

**ANATOMÍA MICROSCÓPICA Y METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES
EN TRES ESTADÍOS DEL DESARROLLO DE LAS INFLORESCENCIAS DE
Lantana camara L. (Verbenaceae).**

JOSE FERNANDO CAROPRESE ARAQUE

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2009**

**ANATOMÍA MICROSCÓPICA Y METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES
EN TRES ESTADÍOS DEL DESARROLLO DE LAS INFLORESCENCIAS DE
Lantana camara L. (Verbenaceae).**

JOSE FERNANDO CAROPRESE ARAQUE

**Proyecto de grado para optar al título de
Biólogo**

Director:

Esp. DAGOBERTO ARRIETA PRIETO

Codirectora:

ELENA STASHENKO. PhD

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2009**

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus más sinceros agradecimientos a María Nilda Cerf Arbulú y a José Miguel Esborronda Andrade, por la contribución con sus conocimientos y sugerencias para la realización de este proyecto y para todas las áreas del Saber. A la Federación Internacional de Sociedades Científicas (FISS), por el material bibliográfico suministrado. Agradecemos igualmente a María Isabel Parra Garcés por su colaboración en la concretización de la presente investigación y revisión general del manuscrito, a Jhon Jairo Díaz Olarte por su apoyo en el diseño y revisión estadística, a Humberto García Pinzón, por sus aportes en la descripción de las inflorescencias, a Edgar Rincón Barón por contribuir con el desarrollo de ésta investigación en la parte biológica y a Nestor Marín en el área química.

DEDICATORIA

*A mis padres, María Isabel Araque y José Caroprese
por su apoyo incondicional durante mi carrera.*

*Al Doctor Serge Raynaud de la Ferrière
y al Doctor David Juan Ferríz Olivares,
por su Pensamiento de profundas transformaciones dialécticas para esta Nueva
Era de Investigaciones Verdaderas.*

*A nuestros Maestros Cont. María Nilda Cerf Arbulú
y Lic. José Miguel Esborronda Andrade,
por su constancia irreductible en la formación Científica y Espiritual para la
reeducación de la humanidad.*

*A María Isabel Parra Garcés,
por ser mi apoyo e inspiración constante.*

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	11
1. MATERIALES Y MÉTODOS	3
1.1 MATERIAL VEGETAL	3
1.2 ANÁLISIS QUÍMICO	4
1.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	6
2. RESULTADOS	7
3. DISCUSIÓN	10
BIBLIOGRAFIA	17

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Tabla 1. Promedios \pm SD de cantidad relativa de metabolitos volátiles en <i>L. camara</i> durante tres estadios del desarrollo ontogénico, número de pico e índices de Kovats. Significancia según test de Anova, letras diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas, según el test de Tukey ($p < 0.05$).	24
ANEXO B. Figura 1. Botón de flores (A y B) y cortes longitudinales (C, D, E, F) característicos del estadio I. Abreviaturas: Yi: yema inicial; Br: bráctea; P: pétalos; S: sépalos; G: gineceo; Tg: tricoma glandular; H: hojas; T: tallo; Cf: cabezuela floral; Ff: flores en formación.	25
ANEXO C. Figura 2. Botones florales (A y B), cortes longitudinales (C, D, F) y transversal (E) característicos del estadio II. Abreviaturas: Ff: flores en formación; Br: brácteas; Pd: pedicelo; P: pétalos; S: sépalos; E: estambres; G: gineceo; Pa: parénquima; E1: estadio I; E2: estadio II; E3: estadio III. (*) Tamaño del estadios II.	26
ANEXO D. Figura 3. Inflorescencias en su máximo desarrollo (A, B) y cortes longitudinales (C, D, F) y transversal (E) correspondientes al estadio III. Abreviaturas: Br: brácteas; C: corola; An: antera; St: estigma; Eo: estilo; O: ovario; Cz: cáliz; P: pétalos; E: estambres; S: sépalos.	27
ANEXO E. Figura 4. Cromatograma (CG-MS) de los metabolitos secundarios volátiles de las inflorescencias de <i>L. camara</i> , obtenidos en el estadio I, por HS-SPME. La identificación de los picos se reporta en la Tabla 1.	28
ANEXO F. Figura 5. Cromatograma (CG-MS) de los metabolitos secundarios volátiles de las inflorescencias de <i>L. camara</i> , estadio II, obtenido por HS-SPME. La identificación de los picos se reporta en la Tabla 1.	29
ANEXO G. Figura 6. Cromatograma (CG-MS) de los metabolitos secundarios volátiles de las inflorescencias de <i>L. camara</i> , estadio III, obtenido por HS-SPME. La identificación de los picos se reporta en la Tabla 1.	30

RESUMEN

Título: Anatomía microscópica y metabolitos secundarios volátiles en tres estadios del desarrollo de las inflorescencias de *Lantana camara* L. (Verbenaceae)*.

Autor: José Fernando Caroprese Araque**

Palabras claves: *Lantana camara*, morfo-anatomía floral, función de las esencias florales, interacción química, fragancia.

Se describe el desarrollo morfoanatómico de las inflorescencias de *Lantana camara* L. (Verbenaceae), recolectadas en la zona de cultivos experimentales del CENIVAM, Bucaramanga, Colombia. Para esto se establecieron tres estadios de desarrollo, los cuales se analizaron mediante microscopía óptica convencional. Se realizó en cada uno ellos, la determinación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles. El aislamiento de los analitos se realizó mediante la técnica de microextracción en fase sólida en el modo headspace (HS-SPME) y su posterior análisis de componentes, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El Estadio I se caracterizó microscópicamente por presentar un desarrollo inmaduro, en el cual se aprecia un grupo de células en donde se inicia la diferenciación meristemática. En el Estadio II, se observó la acción de movimientos morfogenéticos que da paso a la formación de las respectivas estructuras sexuales florales, el cáliz y la corola. Al llegar al Estadio III, se observaron claramente los diferentes órganos: cuatro estambres epipétalos y didínamos, el gineceo monocarpelar, bilocular y globoso, ovario súpero y estigma lateral. Las flores son hermafroditas. Los metabolitos detectados en este estudio y que no fueron encontrados en la bibliografía revisada fueron, el α -gurjuneno, el γ -amorfeno, el α -muuroleno, el sesquitujeno, el α -*trans*-bergamoteno y el *trans*-cadina-1,4-dieno. Los principales metabolitos secundarios detectados fueron el biciclosquifelandreno, el E- β -farneseno, E- β -cariofileno, γ -muuroleno+ γ -curcumeno y α -zingibereno. Una función importante de éstas y otras esencias florales es la defensa y la protección durante el estrés abiótico de la planta.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Esp. Dagoberto Arrieta Prieto. Co-Directora: Elena Stashenko. PhD.

ABSTRACT

Title: Microscopic anatomy and secondary volatiles metabolites in three stages of development of inflorescences of *Lantana camara* L. (Verbenaceae)*

Author: José Fernando Caroprese Araque**

Key words: *Lantana camara*, floral morpho-anatomy, function of the floral essences, interaction chemistry, fragrance

In this study, the morpho-anatomical development of the inflorescences of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) collected in the zone of experimental crop in CENIVAM, Bucaramanga, Colombia was described. In order to carry out this process, three stages of the plant development were established and analyzed by the microscope. Determination of the chemical composition of the volatile secondary metabolites was made for each of the three chosen stages. The isolation of analytes was achieved by means of solid phase micro-extraction in the headspace mode (HS-SPME) the analysis of components was carried out by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Stage I was microscopically characterized by an immature development in which the meristematic differentiation begins with a mass of cells. In Stage II, it was observed how the morphogenetic movement gives way to the formation of the respective floral sexual structures, calyx and corolla. When reaching Stage III, the different organs could be overtly noticed: four stamens epipetals and didynamous, monocarpelar, biloculate and globose gynoecium, superior ovary and lateral stigma. The flowers are hermaphroditic. The main detected by GC-MS secondary metabolites, they were biciclosesquifelandrene, el E- β -farnesene, E- β -cariofilene, γ -muurolene+ γ -curcumene and α -zingiberene. The metabolites found in this study which did not appear described in the bibliography revised were, α -gurjunene, γ -amorfone, α -muurolene, sesquitujene, α -*trans*-bergamotene and *trans*-cadina-1,4-diene. A important function of the floral essences of plants is the defense and protection against abiotic stress.

