

00565



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**“METODOS PARA LA VALORACION DE LA DROGA CRUDA OBTENIDA  
A PARTIR DE LA ESPECIE *Hippocratea excelsa* HBK.  
(HIPPOCRATEACEAE).”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS  
(CONTROL DE MEDICAMENTOS)**

P R E S E N T A:

**Q.F.B. BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ**

México, D.F.

277311

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO.**

Presidente: Dra. Helgi Jung Cook

Vocal: Dr. Mario González de la Parra Yrigoyen

Secretario: Dr. Andrés Navarrete Castro

Primer suplente: Dr. Robert Bye Buttler

Segundo suplente: M. en C. Carlos Ramos Mundo

**Sitio donde se desarrollo el tema:**

Laboratorio 124, del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM.

Sustentante:

---

Q.F.B. Blanca Estela Rivero Cruz.

Asesor:

---

Dra. Rachel Mata Essayag.

## AGRADECIMIENTOS.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los siguientes proyectos: “Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America” (NIH GRANT5UO1TWI\*\*00316-03); DGAPA (Dirección General de Asuntos de Personal Académico) IN 205197 y CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) 27978N.

Al CONACyT y al proyecto “Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America” por las becas otorgadas para la realización de mis estudios de maestría. También agradezco al SNI por la beca de ayudante de Investigador Nacional otorgada a partir del mes de Agosto de 1999.

Deseo agradecer de manera muy especial a la creadora del presente proyecto de investigación, mi asesora, Dra. Rachel Mata de Espíndola por su invaluable apoyo y dirección.

A Mónica Espíndola Mata por su valiosa ayuda en la corrección del estilo.

Al Dr. Andrés Navarrete Castro y al M. en C. José Fausto Rivero Cruz por la valiosa ayuda en varios aspectos técnicos a lo largo del desarrollo del presente trabajo de tesis.

A la M. en C. Rosa María Ramírez-Gama y a la Q.F.B. Beatriz Luna Millán (Facultad de Química, UNAM) por sus valiosos consejos con relación a las técnicas de recuento utilizadas durante la determinación de la posible contaminación microbiana de las muestras vegetales objeto del presente estudio.

Al Dr. Blas Lotina Henssen por permitirme el uso del espectrofotómetro Beckman Du-600 para realizar la cuantificación de fenoles totales.

Al M. en C. Alfonso Lira Rocha por permitirme el uso del horno mufla para la determinación de cenizas totales.

A los Q.F.B. Alfredo Pérez Martínez y Adriana Campos Chirinos por su valiosa asesoría en la determinación de metales pesados.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios.

## **Dedicatorias**

A la memoria de mi Padre.

A mi Madre. Por el gran amor que a diario me das y porque para mí eres el principal motivo que me impulsa a ser cada día mejor.

A Isabel por ser el complemento perfecto de mis sentimientos y porque hoy y siempre mi único deseo es contar a diario con tu linda presencia.

A Fausto por tu cariño, entusiasmo y sensibilidad de hermano para conmigo.

A mis amigos: Mirza, Kay, Irma, Griselda, Adriana, Carmen, Lourdes, Samuel y Daniel por concederme el enorme privilegio de contar con grandes amigos como ustedes.

Mi más profundo agradecimiento a la Dra. Rachel Mata de Espíndola, quien con un gran afecto y paciencia me impulsó a realizar este trabajo. Gracias por su presencia inigualable en mi vida.

## ÍNDICE

Resumen	iii
Abstract	iv
Lista de Cuadros	v
Lista de Esquemas	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de Tablas	vii
<b>I. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>10</b>
2.1 Antecedentes sobre la especie <i>Hippocratea excelsa</i> HBK.	
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>25</b>
3.1 Material vegetal.	25
3.2 Determinación de elementos extraños.	25
3.3 Fragmentación del material vegetal.	25
3.4 Ensayos de identidad.	26
3.4.1 Características macroscópicas y organolépticas de la droga entera.	26
3.4.2 Ensayos Químicos de identidad de un grupo particular de compuestos en la droga pulverizada.	26
3.4.3 Análisis por cromatografía en capa fina.	27
3.5 Ensayos de pureza.	28
3.5.1 Determinación de humedad.	28
3.5.2 Determinación de cenizas.	28
3.5.3 Determinación de material extraíble.	29
3.5.4 Determinación del índice de hinchamiento.	30
3.5.5 Determinación del límite microbiano.	30
3.5.6 Detección de microorganismos patógenos.	31
3.5.7 Determinación de metales pesados.	34
3.5.8 Determinación del contenido de catequina y de fenoles totales mediante el método de Price y Butler.	34
3.5.9 Evaluación de los parámetros de calidad del método analítico.	35
3.5.9.1 Especificidad/Selectividad.	35
3.5.9.2 Linearidad.	35
3.5.9.3 Exactitud.	36
3.5.9.4 Precisión.	
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>38</b>
4.2 Ensayos de identidad.	40

4.2.1 Elementos extraños	42
4.2.2 Características macroscópicas de la droga cruda	42
4.2.3 Características macroscópicas de la droga pulverizada	43
4.3 Ensayos de pureza	49
4.3.1 Humedad	50
4.3.2 Cenizas	51
4.3.3 Material extraíble	52
4.3.4 Índice de hinchamiento	52
4.3.5 Determinación de la contaminación microbiana	53
4.3.5.1 Determinación del límite microbiano	55
4.3.5.1.1 Método de recuento en placa	55
4.3.5.1.2 Método de dilución serial (NMP)	55
4.3.5.2 Determinación de microorganismos patógenos	57
4.3.6 Determinación de metales pesados	71
4.4 Ensayos químicos conducentes a la cuantificación de principio(s) activo(s)	72
4.4.1 Método para cuantificación de fenoles totales	74
4.4.1.1 Especificidad/Selectividad	74
4.4.1.2 Linearidad	77
4.4.1.3 Exactitud	81
4.4.1.4 Precisión	82
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>85</b>
<b>VI. PERSPECTIVAS GENERALES DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN</b>	<b>86</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO I. PROPUESTA DE MONOGRAFÍA</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO II. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO III. RESULTADOS OBTENIDOS PARA VALIDAR EL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINA</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>110</b>

## Resumen

Durante la década pasada, el desarrollo de medicamentos a partir de plantas medicinales ha sido un tópico de importancia global. Actualmente, se estima que en muchos países desarrollados una amplia proporción de la población utiliza esta medicina alternativa para la atención primaria de problemas de salud. En la Unión Europea todos estos preparados se someten a un riguroso control de calidad o estandarización para garantizar la calidad y asegurar la continuidad de las propiedades farmacológicas de los mismos. En México, sin embargo, el empleo y comercialización de los remedios herbolarios se lleva a cabo ante un vacío de normatización y control por parte del Estado.

