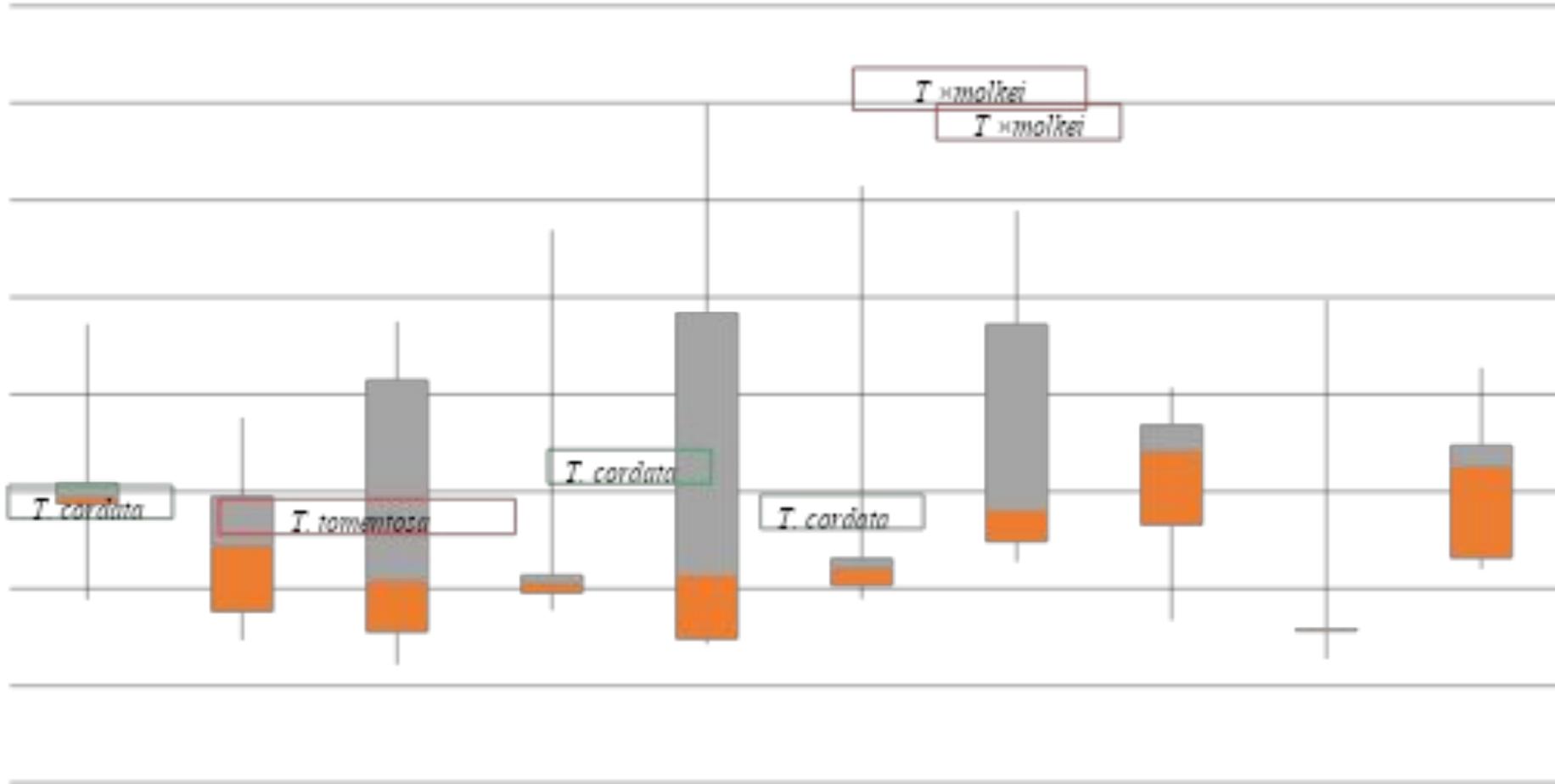
La lectura de la absorbancia a **760 nm** luego de las 2 hs en la oscuridad.

Reactivos. 1-Folin Ciocalteu 1N,
2-solución de Na_2CO_3 (ac) 20 %
(Na_2CO_3 Merck, Germany), 3- H_2O MilliQ

Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico equivalentes por gramo de flores individuales secas.