* Degree Work

** Science Faculty. School of Biology. Director: Esp. Dagoberto Arrieta Prieto. Co-Director: Elena Stashenko. PhD.

INTRODUCCIÓN

Las plantas de la familia Verbenaceae se encuentran ampliamente distribuidas por casi todo el planeta, siendo más abundantes en las regiones tropicales y subtropicales, en forma de arbustos, hierbas y árboles. Poseen una gran diversidad botánica y han sido ampliamente estudiadas por su variable uso (Ocampo 2000). La especie *Lantana camara* L. (Verbenaceae), pertenece a esta familia en la que se incluyen cerca de 98 géneros con aproximadamente 2.500 taxones específicos (Ocampo 2000). Según Gupta (1995), *L. camara* también se designa taxonómicamente como *Lantana armata* Saucher, *Camara vulgaris* Benth, o *Lantana aculeata* L; en Colombia se conoce popularmente como “Venturosa”, “Gurupacha” y “Cariaquillo”.

Estudios realizados en la planta han demostrado la presencia de varios terpenoides, esteroides y alcaloides (Ghisalberti 2000). El alcaloide lantamina, obtenido de la corteza de las ramas y de las raíces de *L. camara*, muestra una intensa actividad antipirética y antiespasmódica, propiedad comparable con la de la quinina (Ghisalberti 2000). Sus hojas son también muy utilizadas en la medicina popular para el tratamiento de enfermedades como el tétano, reumatismo y malaria. Es reportada por ser una importante fuente de fósforo y potasio, al emplearse como abono; por poseer propiedades farmacológicas, incluyendo la bactericida, insecticida, nematocida, antimutagénica y su acción repelente contra insectos vectores de la malaria, entre otras (Seyoum *et al.* 2002, Basu *et al.* 2005). En contraste con estos hallazgos, algunos de los compuestos de esta planta muestran efectos tóxicos para diferentes especies animales (Carrillo y Díaz de Ramírez 2006).

En este estudio se eligieron y describieron tres estadios de desarrollo de *L. camara* y se identificaron simultáneamente los metabolitos secundarios volátiles

que hacen parte de cada uno de ellos. Por primera vez se reportan estos datos. Se espera aportar un mayor conocimiento sobre los diversos eventos y caracteres involucrados en el desarrollo de las inflorescencias de la familia Verbenaceae y en especial, para esta especie. Se busca aportar información diagnóstica para la diferenciación intergenérica e identificar y reportar compuestos químicos volátiles que cambian a medida que avanza el desarrollo.

Los estudios acerca de la secuencia de iniciación y posición de los distintos órganos florales en formación, son importantes en la investigación relacionada con los controles moleculares de la morfogénesis floral (Hufford y Diggle 1997, Brukhin *et al.* 2003), e igualmente, desde el punto de vista sistemático, como lo indica Yang *et al.* (2002) en sus trabajos sobre la posición y las relaciones de parentesco de algunos géneros de Solanaceae, y aunque este trabajo no tiene implicaciones directas sobre ello (controles moleculares de la morfogénesis floral y sistemática), se espera contribuir también con futuros estudios sobre la filogenia en Verbenaceae. Finalmente, acerca de la importancia de los estudios químicos de los organismos (ya sea plantas o animales), recordamos el controversial postulado que dice que la diversidad de la flora y fauna es un resultado directo de las interacciones químicas y co-adaptaciones de plantas, herbívoros y microorganismos (Mann 1987).

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 MATERIAL VEGETAL

Se inició con la recolección de muestras florales de *L. camara* en el cultivo experimental del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), de la Universidad Industrial de Santander (UIS), Bucaramanga, Colombia, al medio día. Este horario fue tomado, teniendo en cuenta el estudio realizado con una Verbenaceae (*Lippia alba*) por Duarte *et al* (2007), en el que se indica el incremento de producción de metabolitos secundarios en el horario mencionado. La identificación taxonómica de este material se efectuó en el Herbario Nacional Colombiano, en donde quedó depositado con el registro N° COL 480749.

El material vegetal se observó en el microscopio estereoscopio (Carlzeiss Jena) para la identificación de cada uno de los estadios del desarrollo de las inflorescencias, teniendo en cuenta cambios del tamaño, de la forma y del desarrollo. Se describió la morfología de cada una de las estructuras florales visibles. Los estadios seleccionados se fijaron en FAA, embebidos en parafina y seccionados con micrótopo rotatorio en cortes longitudinales y transversales de 10 μm ; posteriormente se sometieron a tinción con safranina-*fastgreen* (Johansen, 1940). Los principales eventos del desarrollo morfoanatómico floral fueron observados y fotografiados para su descripción en el microscopio óptico (Olympus, Japón). Para las inflorescencias se tomaron como base las descripciones de Moreno (1984).

1.2 ANÁLISIS QUÍMICO

Las condiciones para el análisis químico se realizaron según la metodología propuesta por Stashenko *et al.* (2004). Para el proceso de microextracción en fase sólida (*headspace*) (HS-SPME) de la fragancia de los diferentes estadíos de las inflorescencias de *L. camara*, se usó una fibra de poli (dimetilsiloxano)/divinilbenceno (PDMS/DVB, 65 μm) obtenida de *Supelco* Inc. (Bellefonte, PA, EE.UU.). Gases especiales para cromatografía fueron obtenidos de *Aga-Fano* S.A. (Bucaramanga, Colombia). Se muestreó la fase vapor a 22 ± 1 °C, de 0.7 g de planta, colocados en un frasco de 20 ml. El tiempo de pre-equilibrio del frasco fue de 15 min y el tiempo de exposición de la fibra fue de 40 min (la selección de este parámetro se basó en experimentos preliminares). Las sustancias extraídas fueron térmicamente desorbidas a 250 °C, durante 2 min, en un puerto de inyección del cromatógrafo de gases, usando un *liner* especial para SPME, de volumen reducido.

El análisis cromatográfico de las muestras se realizó en un GC *Hewlett-Packard* (HP) 5890A Serie II, equipado con un inyector *split/splitless* (250 °C, relación *split* 1:10) y un detector de ionización en llama (FID) (250 °C), por triplicado para cada muestra (tres estadíos, es decir, nueve muestras). Los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados con un programa HP *Chem Station* HP Rev. A.06.03. Para la separación de mezclas se usó una columna capilar apolar, HP-5 (*Hewlett-Packard*) de 30 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , d_f , con fase estacionaria de 5%-fenil-poli (metilsiloxano). La temperatura del horno fue programada de 45 °C (2 min) hasta 150 °C a razón de 5 min^{-1} . El gas de arrastre empleado fue helio (99.9995%, *Aga-Fano* S.A), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 15 psi y una velocidad lineal de 26 cm s^{-1} . El gas auxiliar fue nitrógeno (99.995%; *Aga-Fano* S.A), con una velocidad de flujo de 30 mL min^{-1} . Las velocidades de flujo para gases de combustión del FID, el aire y el hidrógeno, fueron de 300 y 30 mL min^{-1} , respectivamente. Los espectros de masas fueron

obtenidos por impacto de electrones con energía de 70 eV, en un CG *Agilent Technologies 6890 Plus* acoplado a un detector selectivo de masas *Hewlett Packard MSD 5972 (GC-MS)*, y equipado con un puerto de inyección *split/splitless (1:10)*, un inyector automático *Agilent 7863*, un sistema de datos *HP MS ChemStation (Versión 1.05)*, incluyendo las bases de datos *NBS 75K, WILEY 138K y ADAMS*. Se usó una columna capilar de sílice fundida, *HP-5MS* de 30 m x 0.25 mm, D.I., con la fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) de 0.25 mm de grosor. El gas de arrastre fue helio (99.9995%, *Aga- Fano, S.A.*), con una velocidad lineal de 35 cm s⁻¹. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 °C y 285 °C, respectivamente. Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) se obtuvieron en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), a 4.75 scan s⁻¹, en el rango de masas de *m/z* 40-350. La homogeneidad de cada pico cromatográfico fue revisada, obteniendo fragmentogramas de masas, basados en iones característicos de cada compuesto. La composición porcentual relativa de los metabolitos volátiles se halló promediando las áreas obtenidas con el detector FID sobre la columna apolar. Para la identificación de los compuestos se usaron espectros de masas e índices de retención de Kovàts (Kovàts, 1965) de componentes, que se compararon con los reportados en la literatura (Adams, 1995; Joulain & König, 1998). Los índices de Kovàts se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C₁₀ hasta C₂₅, corridos en el CG, bajo las mismas condiciones operacionales que los volátiles. Para su determinación se empleó la siguiente fórmula:

$$I_k = 100n + 100 \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{Rn} - t_{Rn-1}} \right]$$