En este contexto, en el presente trabajo se describen los resultados derivados de la investigación realizada para establecer los procedimientos para evaluar el control de calidad de la especie *Hippocratea excelsa* HBK. (Hippocrateaceae), planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana por sus propiedades antiulcéricas. El protocolo metodológico desarrollado servirá para evaluar de manera eficiente la calidad de la especie *H. excelsa*, ya sea a nivel de droga cruda o como parte de preparados fitofarmacéuticos.

De manera específica, los parámetros de calidad establecidos incluyen: ensayos de identidad (determinación de elementos extraños, identificación macroscópica tanto de la droga cruda como de la droga pulverizada), ensayos de pureza (humedad, cenizas, material extraíble, índice de hinchamiento, contaminación microbiológica y metales pesados) y ensayos químicos conducentes a la cuantificación del principio activo epicatequina, responsable en gran medida de las propiedades antiulcéricas de la especie vegetal. El método desarrollado para la cuantificación de la epicatequina fue objeto de un riguroso proceso de validación.



## Abstract

During the past decade, traditional systems of medicine have become a topic of global importance. Current estimates suggest that, in many developing countries, a large proportion of the population relies heavily on traditional practitioners and medicinal plants to meet primary health care needs. Although modern medicine may be available in these countries, herbal medicines (phytomedicines) have often maintained popularity for historical and cultural reasons. Concurrently, many people in developed countries have begun to turn to alternative or complementary therapies including medicinal herbs.

In México the herbal medicines market is poorly regulated, and herbal products are often neither registered nor controlled.

In this context, the purpose of the present study is to establish the strategy to evaluate the quality of the raw material of *Hippocratea excelsa* HBK. The root of this species is highly valued in Mexican traditional medicine for the treatment of gastric ulcers. Quality is defined as the status of a drug, which is determined either by identity, purity, content, and other chemical, physical or biological properties.

The result of the present investigation could be useful for the elaboration of a pharmacopea monograph. The purpose of such a monograph is to provide scientific information on the safety, efficacy, and quality control assurance of widely used medicinal plants.

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Criterios de calidad para drogas crudas y preparaciones fitofarmacéuticas.	4
Cuadro 2.	Productos herbolarios que contienen cancerina.	14
Cuadro 3.	Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie <i>Hippocratea excelasa</i> HBK.	16
Cuadro 4.	Microorganismos de referencia empleados para los diferentes ensayos.	34
Cuadro 5.	Relación de mercados en la ciudad de México.	41
Cuadro 6.	Porcentaje de elementos extraños encontrados en las muestras de prueba.	42
Cuadro 7.	Valores de <i>Rf</i> de los diversos metabolitos utilizados como estándares.	49
Cuadro 8.	Contenido de cenizas totales e insolubles en ácido encontrados en las muestras de prueba.	51
Cuadro 9.	Resultados de la determinación de material extraíble en diferentes disolventes.	52
Cuadro 10.	Resultados de la determinación del índice de hinchamiento en las muestras de prueba.	53
Cuadro 11.	Número más probable de microorganismos encontrados en las muestras.	57
Cuadro 12.	Reacciones bioquímicas de las muestras de prueba y de la especie <i>E. coli</i> .	64
Cuadro 13.	Reacciones bioquímicas de las muestras de prueba y de la especie <i>Salmonella typhi</i> .	67
Cuadro 14.	Características de validación para métodos analíticos.	74
Cuadro 15.	Resumen de la regresión lineal simple.	77
Cuadro 16.	Resultados experimentales para evaluar la linealidad del sistema.	78
Cuadro 17.	Análisis de variancia para la regresión lineal simple.	79
Cuadro 18.	Resultados experimentales para evaluar la linealidad del método.	80
Cuadro 19.	Resumen de la regresión lineal simple.	81
Cuadro 20.	Resultados experimentales para evaluar la exactitud del método.	82
Cuadro 21.	Datos experimentales para evaluar la precisión del sistema (repetibilidad).	83
Cuadro 22.	Datos experimentales para evaluar la precisión del método.	83
Cuadro 23.	Datos experimentales para evaluar la precisión intermedia (reproducibilidad).	83
Cuadro 24.	Resumen del análisis de variancia para los datos indicados en el Cuadro 23.	84
Cuadro 25.	Resultados experimentales para evaluar la linealidad del sistema.	105
Cuadro 26.	Resumen de la regresión lineal simple.	105

Cuadro 27.	Datos experimentales para evaluar la linealidad del método.	106
Cuadro 28.	Resumen de la regresión lineal simple.	107
Cuadro 29.	Datos experimentales para evaluar la precisión del sistema.	108
Cuadro 30.	Datos experimentales para evaluar la precisión del método.	108
Cuadro 31.	Datos experimentales para evaluar la reproducibilidad.	109
Cuadro 32.	Resumen del análisis de variancia para los datos indicados en el Cuadro 31.	109

### LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Obtención de materias primas, extractos y principios activos para la elaboración de preparados fitofarmacéuticos y medicamentos.	3
------------	--	---