Análisis cuantitativo de fenoles totales por espectrofotometría

Contenido de fenoles (expresados en mg GAE / g de flores secas)

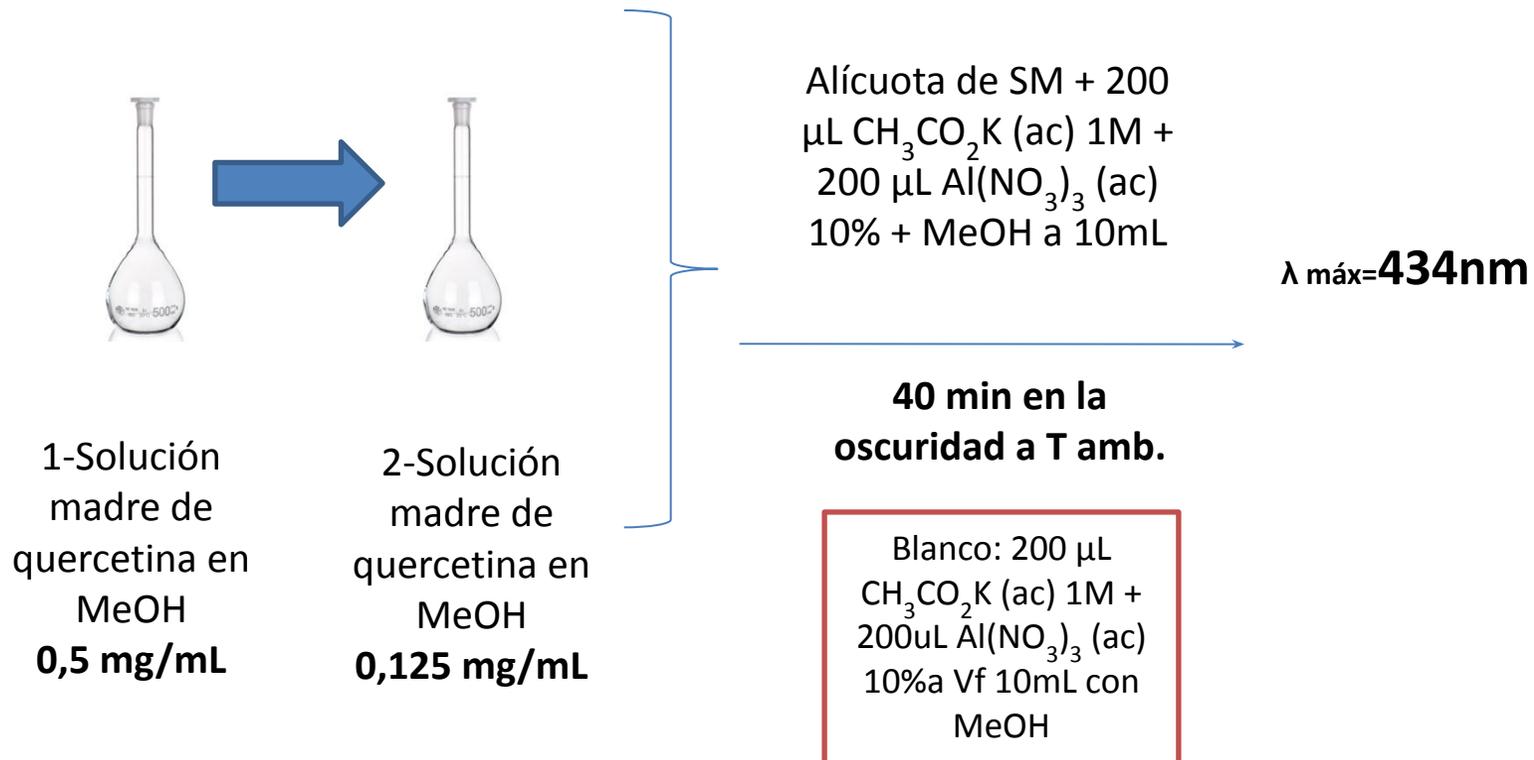


b-Characterización fitoquímica

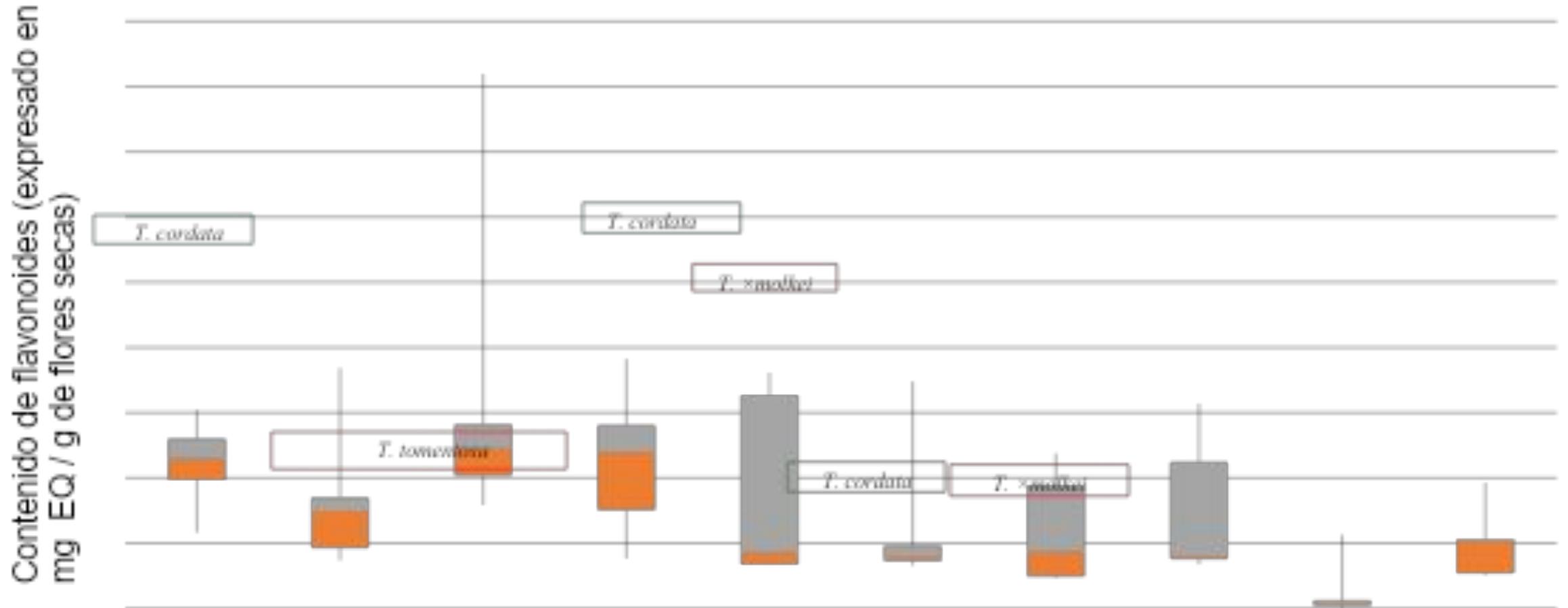
Preparación de muestra:



Flavonoides



Comparación el contenido de flavonoides en las especies de tilo identificadas



Estadísticamente no existen diferencias entre lotes en cuanto al contenido de fenoles y flavonoides por gramo de flores individuales en peso seco

□ Los resultados obtenidos servirán para una mas precisa definición de la droga *Tiliae flos*, que combine no solo aspectos botánicos sino una exhaustiva descripción de su fitoquímica, que pueda ser transferida a las autoridades de salud para facilitar la detección de fraudes.

□ Se hace necesario estudios más abarcativos para corroborar los hallazgos de este trabajo y asegurar la calidad de la droga *Tiliae flos* comercializada en Uruguay.