Donde:

I_k: Índice de retención del compuesto de interés.

n: Número de átomos de carbono del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés.

t_{Rx} : Tiempo de retención del compuesto de interés.

t_{RN} y t_{Rn} : Tiempos de retención de n-alcanos que eluyen antes y después del compuesto x

1.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron descritos como media \pm error estándar de la media (SEM). Posteriormente, para establecer las diferencias significativas en la variación de los porcentajes relativos de los metabolitos secundarios volátiles de *L. camara* en los tres estadios de desarrollo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un vía tipo modelo lineal general (MLG), verificando previamente los supuestos de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Por la naturaleza de los datos (presentados en porcentajes), éstos fueron transformados usando la raíz del arco-seno con el fin de lograr una distribución normal (Zar 1999). Adicionalmente, se utilizó la prueba de Tukey para comparar las medias entre los diferentes estadios de desarrollo de los diferentes metabolitos encontrados. El criterio de significancia fue $p < 0,05$. Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa SPSS para Windows, versión 13.0.

2. RESULTADOS

L. camara presenta inflorescencias en cabezuelas glomerulares, las cuales se caracterizan por un desarrollo inicial a partir de meristemos axilares. Estos meristemos se modifican durante la ontogenia variando en su tamaño y estructura (hecho que se corrobora en el análisis al microscopio).

Fueron elegidos tres estadios de desarrollo. El Estadio I (E1, ca 2.5 mm) se caracterizó por su apariencia globosa y compacta (Fig. 1, A y B). Microscópicamente, en dicho estadio se aprecia un desarrollo inmaduro representado por grupos de células (yema inicial) (Fig. 1, C) en los cuales se inicia la diferenciación meristemática (Fig. 1, D). Se observa además, previas a la aparición de los órganos, brácteas (con pubescencia lasciniada y con tricomas glandulares), que permanecerán dando soporte y protección a la flor propiamente dicha y luego al fruto (Fig. 1, E y F).

El Estadio II (E2, ca. 4 mm) presenta notorios cambios estructurales que dan paso a una cabezuela globosa de mayor tamaño (Fig. 2, A y B). A nivel microscópico se diferencian cada vez más los verticilos florales, iniciando por el cáliz y la corola (Fig. 2, C). En este estadio los sépalos están fusionados en la parte apical para la protección al meristemo floral en desarrollo (Fig. 2, D). Se aprecian las estructuras que darán origen al gineceo y al androceo (Fig. 2, D) y cómo la bráctea, el cáliz y la corola protegen estos órganos; esta última en inicios del Estadio III (Fig. 2, E y F).

En el Estadio III (E3, ca. 20 mm) surge la corola tubular bilabiada de coloración externa rojiza e interna amarillenta, pentalobulada, con simetría hipocrateriforme irregular o zigomorfa, posterior al desarrollo de los cálices y exhibiendo un desarrollo similar a estos (Fig. 3, A y B). El cáliz es de color verde pálido, dentado,

de apariencia membranosa, tubular y pubescente, al igual que las brácteas (Fig. 3, B). De manera casi simultánea se diferencian y crecen, soldados en el interior y sobre la corola en elongación (epipétalos), los estambres en número de cuatro, con inserción perígina, didínamos, que en su origen se observan a la misma altura y tienen un color amarillo pálido, anteras ovadas ditectas y paralelas (Fig. 3, B y E). El gineceo se diferencia de forma ascendente, formando así el ovario, el estilo y el estigma. El ovario es monocarpelar, súpero, ovoide, con dos lóculos, cada uno con un óvulo de placentación axial-axial. El estilo es glabro y el estigma es terminal lateral, diviso bilobulado de aspecto pegajoso que indica receptividad (Fig. 3, B, C y D). De este modo, *L. camara* exhibe una maduración centrífuga (Fig. 3, A y F). Así mismo presenta una estivación imbricada quincuncial, donde los pétalos uno y dos (que son los más externos), cubren de forma inmediata a los pétalos tres y cuatro (los pétalos fusionados). Estos a su vez, se encuentran inmediatamente cubriendo al pétalo cinco, el cual es el más interno (Fig. 3, A). Microscópicamente, se observan las estructuras reproductoras de la planta. Al finalizar su periodo receptor, cada una de estas estructuras reproductoras se marchita y se originan los frutos drupáceos globosos que aún conservan las brácteas.

En cuanto a los resultados químicos, al igual que en la investigación realizada por Stashenko *et al.* (2004) en plantas de la familia Verbenaceae, para el caso de la especie *L. camara*, casi la totalidad de compuestos obtenidos en este estudio, fueron del tipo sesquiterpenoide (90%). En la Fig. 4 aparecen los metabolitos secundarios volátiles de flores de *L. camara*, aislados mediante HS-SPME en el Estadio I. Se identificaron 19 compuestos, en cantidades relativas >0.05% para este estadio (Ver Tabla 1), 22 para el estadio II (ver Tabla 1, Fig. 5) y 20 para el Estadio III (Tabla 1, Fig. 6).

En la Tabla 1 se muestra la cantidad relativa (% \pm SD, n=3) de los 29 metabolitos secundarios volátiles aislados de las inflorescencias de *L. camara* para los tres estadios de desarrollo seleccionados. Durante la ontogenia de la inflorescencia,

algunos de los metabolitos no se detectan en ciertos estadíos. Así, se puede mencionar el β -bourboneno detectado únicamente en el Estadío I, el 1,8-cineol detectado sólo en el II y el α -cedreno, que sólo fue detectado en el Estadío III. Esta es una condición presente en varios de los compuestos, al igual que las variaciones en sus cantidades relativas.

3. DISCUSIÓN

Los eventos ontogénicos ocurren para todas las especies, siendo importante saber dónde y cuándo se activan ciertos genes, pero también las dinámicas autoorganizadas que se generan a partir de las interacciones de éstos (Álvarez y Roces 2002). Como parte de la expresión fenotípica (tamaño, forma y desarrollo de verticilos) se establecieron tres estadios, el mismo número elegido por Garzón y Orozco (2006) para su estudio. El Estadio I finaliza, al verse la elongación y reacomodamiento celular que da paso a la aparición de los incipientes cáliz y corola. Así mismo, *L. camara* exhibe una maduración centripeta de los verticilos (brácteas, sépalos, pétalos, estambres y gineceo) y de cada una de las coloridas flores hermafroditas que conforman la inflorescencia, es decir, se aprecian flores ya abiertas en la parte distal de densos glomérulos (más de 25 flores), mientras en la parte central de la inflorescencia aún se presentan botones florales. Uno de los hechos representativos de ello es la necesidad de los pétalos para el surgimiento de los estambres debido a la posición epipétala de éstos. No obstante, el desarrollo de las inflorescencias a lo largo de las ramas de esta especie vegetal se da de manera acrópeta, observándose la disposición en filotaxia espiral al eje, de modo que las inflorescencias más desarrolladas se encuentran en la parte basal y en la apical se aprecian aún en botón.

A diferencia de los cuatro pétalos reportados por Muñoz *et al.* (2007) para *Lippia alba*, *L. camara* presenta cinco pétalos, dos de ellos fusionados dando la impresión de ser uno solo. Sin embargo, el aspecto zigomorfo, la bráctea que soporta a cada una de las flores que conforman la inflorescencia, el ovario súpero y los cuatro estambres epipétalos y didínamos se mantienen como característicos en las dos especies. La línea de ruptura para la liberación de los granos de polen se observó a lo largo de la antera, siendo de este modo, una dehiscencia longitudinal. Es notorio el aspecto receptivo que presenta el estigma, antes y

durante esta apertura, caracterizado por la producción de una sustancia mucilaginosa. Este fenómeno es reportado en otras especies vegetales como *Carica papaya* (Ronse y Smets 1999, Parés *et al.* 2002).