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Puesto de plantas medicinales en el mercado de Sonora (D.F.).	7
Figura 2.	<i>Hippocratea excelsa</i> HBK.	11
Figura 3.	(a) Yagabil, preparado medicinal elaborado con distintas plantas medicinales, entre ellas la cancerina; (b) Cápsulas elaboradas con cancerina.	13
Figura 4.	Ordenación típica de los tejidos en una corteza.	22
Figura 5.	(a) Corte transversal de la felodermis; (b) células radiales taniníferas, con almidón, parénquima axial y fibras de extremos romos.	24
Figura 6.	Cromatograma en capa fina de diferentes muestras de <i>Hippocratea excelsa</i> HBK.	47
Figura 7.	Cromatograma en capa fina de diferentes muestras de <i>Hippocratea excelsa</i> HBK.	48
Figura 8.	Efecto de las diluciones en el desarrollo del número de colonias bacterianas (Muestra B).	56
Figura 9.	Efecto de las diluciones en el desarrollo del número de colonias bacterianas ( <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739).	59
Figura 10.	Morfología macroscópica de las colonias bacterianas desarrolladas en las superficies de agar MacConkey y agar EMB.	62
Figura 11.	Morfología macroscópica de las colonias bacterianas desarrolladas en las superficies de agar SS, agar XLD, agar sulfito de bismuto y agar verde brillante.	65
Figura 12.	Morfología macroscópica de las colonias bacterianas desarrolladas en las superficies de agar sangre de carnero, agar Vogel Johnson y agar manitol salado.	69

Figura 13.	Morfología macroscópica de las colonias bacterianas desarrolladas en las superficies de agar cetrimida.	70
Figura 14.	Espectro de absorción al UV-Visible de la matriz de trabajo (blanco).	75
Figura 15.	Espectro de absorción al UV-Visible del extracto metanólico de la especie <i>Hippocratea excelsa</i> HBK.	75
Figura 16.	Espectro de absorción al UV-Visible de la matriz de trabajo enriquecida con 50 µg de ácido gálico.	76
Figura 17.	Espectro de absorción al UV-Visible de la matriz de trabajo enriquecida con 50 µg de catequina.	76
Figura 18.	Gráfica de linealidad, en la que se ilustra la relación directamente proporcional entre las variables (Concentración vs. Densidad óptica).	79
Figura 19.	Relación lineal entre la variable X (Concentración) y la variable Y (Densidad óptica).	81
Figura 20.	Gráfica de linealidad, en la que se demuestra la relación directamente proporcional entre la respuesta (Densidad óptica) y la concentración.	106
Figura 21.	Relación lineal entre la variable X (Concentración) y la variable Y (Densidad óptica).	107

#### LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Porcentajes de gastroprotección inducidos por el extracto, fracciones y compuestos puros aislados de <i>H. excelsa</i> HBK.	21
Tabla 2.	Número Más probable para usar con diluciones decimales y cinco tubos por dilución.	58

## **I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

En el siglo XIX, el desarrollo de medicamentos a partir de plantas medicinales fue el resultado de un intenso proceso de investigación médica que abarcó varios decenios del siglo y modificó sustancialmente el uso popular o tradicional que habían tenido estos recursos durante siglos. En esta época surgieron los primeros productos farmacéuticos industriales, que bajo la forma de jarabes, extractos, tinturas y pomadas, buscaron ofrecer una mejor dosificación de los productos naturales y, sobre todo, hacerlos accesibles a los habitantes de las crecientes ciudades, para quienes el uso de plantas medicinales bajo la forma tradicional de infusiones elaboradas con las plantas, colectadas en su ámbito natural resultaba poco práctico (Lozoya, 1993).

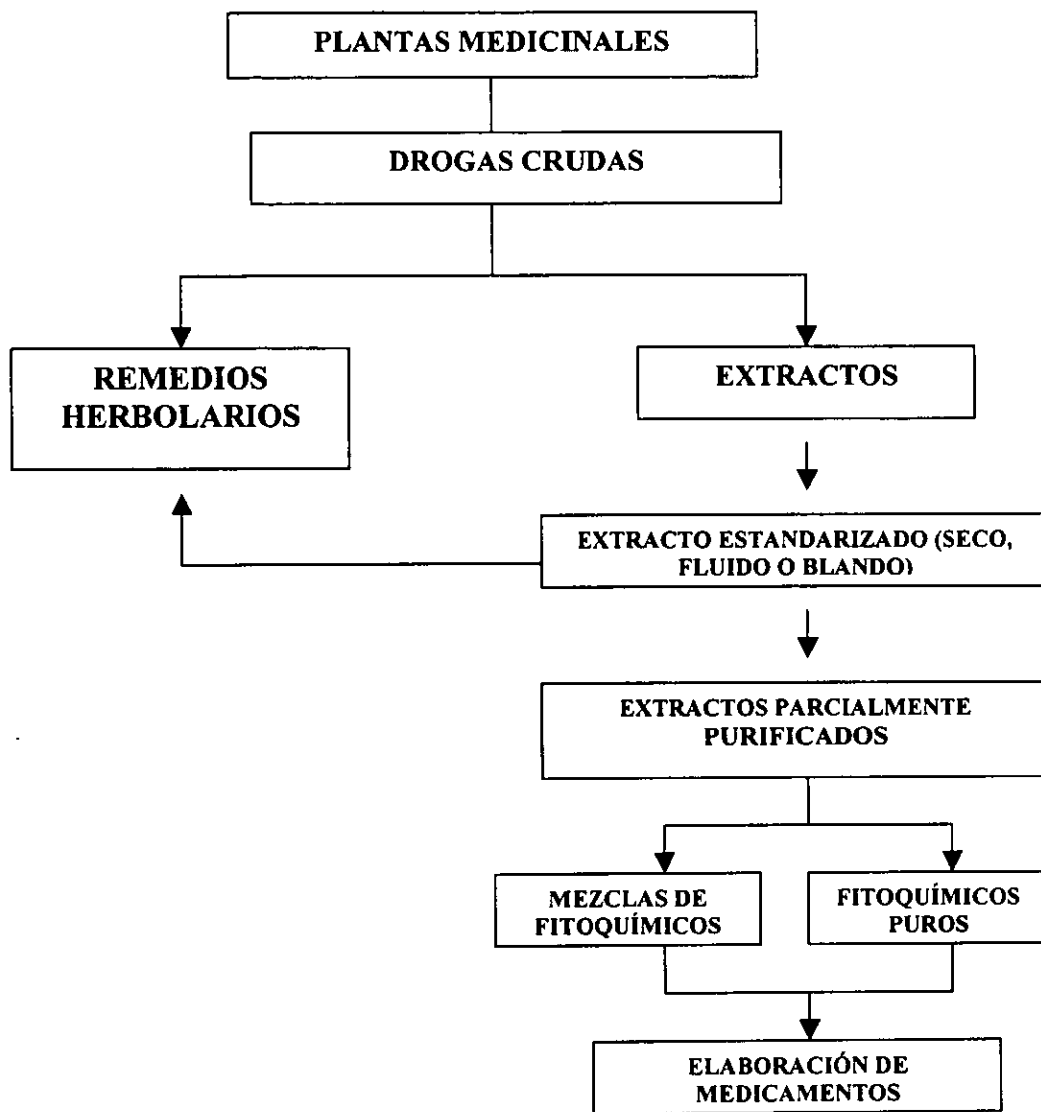
En el presente siglo, y a medida que se desarrolló la química orgánica, especialmente la de síntesis, la herbolaria medicinal, utilizada hasta entonces por la industria como materia prima para la elaboración de los mencionados productos galénicos empezó a ser vista como un recurso anacrónico. Si bien la persistencia en el uso de las plantas de importancia medicinal como la valeriana, la quinina, la digital, la ipecacuana, la amapola y el cornezuelo de centeno, por tan solo mencionar algunas, confirmaban la importancia histórica de estos recursos vegetales, se propuso una nueva estrategia para la obtención de medicamentos: la síntesis total de los principios activos responsables del efecto terapéutico, los cuales se aíslan a partir de la fuente natural. Esta circunstancia determinó que la investigación de nuevas plantas medicinales dejara, poco a poco, de ser una actividad prioritaria, por lo que el interés de los investigadores y la asignación de los recursos económicos se dirigió, preferentemente, hacia la química de síntesis (Lozoya, 1993).