Agradecimientos

PEDECIBA Química
FCE1 2021 1 167588
ANII POSNAC_2019_1157883

ANII AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN

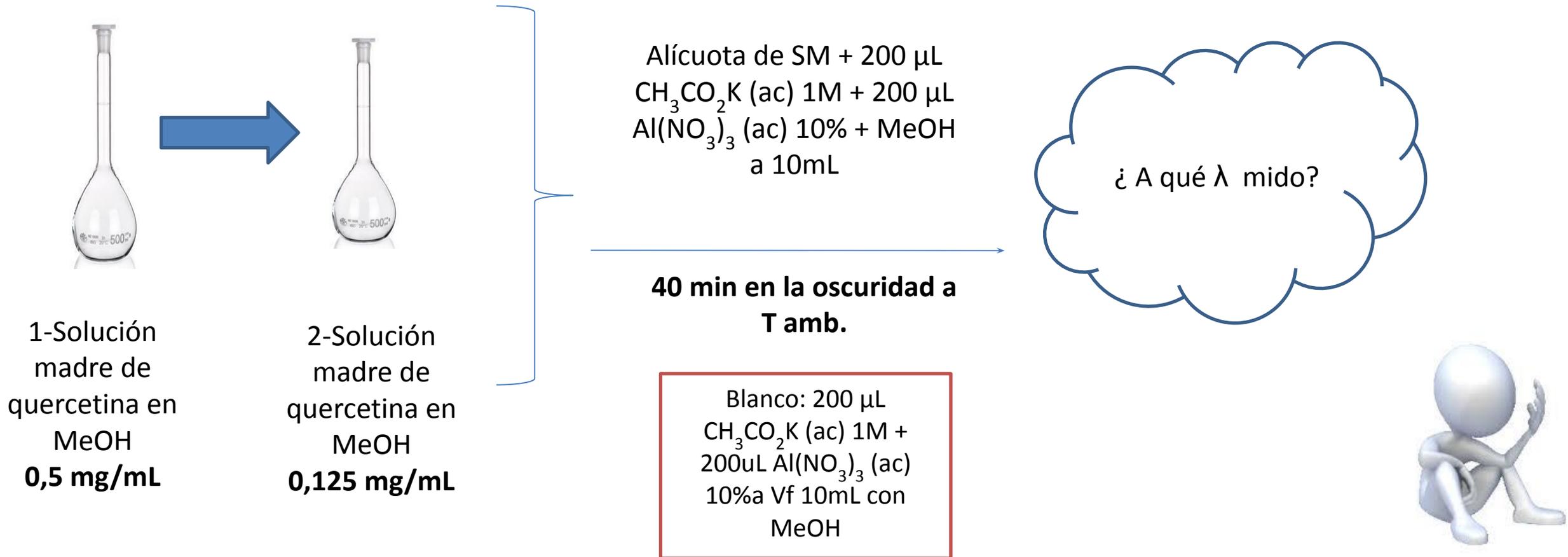


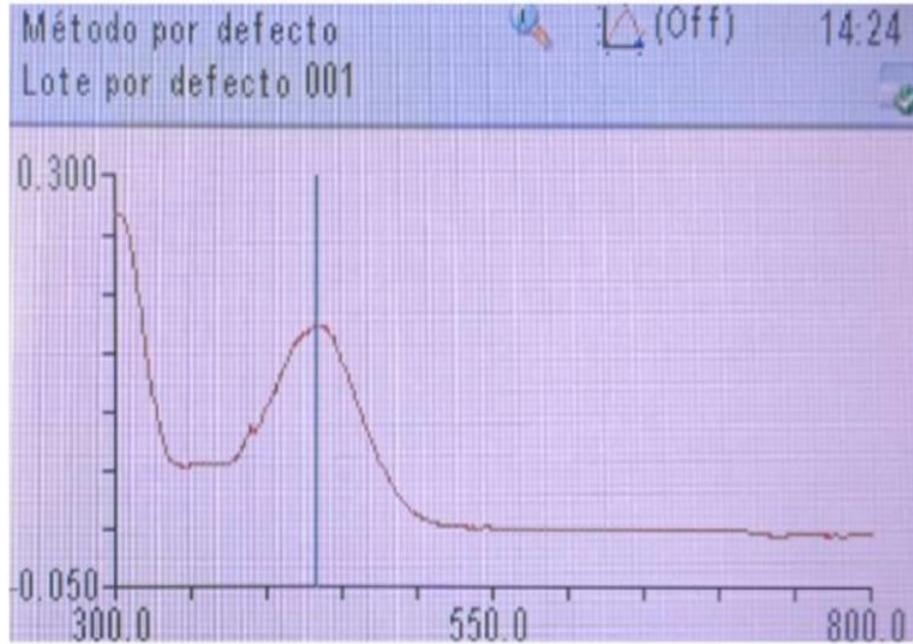
Muchas gracias



Análisis cuantitativo de FLAVONOIDES

El contenido de flavonoides totales fue determinado mediante colorimetría según el método descrito por **Lock et al. (2006)**, La cantidad de flavonoides fue expresada en equivalentes de quercetina (mg de quercetina/ g de peso seco de flores individuales), interpolando los valores de absorbancia en una recta patrón de quercetina.