Las características de la organogénesis floral de *L. camara* corresponden a un patrón presente en la mayoría de las angiospermas. Los verticilos emergen siguiendo la regla de Hofmeister (los nuevos órganos se originan hacia la parte central en los espacios inmediatamente disponibles), al igual que lo reportado por Garzón y Orozco (2006) en su investigación con Solanaceas.

Múlgura de Romero *et al.* (2002) describen la exomorfología de las inflorescencias en Verbenáceas, mencionando el carácter sésil de las flores, excepto en algunas especies de *Aloysia*, *Xerolaosia*, *Stachytarpheta* sp. y *Chascanum* sp., donde se presentan cortos pedicelos. De igual modo, la escasa presencia de bracteolas florales que sólo se presentan en *Bouchea* y en *Chascanum*. Estas características generales se acogen a lo observado en este estudio para *L. camara*.

Los cambios que pueden presentarse entre las diferentes especies de Verbenáceas en cuanto a la disposición, espaciamiento y número de flores de las inflorescencias, son muy notorios a pesar de su cercanía (Múlgura de Romero *et al.* 2002). Así, *L. camara* y *L. alba* presentan caracteres compartidos en los eventos de su desarrollo floral, tales como la secuencia centrípeta en el surgimiento de los verticilos florales y la disposición que ellos adquieren, pero mantienen diferencias en cuanto al tipo de inflorescencia y sus frutos (drupáceos y secos respectivamente). Así mismo, *L. camara* y *Duranta erecta* se diferencian en que esta última presenta un cáliz con cinco sépalos, cuatro carpelos, estigma capitado y bractéolas, en contraste con las características ya mencionadas de la especie bajo estudio (Múlgura de Romero *et al.* 2002).

Una de las estructuras que siempre se encuentra presente en todos los estadios de desarrollo sobre las brácteas, los cálices y las corolas, son los tricomas (Fig. 1, F). Éstos, al parecer, están relacionados con la producción de metabolitos secundarios (aceites y volátiles) que atraen y repelen insectos y otorgan a la planta las diferentes propiedades que, por supuesto, tienen notorias implicaciones en el ambiente y sus organismos. Tal es el caso mencionado por Mann (1987), acerca de los metabolitos cardenolidos, presentes en las hojas de algunas plantas y cómo su consumo por parte de las larvas de la mariposa monarca las hacen desagradables a un extenso rango de depredadores. El mismo autor dice que algunos de los aleloquímicos son generados por activación fotoquímica y por la degradación de los compuestos originales producidos por la planta, que son luego liberados al ambiente. Esta característica que habla de la condición lumínica, fue tomada en cuenta, al igual que otros estudios hechos con Verbenáceas (Duarte y Cárdenas 2007), para la elección del medio día como horario de muestreo floral y su inmediato análisis químico.

Al contrastar los metabolitos encontrados en la presente investigación con los de otros estudios, igualmente de *L. cámara*, se aprecian diferencias significativas. Stashenko *et al.* (2004) reporta más de 35 metabolitos secundarios volátiles aislados del aceite esencial extraído de la mezcla de hojas y flores [(E- β -cariofileno (15%) y biciclosesquifelandreno (18%) como mayoritarios]. Por su parte Adeleke *et al.* (2004) encontró 39 compuestos en inflorescencias [sabineno (21.5%) y 1,8- cineol (14.8%) en mayor cantidad]. Virendra *et al.* (2005) reportan 30 compuestos en hojas [β -cariofileno (23.3%) y el α -humuleno (11.5%) como principales]. Randrianalijaona *et al.* (2005) reportan 50 compuestos en el aceite extraído de inflorescencias [sabineno (14.3%) y 1,8-cineol (1.0%) como mayoritarios]. Khan *et al.* (2003) obtuvieron más de 30 compuestos en flores [con el α -copaeno (10.7%) y el β -elemeno (14.5%) como componentes mayoritarios]. En este estudio, se identificaron 29 metabolitos (Ver Tabla 1), mediante HS-SPME. No obstante, esta diferencia en la diversidad de compuestos se puede ver

justificada al tener en cuenta los métodos de extracción empleados (Stashenko *et al.* 2004), las partes de la planta con sus estadíos de desarrollo sometidas a ellos, al igual que las condiciones geográficas, época de recolección de la muestra vegetal y constitución genética (Nickavar y Mojab 2000). Respecto a las investigaciones previamente citadas, reportamos el α -gurjuneno, el γ -amorfenol, el α -muuroleno, el sesquitujeno, el α -*trans*-bergamoteno y el *trans*-cadina-1,4-dieno, como compuestos hallados en *L. camara* sólo en este trabajo.

Al estudiar los compuestos volátiles correspondientes a cada uno de los estadíos seleccionados, se verificaron las variaciones en la cantidad relativa de éstos a medida que avanza el proceso de desarrollo floral, así como la presencia y ausencia de algunos de ellos (Tabla 1). En acuerdo con, Mann (1987) quien menciona que esta fluctuación está muy relacionada con el desarrollo del organismo, su estatus nutricional y los niveles de estrés ambiental (depredadores y adaptación, incluyendo cambios en los genes), entre otros. Bouwmeester *et al.* (1998) reportaron la síntesis de carvona a expensas del limoneno en frutos de alcaravea. En el presente estudio (Ver Tabla 1), al parecer algún proceso similar ocurre, ya que compuestos como el *trans*- β -farneseno, fue detectado sólo en el Estadío I con una considerable cantidad relativa (39.4%), así mismo el γ -elemeno y el γ -amorfenol. Acerca de la producción de metabolitos secundarios, Dudareva reporta (1996), que la expresión del gen responsable de la síntesis de metilbenzoato, en petunia, es suprimida por el etileno, y por su parte, Hallahan *et al.* (1995) y Bouwmeester *et al.* (1998) mencionan cómo los terpenos alcohólicos como el geraniol y el carveol son convertidos en aldehídos por una deshidrogenasa no específica, mientras el geranial y el neral son coproducidos por la oxidación del geraniol. No obstante, para la presente investigación con *L. camara*, estas transformaciones solo podrían confirmarse mediante un análisis químico como marcaje isotópico y el conocimiento de sus rutas metabólicas.

Es probable que para *L. camara* la expresión de los diversos genes en los verticilos florales, originen diferentes compuestos y en las contrastantes cantidades observadas (Tabla 1), como ha sido comprobado por Dudareva (1996) en flores de *Clarkia breweri* que emiten una fuerte fragancia a causa de su compuesto mayoritario: el s-linalool, un monoterpeno. Para ello, el gen Lis está altamente expresado en las células del estigma, del estilo y de las células epidérmicas de los pétalos, al igual que en los estambres. Mientras en *Clarkia concinna*, el gen Lis sólo es expresado en el estigma y a un nivel relativamente bajo.

El β -bourboneno, el γ -elemeno y el γ -amorfenol, se detectaron sólo en el Estadio I donde se aprecian las yemas en diferenciación, mientras el monoterpeno oxigenado 1.8-cineol se detectó junto con el α -*trans*-bergamoteno, sólo en el Estadio II, estadio en el cual las divisiones celulares y el cumplimiento del plan morfoanatómico permiten la estimación visual de lo que será cada uno de los órganos florales; otros metabolitos como el *trans*- β -cariofileno y el biciclosesquifelandreno estuvieron presentes en las tres etapas, es decir, hasta la presencia de los verticilos florales maduros. Recordamos que para esta investigación, fue tomada la inflorescencia en su conjunto. Para verificar los metabolitos y las cantidades producidas de forma individual, hubiese sido necesario el análisis de cada uno de los órganos por separado.