Afortunadamente en los últimos años ha tenido lugar un “renacimiento” de la investigación de plantas medicinales en el mundo y hoy presenciamos el resurgimiento de “medicamentos herbolarios” novedosos en Europa, Asia y Estados Unidos de América del

Norte. La mayoría de estos productos que se comercializan a nivel industrial, provienen de plantas de reconocido uso en la medicina popular (Lozoya, 1993).

El crecimiento anual en el consumo de medicamentos herbolarios ha sido constante desde 1985. En 1992 fue del 15% en la Unión Europea; 8% en el resto de Europa; 12% en América del Norte y el suroeste de Asia, y de un 15% en Japón, India y Pakistán. El incremento anual proyectado de este consumo es para el periodo comprendido entre los años 1993 y 2000, del 8% para la Unión Europea; 12% para el resto de Europa; Norteamérica y el suroeste asiático y 15% para Japón, Pakistán e India (Keller, 1991; Hersch, 1996). Cabe destacar que, la mitad del gasto europeo en fitomedicamentos corresponde a Alemania; este país constituye uno de los principales centros de comercio de plantas medicinales en el mundo (Wichtl, 1988; Elisabetsky, 1991; Keller, 1991; Hersch, 1996).

En escasos 10 años han surgido numerosas industrias europeas y asiáticas que se dedican a la elaboración de medicamentos y/o preparaciones herbolarias, generando un mercado sorprendente. En general, los productores elaboran sus productos mediante la aplicación de la tecnología moderna más avanzada. Algunos de estos productos han sido investigados, desde el punto de vista de su baja o nula toxicidad y el beneficio de industrializarlos se ha fundamentado con base en la eficacia demostrada por las drogas crudas y sus derivados en las prácticas médicas populares (Prance, 1991; Wijesekera, 1991, Lozoya, 1993). En el Esquema 1 se resume la estrategia utilizada para la comercialización de estos productos, ya sea como drogas crudas, formas fitofarmacéuticas, extractos estandarizados, o extractos parcialmente purificados, entre otros. En la Unión Europea, Japón y Estados Unidos de América del Norte, estos preparados se someten a un riguroso control de calidad o estandarización para garantizar su calidad, seguridad y eficacia. En el Cuadro 1 se indican los criterios básicos de calidad que se aplican tanto a las drogas crudas como a los preparados fitofarmacéuticos (Bauer, 1998).



**Esquema 1.** Obtención de materias primas, extractos y principios activos para la elaboración de preparados fitofarmacéuticos y medicamentos.

**Cuadro 1. Criterios de calidad para drogas crudas y preparaciones fitofarmacéuticas.**

- Definición
- Identidad
  - Características sensoriales
  - Cromatogramas (huellas digitales)
- Pureza
  - Humedad
  - Cenizas
  - Constantes físicas
  - Residuos de disolventes
  - Contaminación microbiológica
  - Materiales extraños
    - Residuos tóxicos
    - Metales pesados
    - Residuos de pesticidas
    - Aflatoxinas
  - Radioactividad
  - Adulteraciones
- Composición
  - Contenido de principio activo o compuesto marcador
  - Actividad biológica

Aún cuando el análisis químico es la parte más importante en la estandarización, también forman parte del proceso de control de calidad los siguientes aspectos:

1. En el caso de las materias primas o de las drogas crudas es importante registrar la información sobre el lugar y período de cosecha, período de vegetación, tratamiento durante la cosecha (pesticidas), proceso de secado y condiciones de almacenamiento (uso de fumigantes) (Bonati, 1991).
2. En el caso de extractos se debe registrar la información sobre el método de producción (tamaño de partícula, tipo de extracción, disolvente de extracción, método de concentración, proceso de purificación y adición de excipientes) y condiciones de almacenamiento (Bonati, 1991).
3. Los productos puros deben estar identificados plenamente por comparación con estándares.



Para el registro oficial de los medicamentos herbolarios en Europa se requiere la elaboración de una monografía que incluya los siguientes aspectos: una descripción detallada de las propiedades curativas del medicamento (aspectos etnomédicos), estudios farmacológicos, químicos, toxicológicos y clínicos de las plantas medicinales que integran el producto o, en su caso, de la preparación propuesta. Deberá documentarse también, si existen riesgos por sobredosificación, las posibles contraindicaciones y los efectos indeseables. Cabe hacer notar que los aspectos de tipo fitoquímico son fundamentales para el procedimiento de manufactura y estandarización de la preparación (Wichtl, 1988; Artiges, 1991; Keller, 1991; Reuter, 1991; Bauer, 1998, WHO, *Monographs on selected medicinal plants*, 1999).