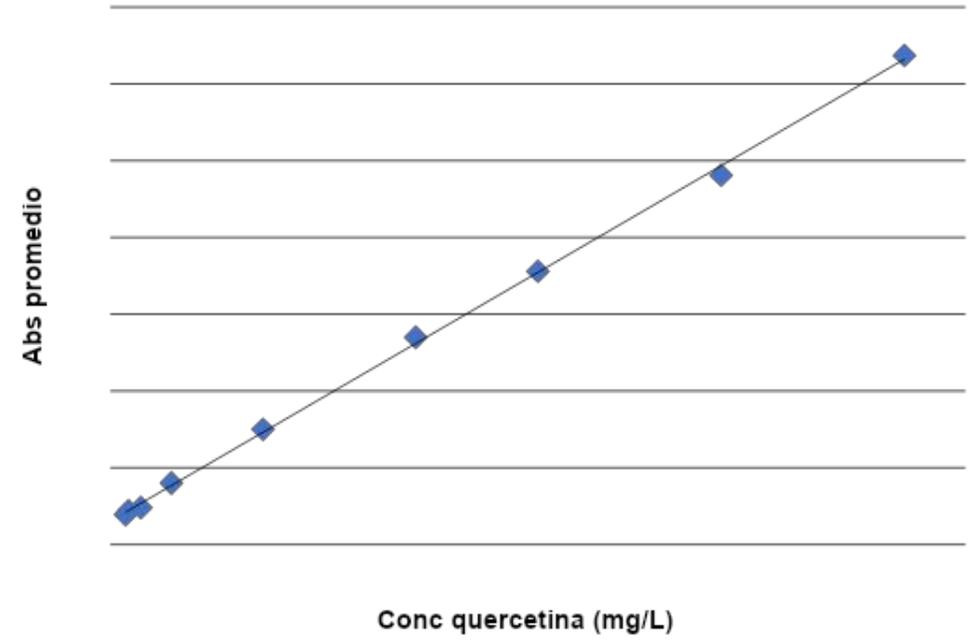




$\lambda \text{ máx} = 434 \text{ nm}$

Conc (mg/L)	Abs prom
0,125	0,039
0,15	0,044
0,25	0,048
0,5	0,080
1,25	0,150
2,5	0,270
3,5	0,356
5	0,481
6,5	0,637

Curva de calibración Flavonoides



TESTS ESTADÍSTICOS. ANOVA FENOLES TOTALES

Para el contenido fenoles totales

1- H_0 la media del contenido de fenoles totales en (*Tilia cordata*, *tomentosa* y *x moltkei*) es estadísticamente igual con un 95% de confianza

H_1 la media del contenido de fenoles totales es diferente.

p es mayor que 0,05- Asumo H_0

2-**Diferencias inter-especies?** H_0 la media del contenido de fenoles totales en las especies estudiadas es estadísticamente igual con un 95% de confianza. H_1 la media del contenido de fenoles totales en las especies estudiadas es distinto. p es mayor que 0,05- Asumo H_0

NO EXISTE EVIDENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE LAS MEDIAS DE LOS GRUPOS ESTUDIADOS.

TESTS ESTADÍSTICOS. ANOVA FLAVONOIDES

Para el contenido de flavonoides.

1- H_0 la media del contenido de flavonoides en (*Tilia cordata*, *tomentosa* y *x moltkei*) es estadísticamente igual con un 95% de confianza

H_1 la media del contenido de flavonoides es diferente.

p es mayor que 0,05- Asumo H_0

2-Diferencias inter-especies?

H_0 la media del contenido de flavonoides en las especies estudiadas es estadísticamente igual con un 95% de confianza

H_1 la media del contenido de flavonoides en las especies estudiadas es distinto.

Valor p cercano a 0,05 hay diferencias estadísticas mínimas.....

Al no evidenciar normalidad.... **TEST NO PARAMÉTRICO (KRUSKAL -WALLIS)**

Existe o no evidencia significativa entre las medias de los grupos independientes?

NO EXISTE EVIDENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE LAS MEDIAS DE LOS GRUPOS ESTUDIADOS.

Análisis cuantitativo de FENOLES TOTALES



Ácido gálico en
agua MilliQ
0,1 g/L
SM=Solución
Madre

Alícuota de **SM**
+ 500 μ L
FC+1500 μ L
Na₂CO₃(ac)+
H₂O MilliQ a
4mL
2 hs OSCURIDAD

$\lambda = 760 \text{ nm}$

Conc (mg/L)	Abs prom
1	0,046
1,5	0,097
2	0,140
4	0,297
6	0,478
7	0,546



Blanco: FC+ Na₂CO₃
(ac) 20 % + H₂O
MilliQ

Curva de Calibración. Fenoles Totales