Acerca de la producción y emisión de compuestos volátiles, Dudareva (2000) y Gershenzon *et al.* (2000) mencionan que es regulada por procesos del desarrollo. Cuando las flores jóvenes aún no han hecho la dehiscencia, producen menos esencias y, por ello, son menos atractivas a los polinizadores. Lo anterior se encontró de forma similar para esta investigación; así, *L. camara* presenta la mayor variedad de compuestos volátiles durante el Estadio II (botón de flores) y III de desarrollo (Tabla 1). Algunas de las cantidades relativas de los metabolitos,

fueron aumentando a medida que avanzó la ontogenia (Tabla 1). Es probable entonces que permanecieran para este estadio de apertura floral, los compuestos necesarios cualitativamente y cuantitativamente para diversas funciones, entre ellas, la atracción de los polinizadores, reflejando así las preferencias olfatorias de éstos y haciendo que la planta produzca distintas fragancias, tal como cita Dudareva (1996). Igualmente persistirían y se incrementarían los metabolitos adecuados para proteger las flores en su anthesis y dehiscencia (Dudareva y Pichersky 2006). En relación con lo anterior, estudios realizados con las flores polinizadas de *Antirrhinum majus* y *Petunia sp.*, verificaron que se detiene la producción de esencias sólo después de que el polen ha encontrado el ovario, seguramente cuando la fertilización ha ocurrido (Dudareva 1996) y que además, el metilbenzoato, que es uno de los compuestos más abundantes encontrado en las flores de *Antirrhinum majus*, tiene regulada su emisión durante el desarrollo (Dudareva *et al.* 2000). Así mismo, algunos de los compuestos que en el estadio III no son detectados en *L. camara* (Tabla 1), tales como el *trans*- β -farneseno y el *trans-trans*- α -farneseno, dejarían de ser sintetizados durante algún acontecimiento ocurrido a través del proceso ontogénico. Algo similar ocurrió también en estudios realizados por Tollsten (1993) con *Platanthera bifolia* (Orchidaceae) y por Schiestl *et al.* (1997) y Schiestl y Ayasse (2001) con la orquídea *Ophrys*, en la cual, los cambios en la emisión de las sustancias volátiles luego de la polinización, incluyeron una disminución general de todos los componentes de las esencias o una reducción en algunos de los compuestos mientras otros se incrementaron o permanecieron sin cambiar.

Varios estudios se han realizado para reportar las diversas funciones que se presumen para los metabolitos secundarios (incluidos los volátiles). Una de estas funciones es aumentar la tolerancia de la fotosíntesis a las temperaturas altas, estabilizando las membranas tilacoidales (Sharkey *et al.* 2001) o controlando las especies con oxígeno reactivo (Loreto y Velikova 2001). Se ha discutido también

la posibilidad de que estas sustancias actúen en la comunicación planta-planta (Arimura *et al.* 2000, Dicke y Bruin 2001, Engelberth *et al.* 2004), además de minimizar el daño extenso de los tejidos (Dicke y Van Loon 2000) y actuar como repelentes de los herbívoros y patógenos (Andersen *et al.* 1994, DeMoraes *et al.* 2001, Kessler y Baldwin 2001). Estos volátiles inducidos por los herbívoros, podrían tener adicionalmente papeles fisiológicos dentro de la planta, al ser descargados como consecuencia de su volatilidad y solubilidad desde la membrana. Compuestos como el isopreno, algunos monoterpenos y sesquiterpenos, tienen el potencial para combinarse con varias especies de oxígeno reactivo (radicales libres), protegiendo contra el daño interior oxidativo (Hoffmann *et al.* 1997, Bonn y Moortgat 2003). Las próximas investigaciones requieren el estudio de la importancia de los volátiles para la fisiología de la planta (Dudareva 2004).

BIBLIOGRAFIA

Adams, R.P. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.

Adeleke A., Olusegun, E., Koenig W. and Yadua P. 2004. Essential Oil of *Lantana camara* L. var. *aculeata* from Nigeria. J. Essent. Oil Res., 16: 582-584.

Álvarez E y Roces B. 2002. La diversidad de las formas vegetales. Variaciones sobre un mismo tema. Ciencias. 65: 18-28.

Andersen RA., Hamilton TR., Hildebrand DF., McCracken CT Jr., Collins RW., Fleming PD. 1994. Structure-antifungal activity relationships among volatile C₆ and C₉ aliphatic aldehydes, ketones and alcohols. J. Agric. Food. Chem. 42: 1563-1568.

Arimura G., Ozawa R., Shomoda T., Nishioka T., Boland W., Takabayashi J. 2000 Herbivory-induced volatiles elicit defense genes in lima bean leaves. Nature 406: 512-515.

Basu S., Ghosh A., Hazra B., 2005. Evaluation of the antibacterial activity of *Ventilago madraspatana* Gaertn., *Rubia cordifolia* Linn. and *Lantana camara* Linn.: Isolation of emodin and physcion as active antibacterial agents. Phytother. Res.19: 888-894.

Bonn B., Moortgat GK. 2003. Sesquiterpene ozonolysis: origin of atmospheric new particle formation from biogenic hydrocarbons. Geophys. Res. Lett., 30: 1585-1593.

Bouwmeester HJ., Gershenzon J., Konings M., Croteau R. 1998. Biosynthesis of the monoterpenes Limonene and Carvone in the Fruit of Caraway. Demonstration of enzyme activities and their changes with development. *Plant Physiol.* 117: 901-912.

Brukhin V., Michel H., González N., Chevalier C., Mouras A. 2003. Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry. *Sex Plant Reprod.* 15: 311-320.

Carrillo R., Díaz de Ramírez A. 2006. Actividad antimalárica de extractos acuosos de *Lantana camara* L., *Verbena littoralis* L. y *Heliotropium indicum* L. en ratones infectados con *Plasmodium berghei*. *Rev. Fac. Farma.* 48: 14-20.

De Moraes C., Mescheer M, Tumlinson J. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females. *Nature* 410: 577-580.

Dicke M., Bruin J. 2001. Chemical information transfer between plants: back to the future. *Biochem. Syst. Ecol.* 29: 981-994.

Dicke M., Van Loon J. 2000. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomol. Exp. Appl.* 97: 237-249.

Duarte S., Cárdenas C., Martínez J., Stashenko E. 2007. Estudio de la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por la destilación extracción con solvente simultánea de hojas de *Lippia alba* (fam. Verbenaceae). *Scientia Et Technica.* 13: 83-85.

Dudareva, N. & E. Pichersky. 2006. *Biology of floral Scent.* Taylor & Francis Group. Nueva York.

Dudareva N., Pichersky E and Gershenzon J. 2004. Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiol.* 135:1893-1902.

Dudareva N., Murfitt L., Mann C., Gorenstein N., Kolosova N., Kish C., Bonham C., Wood K. 2000. Developmental regulation of methylbenzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers. *Plant Cell.* 12: 949-961.

Dudareva N., Cseke L., Blanc V., Pichersky E. 1996. Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell.* 8: 1137-1148.

Engelberth J., Alborn H., Schmelz E., Tumlinson J. 2004. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 1781-1785

Garzón J., Orozco C. 2006. Organogénesis floral en *Acnistus arborescens*, *Dunalia solanacea*, *Deprea bitteriana*, *Larnax glabra* and *Larnax hawkesii*- tribu Physaleae (Solanaceae). *Caldasia.* 28: 227-242.

Gershenzon J., McConkey M., Croteau R. 2000. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiol.* 122: 205-213.

Ghisalberti E. 2000. Review *Lantana camara* L. Verbenaceae. *Fitoterapia.* 71: 467-486.

Gupta M. 1995. 270 plantas medicinales iberoamericanas. CYTED-SECAB. Bogotá. Colombia. p. 617.

Hallahan D., West J., Wallsgrove R., Smiley D., Dawson G., Pickett J., Hamilton J. 1995. Purification and characterization of an acyclic monoterpene primary alcohol:NADP⁺ oxidoreductase from catmint (*Nepeta racemosa*). *Arch. Biochem. Biophys.* 318: 105-112.

Hoffmann T., Odum J., Bowman F., Collins D., Klockow D., Flagan R., Seinfeld J. 1997. Formation of organic aerosols from the oxidation of biogenic hydrocarbons. J. Atmos. Chem. 26: 189-212.

Hufford L & Diggle P. 1997. The morphology and evolution of flowers: a tribute to the work of Shirley Tucker: an introduction. Int. J. Plant Sci. 158: 1-2.

Johansen D. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co. Nueva York. USA. p. 523.

Joulain D., König W. 1998. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. Verlag, Hamburgo. p. 331, 351, 473.

Kessler A., Baldwin I. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. Science. 291: 2141-2144.

Khan S., Srivastava K., Neetu J., Syamasundar K., Anju K. 2003. Chemical composition of fruit and stem essential oils of *Lantana camara* from northern India M. Flavour Fragrance J. 18: 376-379.

Kovats E. 1965. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. Adv. Chromatogr. 1: 229-247.

Loreto F., Velikova V. 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. Plant Physiol. 127: 1781-1787

Mann J. 1987. Secondary Metabolism. Second Edition. Oxford Science Publications. Nueva York. p. 23, 30.