México no está exento de la influencia de los cambios ocurridos en el desarrollo y comercialización de este nuevo tipo de medicamentos. Es por ello, que han surgido compañías que procuran competir en la producción de medicamentos herbolarios, diseñando productos cuya presentación comercial depende del grado de acceso que se tenga a la tecnología moderna y a la información, a nivel nacional. Estos medicamentos herbolarios se fundamentan igualmente en el uso tradicional de las mismas, que en algunos casos se remonta a los tiempos prehispánicos. De acuerdo a un inventario realizado por investigadores del Instituto Nacional Indigenista (INI), en México existen alrededor de 3015 especies medicinales, las cuales son utilizadas por un gran sector de la población para tratar la sintomatología de los padecimientos más comunes. Sin embargo, el porcentaje de especies botánicas estudiadas desde un punto de vista farmacológico es relativamente bajo, y si bien es cierto que en los últimos 20 años la investigación científica de plantas medicinales en México se ha destacado por un notable avance en estudios etnobotánicos, farmacológicos y químicos, el nivel de conocimiento de los recursos herbolarios nacionales es aún insuficiente en comparación con lo logrado en otros países, ya que son escasas las plantas medicinales que han podido cursar por las diferentes etapas del proceso de investigación que permitan la validación farmacológica de su uso en la terapéutica tradicional (Lozoya, 1993; Bye *et al.*, 1995). La gran mayoría de

plantas que se emplean para la elaboración de estos productos se recolectan en su ámbito natural puesto que son escasas las plantas medicinales que se cultivan en México con fines industriales. De ahí que la calidad de los productos sea precaria (Lozoya, 1993; Hersch, 1996).

Pendientes del interés del público por consumir plantas medicinales, las empresas nacionales procuran proveer productos novedosos que tengan repercusión comercial, introduciendo, por ejemplo, preparaciones de plantas con efectos antitusígenos, antiulcéricos, antidiarréicos y espasmolíticos, las cuales son elaboradas con base en las recetas de las Farmacopeas mexicanas de tiempos pasados. Estas circunstancias determinan el cuadro general que tiene el consumo de plantas medicinales en el México actual y que va desde el ancestral puesto de hierbas frescas en miles de mercados del país, hasta el consumo de productos procesados industrialmente con muy diversos niveles de calidad y fundamentación pero que se distribuyen en los mercados urbanos, donde la población busca productos vegetales medicinales como formas curativas alternas (Lozoya, 1993).

En el caso de los mercados, y a manera de ejemplo, en la ciudad de México el de Sonora (Figura 1), en su calidad de plaza constituye uno de los principales centros para la compra-venta al mayoreo y menudeo de las plantas medicinales. Este mercado constituye un catálogo de la diversidad florística de nuestro país, ya que reúne una considerable variedad de plantas medicinales frescas o secas de toda la nación. Los vendedores suelen exponer su mercancía en locales fijos, sobre planchas de concreto o en el suelo. Éstos se surten de recolectores o acopiadores de distintas regiones del país, con quienes mantienen un estrecho contacto. Entre los mercados mayoristas, es el que provee una gran parte de las plantas medicinales que los detallistas distribuyen luego a la población del Distrito Federal. La venta de plantas medicinales se realiza por kilo, fracciones de kilo o al tanteo. Este mismo mercado participa en el abastecimiento a otras ciudades e incluso algunos de sus locatarios llegan a exportar su producto al extranjero. Entre los productos mexicanos solicitados en el extranjero en 1984, figuraban el cuachalalate, importado por empresarios



**Figura 1.** Puesto de plantas medicinales en el mercado de Sonora (D.F.).

japoneses; el aloe vera, por holandeses; el llantén, la ortiga, la salvia, el romero, el espriego y la quina por venezolanos; el toronjil, por bolivianos; y algunas hierbas medicinales laxantes por norteamericanos (Hersch, 1996).

Por otra parte, en México también ha tenido repercusión la propuesta de la OMS, la cual surgida en los años setenta, sugiere revalorar la medicina tradicional y sus plantas medicinales. En este contexto, este organismo internacional planteó la necesidad de elaborar monografías específicas para cada droga vegetal, con métodos generales de control de calidad y que enfatizara el impulso de prácticas adecuadas de manufactura, así como la recopilación de datos botánicos, químicos, biológicos y de tipo farmacognóstico. Aunque en grado insuficiente y con numerosas dificultades, por tratarse de una estrategia que se contrapone a la tendencia médica y científica predominante, algunas instituciones mexicanas han realizado estudios de investigación etnobotánica, farmacológica y química de plantas medicinales. No obstante, el nivel de conocimiento científico de los recursos

herbolarios nacionales es aún deficiente en comparación con lo logrado en otros países, ya que son pocas las plantas medicinales que han podido cursar por las diferentes etapas del proceso de investigación que exigen los actuales lineamientos oficiales y que son los que determinan la aceptación formal de un medicamento. Cabe destacar, que el desinterés oficial de muchos años por la herbolaria medicinal, se reflejó en una legislación inadecuada y en la falta de información accesible de los médicos sobre temas de herbolaria (Lozoya, 1993; Hersch, 1996).

Dentro de este panorama, y considerando el incremento general que tiene el consumo de medicamentos herbolarios en el México actual, en el mes de febrero de 1997, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el Reglamento de Insumos para la Salud. Dicho Reglamento considera de manera explícita en sus artículos 66-71, 88-98 y 129-130 las condiciones que, para su registro, autorización y venta deben cumplir dichos productos. Así mismo, en el mes de Diciembre de 1999, se publicó en el mismo documento una lista de plantas prohibidas para la elaboración de tisanas, infusiones y aceites vegetales comestibles. Las modificaciones a la legislación mexicana actual sobre el registro de este nuevo tipo de productos *abre una nueva e indispensable perspectiva en la investigación nacional de los recursos vegetales utilizados con fines terapéuticos*. Estas investigaciones implican el estudio farmacognóstico detallado de estas especies.

En este contexto, las normas mexicanas deben apoyarse en la experiencia e información científica que ha sido reunida en el país por los diversos grupos de investigación interesados en el estudio de plantas medicinales, con la finalidad de establecer las monografías de los recursos vegetales más utilizados en la terapéutica, que comprenda los aspectos etnobotánicos, farmacológicos, químicos, toxicológicos y clínicos de las plantas medicinales que integren un determinado producto fitoterapéutico. Asimismo, estas normas deben contemplar, el desarrollo de procedimientos analíticos que permitan el control de calidad tanto de las drogas y drogas crudas como de preparados fitofarmacéuticos derivados de estos recursos vegetales.

Con base en las consideraciones anteriores el presente trabajo de investigación tiene como objetivo primordial establecer una estrategia que permita la evaluación de la calidad de la droga cruda derivada de la especie *Hippocratea excelsa* HBK. (Hippocrateaceae), la cual es ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana por sus propiedades antiulcéricas. Se espera que los resultados derivados del presente trabajo constituyan la base para la elaboración de una monografía (Apéndice I) que eventualmente se incorpore a una nueva edición de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Esta monografía debe contener, además de los procedimientos de control de calidad, información científica relacionada con la seguridad y eficacia de la especie medicinal *H. excelsa* HBK. La monografía así integrada servirá de base para establecer de manera eficiente las regulaciones sanitarias correspondientes por parte de las autoridades de salud.

Para el cumplimiento del objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Establecer los parámetros de identidad de la droga cruda mediante métodos botánicos, químicos y cromatográficos.
- 2.- Evaluar una serie de parámetros de calidad que permitan determinar la pureza de la droga cruda, incluyendo materias y partes extrañas, humedad, cenizas, material extraíble, contaminación microbiológica, residuos tóxicos (metales pesados y residuos de otros vegetales) y adulteración.
- 3.- Establecer y validar un método analítico para la valoración del contenido de epicatequina; principio activo antiulcérico más potente detectado a la fecha en la especie.

Es necesario dejar en claro que los resultados que deriven del presente trabajo no permitirán el establecimiento de especificaciones farmacopeicas ya que representan el análisis simultáneo de tres muestras de la droga cruda, dos de las cuáles se eligieron de manera aleatoria.

## II. ANTECEDENTES

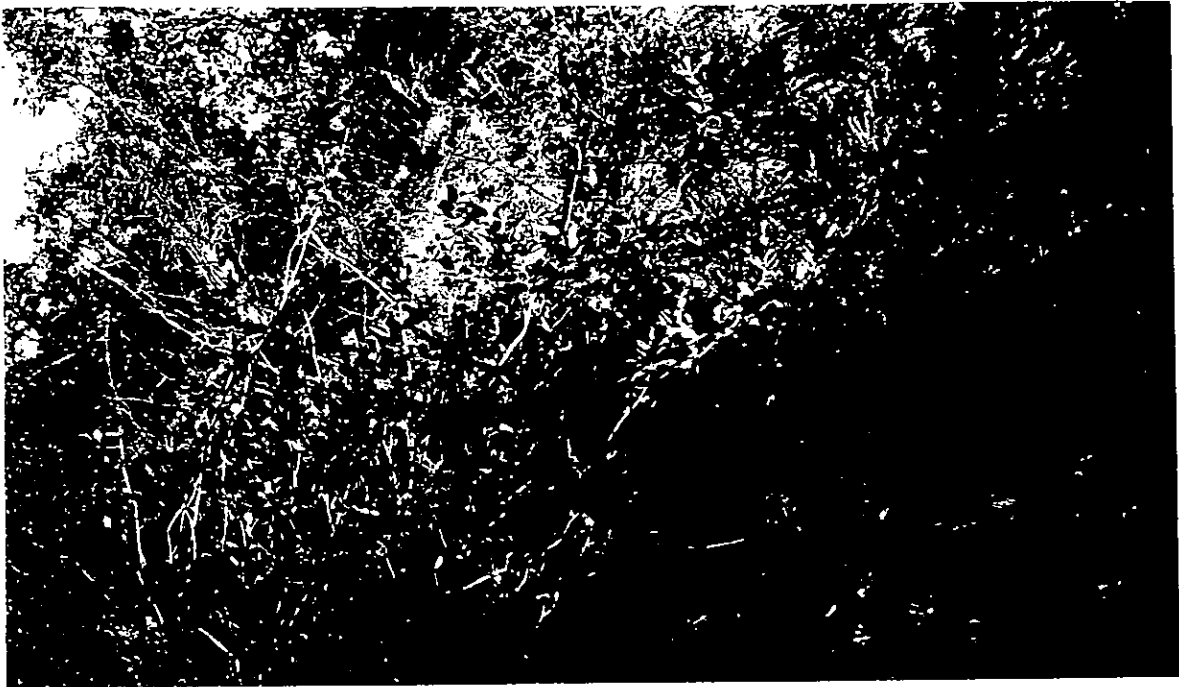
### 2.1. ANTECEDENTES SOBRE LA ESPECIE *HIPPOCRATEA EXCELSA* HBK.

La especie *Hippocratea excelsa* HBK. (Hippocrateaceae) (Figura 2) se encuentra distribuida en México en los estados de Durango, Estado de México, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Yucatán (Smith, 1940; Argueta *et al.*, 1981). Los individuos de esta especie son bejucos leñosos que llegan a medir hasta 17 metros de largo y poseen una corteza café-rojiza (Argueta *et al.*, 1981).

En México, la corteza café-rojiza de las raíces de *H. excelsa* HBK., conocida popularmente con el nombre de “cancerina”, se utiliza para tratar el cáncer de la piel, úlceras gástricas, enfermedades renales y trastornos orgánicos en la mujer. Las semillas y las hojas se utilizan para el tratamiento de los piojos y otros ácaros, de ahí, que en las zonas rurales la especie se designe con el nombre de “mata piojo” (Argueta *et al.*, 1981).