Moreno N.. 1984. Glosario Botánico Ilustrado. Primera Edición. Compañía Editorial Continental. México.

Múlgura de Romero M., Martínez S., Atkins S., Rotman A. 2002. Morfología de las inflorescencias en Verbenáceas, Verbenoideae III. Darwiniana. 40: 1-15.

Muñoz A., Vallejo F., Sánchez M. 2007. Morfología y anatomía de las flores y semillas de pronto alivio. Acta Agronómica. 56: 7-11.

Nickavar B., Mojab F., 2000. Hydrodistilled volatile constituents of *Calamintha officinalis* Moench from Iran. J. Essent. Oil Bear. Plants. 8: 23-27.

Ocampo R., Valverde R. 2000. Manual de cultivo y conservación de plantas medicinales. Tomo I. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical. Costa Rica. p. 97-100.

Parés J., Basso C., Jáuregui D. 2002. Momento de antesis, dehiscencia de anteras y receptividad estigmática en flores de lechosa (*Carica papaya* L.) cv. Cartagena amarilla. Bioagro. 14 :17-24.

Randrianalijaona J., Panja A., Rasoarahona R., Gaydou E. 2005. Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. Essential oils from Madagascar. Anal. Chim. Acta. 545: 46-52.

Ronse L., Smets E. 1999. The floral development and anatomy of *Carica papaya* (Caricaceae). Can. J. Bot. 77: 582-598.

Schiestl F., Ayasse M. 2001. Post-pollination production of a repellent compound in a sexually deceptive orchid: a new mechanism for maximising reproductive success? Oecologia. 126: 531-534.

Schiestl F., Ayasse M., Paulus H., Erdmann D., Francke W. 1997. Variation of floral scent emission and post pollination changes in individual flowers of *Ophrys sphegodes* subsp. *sphogodes* (Miller). J. Chem. Ecol. 23: 2881-2895.

Seyoum A., Kabiru E., Lwande W., Killeen G., Hassanali A., Knols B. 2002. Repellency of live potted plants against *Anopheles gambiae* from human baits in semi-field experimental huts. Am. J. Trop. Med. Hyg. 67 :191-195.

Sharkey TD., Chen XY., Yeh S. 2001. Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. Plant Physiol. 125: 2001-2006.

Stashenko E., Jaramillo B., Martínez J. 2004. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. Rev. Acad. Col. Cienc. Exact. Fis. Nat. 27: 579-597.

Tollsten L. 1993. A multivariate approach to post-pollination changes in the floral scent of *Platanthera bifolia* (Orchidaceae). Nord. J. Bot. 13:495-499.

Virendra S., Prasad D., Blazquez A. 2005. Chemical Composition of the Leaf Oil of *Lantana camara*. J. Essent. Oil Res. 17: 198-200.

Yang D., Zhang Z., Lu A., Sun K., Liu J. 2002. Floral organogénesis and development of two taxa in the tribe Hyoscyameae (Solanaceae) *Przewalskia tangutica* and *Hyoscyamus niger*. Acta Bot. Sinica. 44: 889-894.

SPSS para Windows. 2004. Versión 13.0. Chicago: SPSS Inc. [programa informático en CD-ROM]. Disponible en SPSS Inc. Página web de SPSS disponible en: <http://www.spss.com/>

Zar J. 1999. Biostatistical Analysis. Cuarta Edición. Prentice Hall. p. 273-281.

ANEXO A. Tabla 1. Promedios \pm SD de cantidad relativa de metabolitos volátiles en *L. camara* durante tres estadios del desarrollo ontogénico, número de pico e índices de Kovats. Significancia según test de Anova, letras diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas, según el test de Tukey ($p < 0.05$).

No pico	Índice Kovats	Compuesto	Cantidad relativa, %			
			Estadio I	Estadio II	Estadio III	P
1	1031	1,8-Cineol	ND	1.2 \pm 0.03	ND	-
2	1340	δ -Elemeno	0.7 \pm 0.04 a	1.3 \pm 0.09 b	0.9 \pm 0.07 a	$p < 0.001^{**}$
3	1352	α -Cubebeno	1.0 \pm 0.06 a	4.2 \pm 0.10 b	3.5 \pm 0.11 c	$p < 0.001^{**}$
4	1379	α -Copaeno	0.7 \pm 0.02 a	1.3 \pm 0.09 b	0.7 \pm 0.05 a	$p < 0.01^*$
5	1388	β -Bourboneno	0.3 \pm 0.01	ND	ND	-
6	1393	β -Cubebeno*+ β -Elemeno	1.1 \pm 0.03 a	2.4 \pm 0.05 b	3.7 \pm 0.05 c	$p < 0.001^{**}$
7	1408	Sesquitujeno	ND	0.7 \pm 0.03 a	1.4 \pm 0.08 b	$p < 0.01^*$
8	1413	α -Gurjuneno	0.3 \pm 0.02	ND	ND	-
9	1417	α -Cedreno	ND	ND	0.8 \pm 0.11	-
10	1427	<i>E</i> - β -Cariofileno	17.0 \pm 0.12 a	9.2 \pm 0.11 b	13.0 \pm 0.08 c	$p < 0.001^{**}$
11	1433	β -Copaeno	1.1 \pm 0.07 a	3.3 \pm 0.10 b	4.9 \pm 0.09 c	$p < 0.001^{**}$
12	1437	α - <i>E</i> -Bergamoteno	ND	1.4 \pm 0.11	ND	-
13	1437	γ -Elemeno	1.7 \pm 0.04	ND	ND	-
14	1452	α -Humuleno	ND	2.0 \pm 0.10 a	2.3 \pm 0.09 b	$p < 0.01^*$
15	1463	<i>E</i> - β -Farneseno	39.4 \pm 0.40	ND	ND	-
16	1465	<i>allo</i> -Aromadendreno	ND	2.2 \pm 0.07 a	1.5 \pm 0.06 b	$p < 0.01^*$
17	1483	γ -Muuroleno+ γ -Curcumeno	ND	10.5 \pm 0.09 a	14.4 \pm 0.0 b	$p < 0.001^{**}$
18	1487	Biciclosesquifelandreno	17.6 \pm 0.04 a	31.1 \pm 0.04 b	24.2 \pm 0.07 c	$p < 0.001^{**}$
19	1499	α -Zingibereno	ND	9.3 \pm 0.04 a	13.1 \pm 0.07 b	$p < 0.001^{**}$
20	1500	γ -Amorfenoleno	1.5 \pm 0.02	ND	ND	-
21	1503	NI	0.8 \pm 0.04	ND	ND	-
22	1504	α -Muuroleno	1.7 \pm 0.09 a	3.2 \pm 0.11 b	3.0 \pm 0.09 c	$p < 0.001^{**}$
23	1505	<i>E,E</i> - α -Farneseno	3.3 \pm 0.07 a	2.2 \pm 0.10 b	ND	-
24	1513	β -Curcumeno*	ND	2.5 \pm 0.08 a	4.0 \pm 0.05 b	$p < 0.01^*$
25	1517	γ -Cadineno	2.6 \pm 0.04 a	2.5 \pm 0.07 a	1.6 \pm 0.06 b	$p < 0.001^{**}$
26	1525	δ -Cadineno	4.6 \pm 0.08 a	5.1 \pm 0.09 b	3.0 \pm 0.07 c	$p < 0.001^{**}$
27	1534	<i>E</i> -Cadina-1,4-dieno	ND	0.7 \pm 0.08 a	0.6 \pm 0.06 b	$p < 0.001^{**}$
29	1539	α -Cadineno	1.1 \pm 0.04 a	0.5 \pm 0.02 b	0.2 \pm 0.01 c	$p < 0.01^*$
30	1559	Germacreno B	1.2 \pm 0.08 a	0.5 \pm 0.05 b	0.7 \pm 0.09 c	$p < 0.001^{**}$