*Hippocratea excelsa* HBK. es una de las especies con mayor demanda en los mercados, por lo que su proceso de recolección y flujo comercial se encuentra bien caracterizado. A continuación, se mencionan algunas características relacionadas exclusivamente con el proceso de recolección de este vegetal: para su cosecha, la raíz de la planta se saca del suelo con una barreta y se procede a limpiarla quitándole la tierra y las raíces que contiene. Éste es un procedimiento arduo por la profundidad que las raíces alcanzan y por su adherencia a la tierra. Posteriormente, se separa la corteza de la raíz para ser machacada, con un palo o una piedra, y es expuesta al sol para secarla; es así como adquiere su característico aspecto de “telaraña costrosa”, posteriormente se encostala para su traslado. El trabajo de recolección lo realizan dos personas, quienes en tres días llegan a recoger cuatro kilos del material vegetal (Hersch, 1996).

La recolección de la raíz de cancerina puede hacerse durante todo el año, pero en tiempo de lluvias aumenta el riesgo para el recolector por la presencia de víboras y plantas espinosas cercanas a la planta. Actualmente, la intensidad de extracción de la cancerina en la zona ha resultado en que su abasto proceda básicamente de Guerrero, zonas aledañas a



(a)



(b)



(c)

Figura 2. (a) *Hippocratea excelsa* HBK., (b) raíz de *H. excelsa* y (c) corteza de raíz desecada.

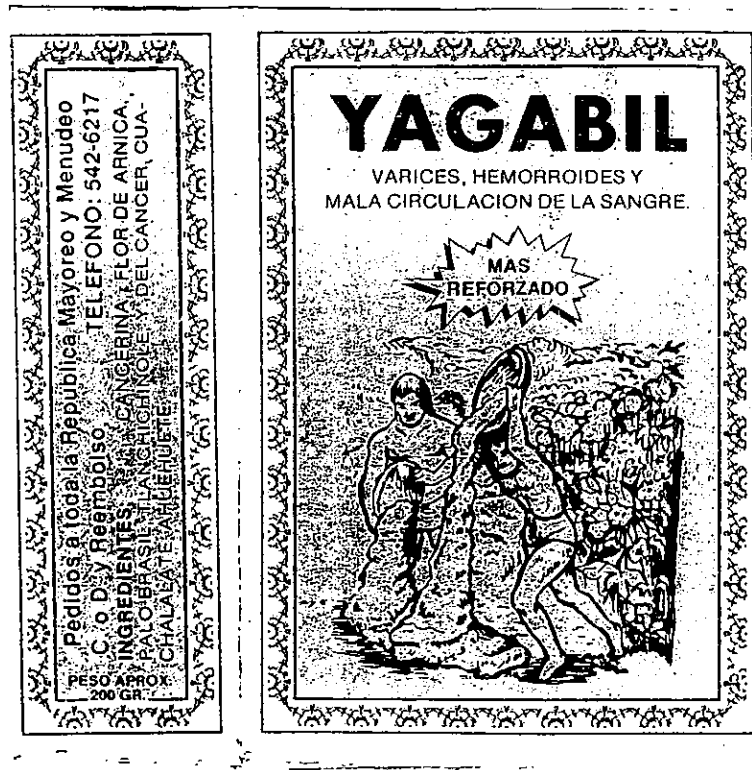
Atenango del Río, Copalillo, Papalutla, Comala y Tzicapa, poblados cercanos al municipio de Jolalpan, Puebla (Hersch, 1996).

Una vez recolectada la planta medicinal, con los procedimientos descritos anteriormente, ingresa a la red de mercado. Dicha red involucra a comerciantes de diversa capacidad, quienes se ubican en plazas de diferente alcance. La planta medicinal puede ser vendida a comerciantes mayoristas en el Distrito Federal directamente por parte del campesino recolector, sin que medien acopiadores locales o regionales. Sin embargo, dadas las dificultades que para el recolector implica su transporte y el de la carga hacia la ciudad de México, y por las condiciones mismas de venta, el volumen principal de la planta medicinal colectada en la zona se vende a través de acopiadores, ya sean locales o regionales, los cuales se encargarán de colocar el producto en plazas más grandes (Hersch, 1996).

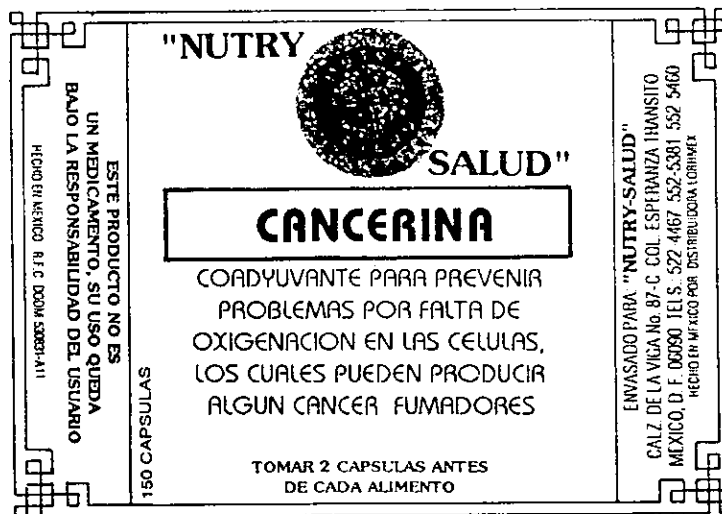
El acopiador principal dispone de una bodega muy grande donde almacena hasta 60 o más toneladas de planta medicinal seca. Como parte de su infraestructura, el acopiador principal local cuenta con un molino que sirve para picar y/o moler las plantas secas hasta convertirlas en polvos finos o pequeños pedazos de corteza, según se requiera. Cuenta además con básculas, costales y recipientes de cartón para envasar la droga cruda o mezclas de drogas crudas que contienen la cancerina. Entonces la cancerina se consume sola o en mezcla con otras hierbas medicinales. En el Cuadro 2 se indican los preparados de plantas medicinales que contienen cancerina surtidas por acopiadores locales y regionales (Hersch, 1996).

De los productos enlistados en el Cuadro 2 quizá el más popular es el *Yagabil* (Figura 3a). Algunos de los nombres de los preparados son alusivos a su indicación terapéutica; tal es el caso del Varicel que se usa para el tratamiento de las várices. Esta variante en la comercialización de las plantas medicinales constituye un importante estadio intermedio en el procesamiento inicial de la mercancía, intermedio entre el tipo tradicional de abasto y el procesamiento más elaborado (Hersch, 1996).