** Probabilidades altamente significativas

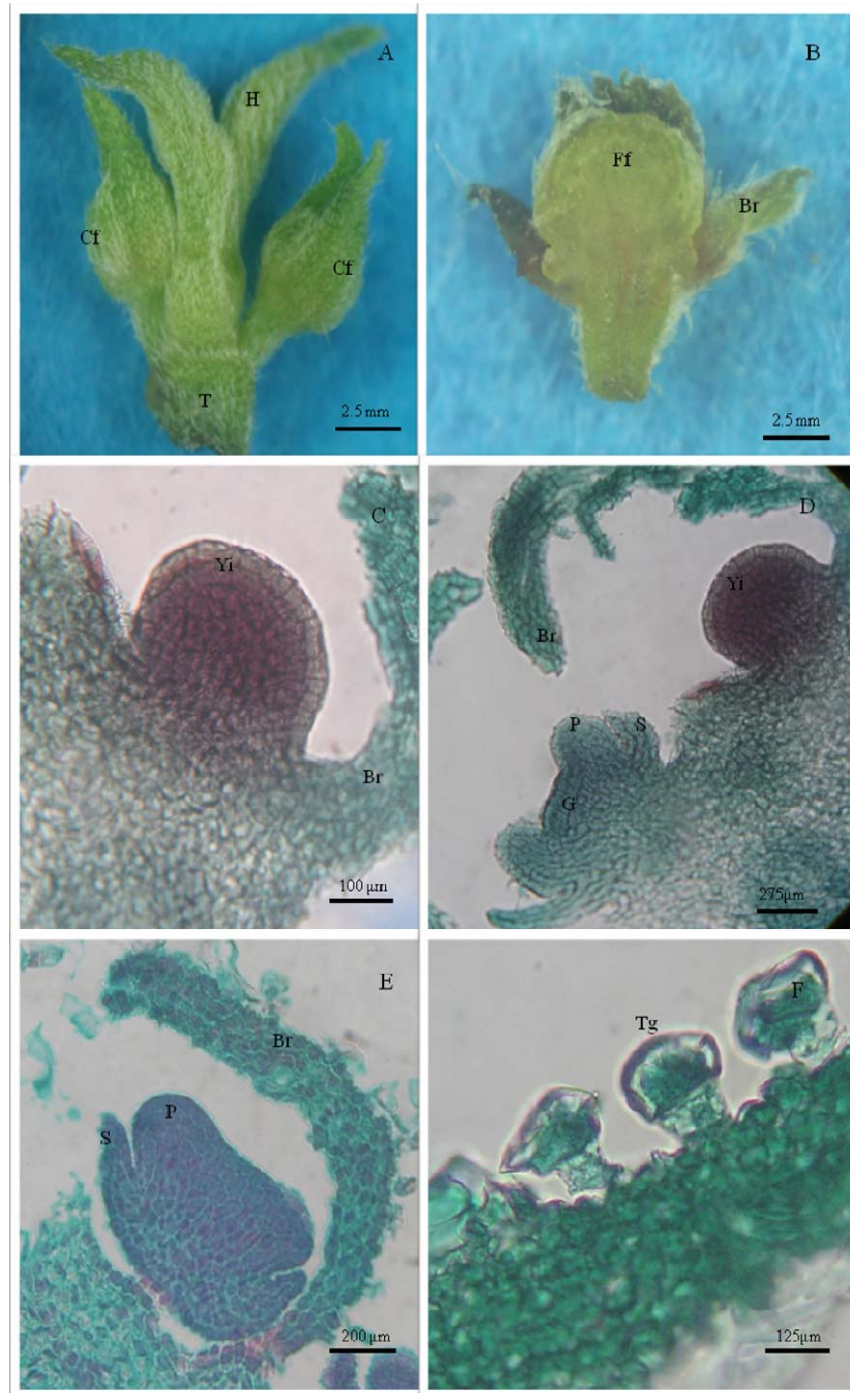
* Probabilidades significativas

◆ Identificado tentativamente

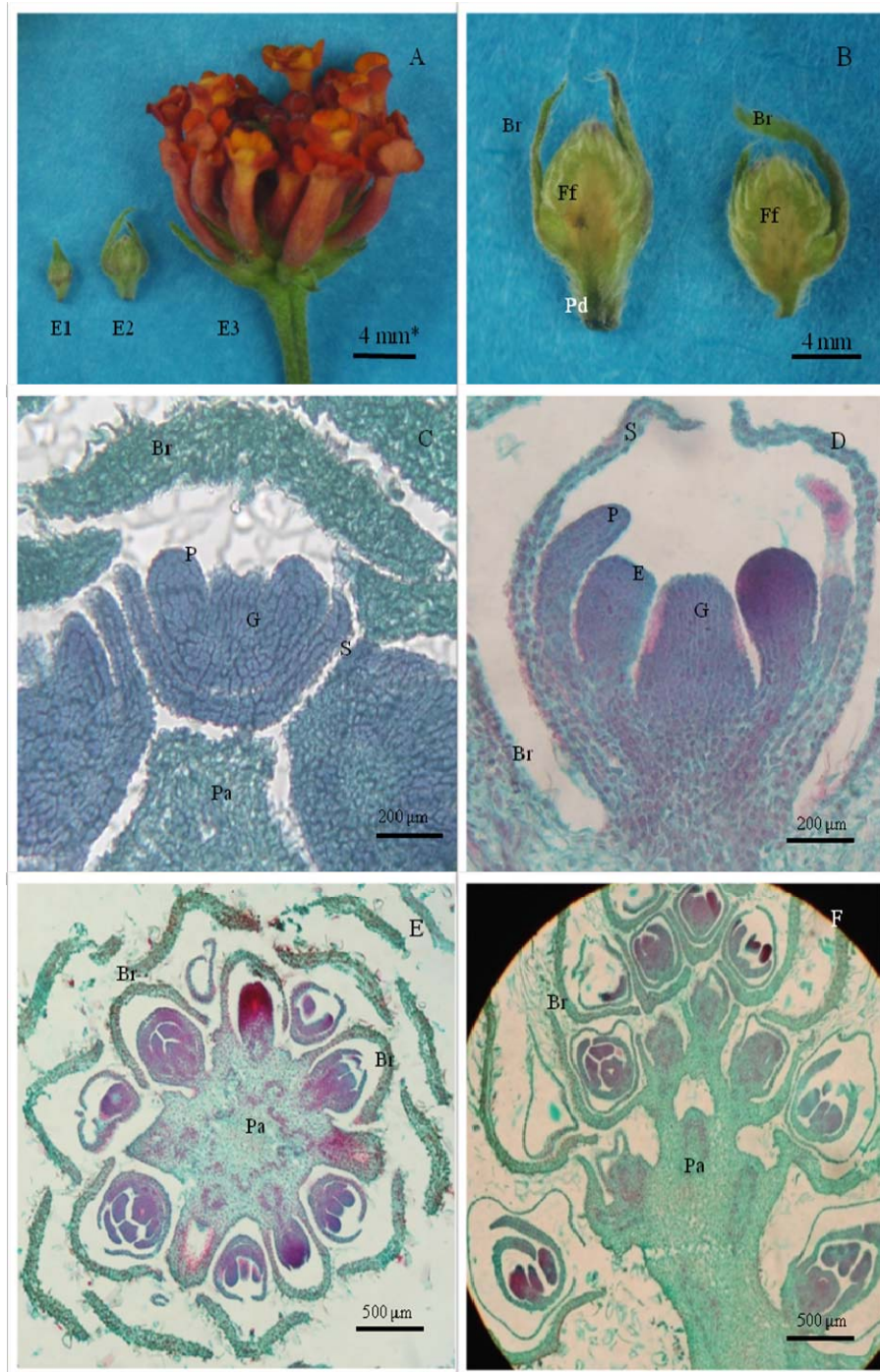
ND= No Detectado

P: Probabilidad

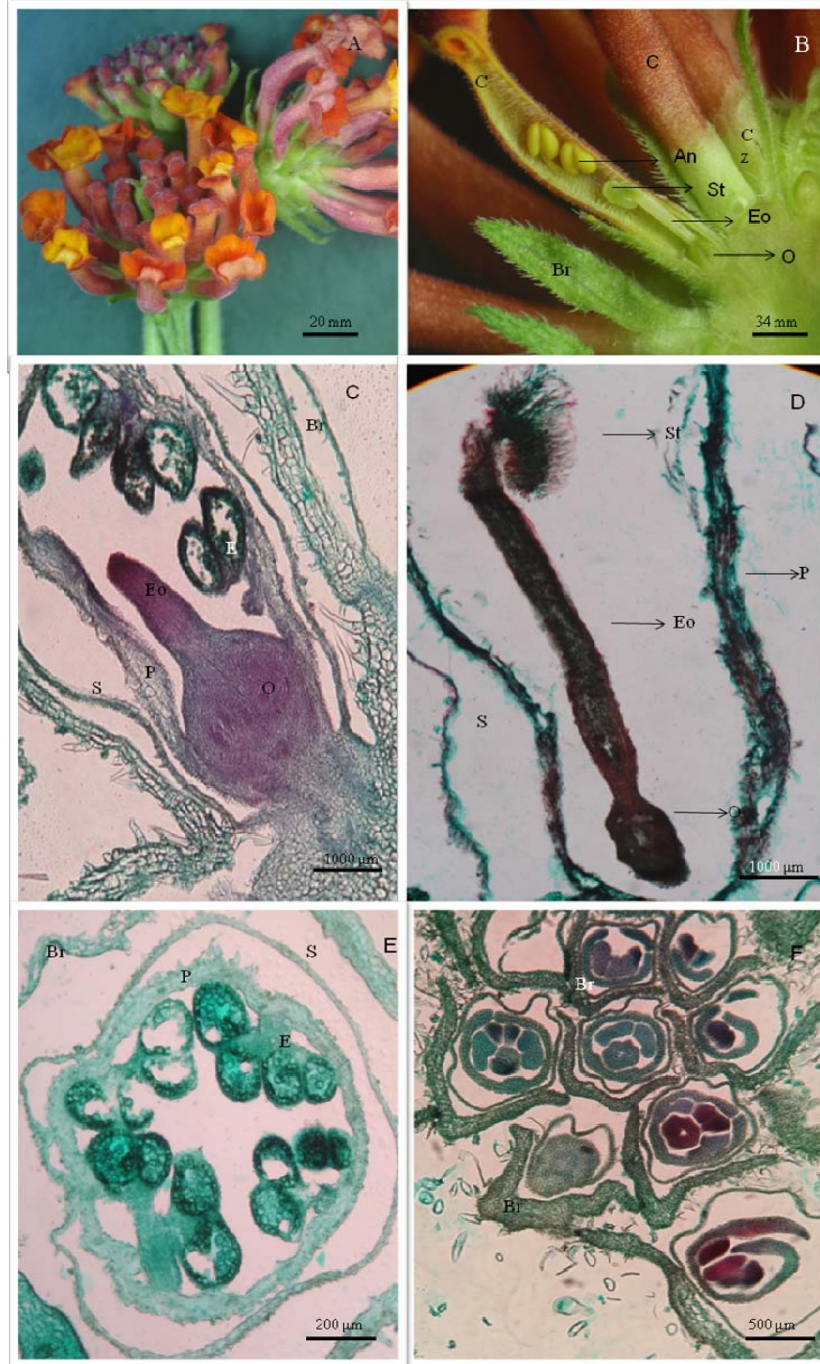
ANEXO B. Figura 1. Botón de flores (A y B) y cortes longitudinales (C, D, E, F) característicos del estadio I. Abreviaturas: Yi: yema inicial; Br: bráctea; P: pétalos; S: sépalos; G: gineceo; Tg: tricoma glandular; H: hojas; T: tallo; Cf: cabezuela floral; Ff: flores en formación.



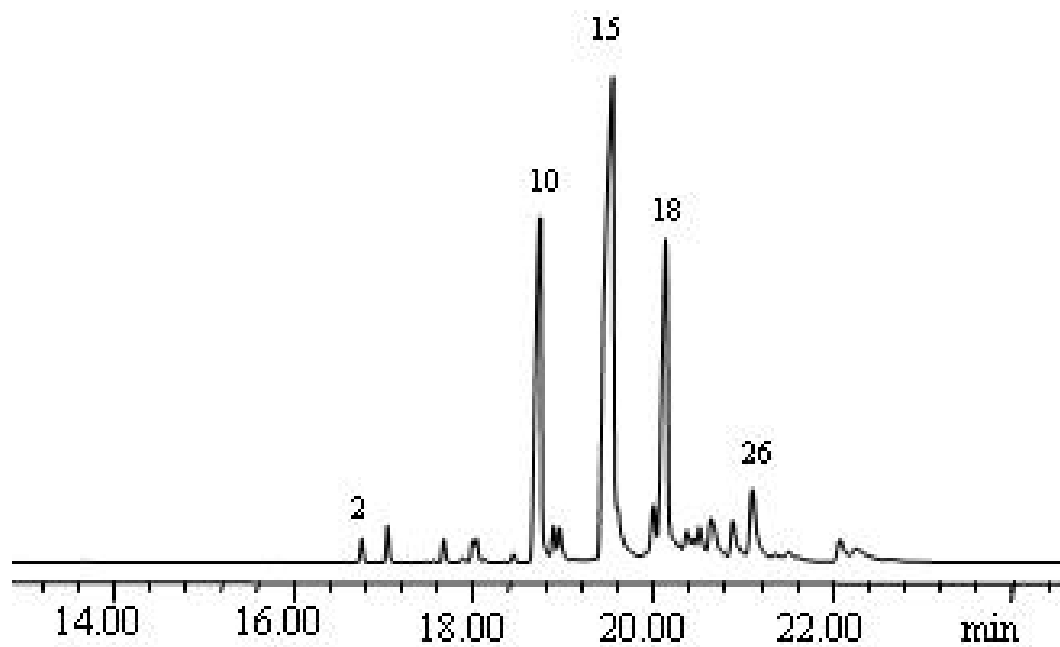
ANEXO C. Figura 2. Botones florales (A y B), cortes longitudinales (C, D, F) y transversal (E) característicos del estadio II. Abreviaturas: Ff: flores en formación; Br: brácteas; Pd: pedicelo; P: pétalos; S: sépalos; E: estambres; G: gineceo; Pa: parénquima; E1: estadio I; E2: estadio II; E3: estadio III. (*) Tamaño del estadios II.



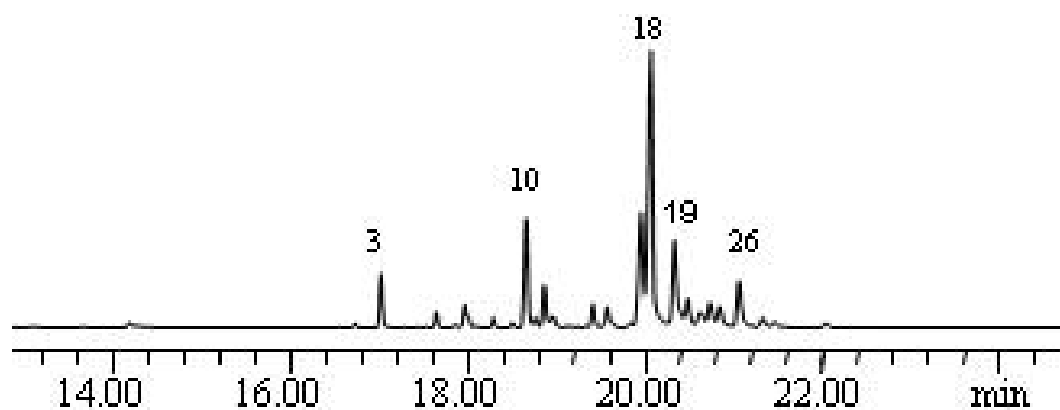
ANEXO D. Figura 3. Inflorescencias en su máximo desarrollo (A, B) y cortes longitudinales (C, D, F) y transversal (E) correspondientes al estadio III. Abreviaturas: Br: brácteas; C: corola; An: antera; St: estigma; Eo: estilo; O: ovario; Cz: cáliz; P: pétalos; E: estambres; S: sépalos.



ANEXO E. Figura 4. Cromatograma (CG-MS) de los metabolitos secundarios volátiles de las inflorescencias de *L. camara*, obtenidos en el estadio I, por HS-SPME. La identificación de los picos se reporta en la Tabla 1.



ANEXO F. Figura 5. Cromatograma (CG-MS) de los metabolitos secundarios volátiles de las inflorescencias de *L. camara*, estadio II, obtenido por HS-SPME. La identificación de los picos se reporta en la Tabla 1.



ANEXO G. Figura 6. Cromatograma (CG-MS) de los metabolitos secundarios volátiles de las inflorescencias de *L. camara*, estadio III, obtenido por HS-SPME. La identificación de los picos se reporta en la Tabla 1.