(a)



(b)

Figura 3. (a) Yagabil, preparado medicinal elaborado con distintas plantas medicinales, entre ellas la cancerina. (b) Cápsulas elaboradas con cancerina.

Cuadro 2. Productos herbolarios que contienen cancerina.

<i>Nombre comercial</i>	<i>Indicación referida</i>	<i>Contenido %</i>
<i>Tepeyac</i>	Úlceras del duodeno, estómago y otras; inflamación de matriz, ovarios y riñones; cualquier malestar canceroso	Cancerina, 30 Menta, 20 Cuachalalate, 50
<i>Varicel</i>	Várices, hemorroides, granos, úlceras, llagas, tumores, mala circulación	Cancerina, 30 Ahuehuete, 10 Palo brasil, 15 Cuachalalate, 30 Árnica, 5 Yerba del cáncer, 10
<i>Yagabil</i>	Várices y hemorroides	Árnica, 15 Cancerina, 20 Ahuehuete, 10 Palo brasil, 20 Cuachalalate, 20 Tlanchichinole, 15
<i>Huitzol</i>	*	Cancerina, 15 Ahuehuete, 20 Granjel, 10 Árnica, 15 Palo brasil, 20 Copaila, 20
<i>Yagaby</i> (Yerbamex) CBM	*	Cancerina, 20 Cuachalalate, 15 Árnica, 15 Hierba del golpe, 10 Tlanchichinole, 15 Hierba del amor, 15 Muerdago, 10
<i>Aulaga</i> (Therbal)	*	Manzanilla, 30 Sacasil, 40 Cancerina, 30

\* No se consignó uso cuando en el producto no existía expresamente tal información. CBM Centro Botánico de México

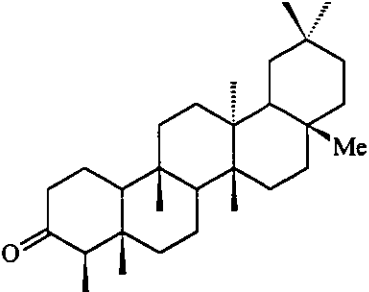
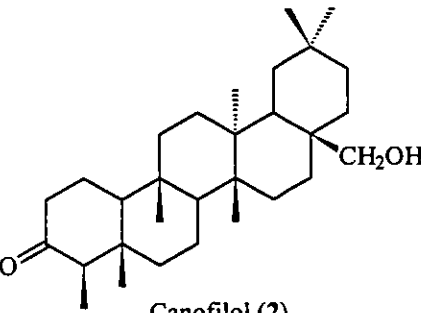
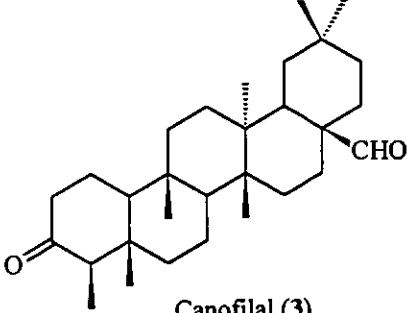
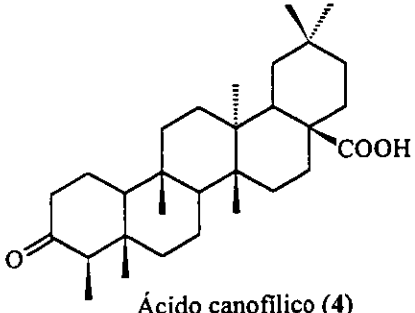
Es importante señalar que los acopiadores regionales también manejan otra modalidad de producto: las cápsulas. Esto refleja el carácter esencialmente dinámico de búsqueda de alternativas comerciales e, indirectamente, de cura ante problemas de salud. Pocas plantas medicinales propias de la zona de abasto se muelen y encapsulan. En este sentido, la cancerina bajo la forma de cápsula (Figura 3b) es indicada para el "cáncer de los fumadores", una indicación exótica en relación con su uso tradicional (Hersch, 1996).

Desde el punto de vista químico, la mayoría de los trabajos publicados a la fecha describen el aislamiento y caracterización de triterpenoides y alcaloides como los principales metabolitos secundarios presentes en la especie (Mata *et al.*, 1990; Calzada *et al.*, 1991; Calzada y Mata, 1995). También se ha descrito la presencia en grandes cantidades de un politerpenoide del tipo de la guta (Palacios *et al.*, 1989). Recientemente, se describió la presencia de la (-)-epicatequina (14) en la corteza de la planta (Trejo Miranda, 1998). En el Cuadro 3 se ilustran las estructuras de los compuestos aislados, hasta la fecha, de *H. excelsa* HBK.

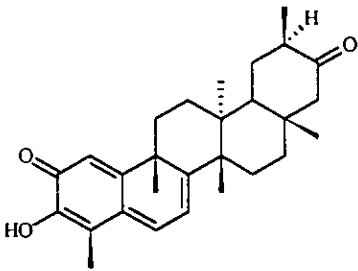
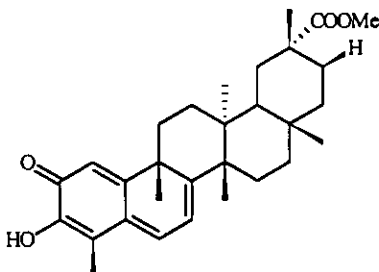
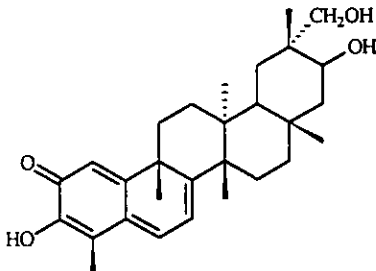
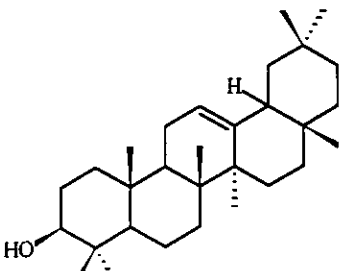
Desde el punto de vista biológico, el extracto hexánico preparado a partir de la corteza de las raíces y de los tallos de la especie presentó una actividad tóxica moderada en la prueba de letalidad con *Artemia salina* Leach (Calzada *et al.*, 1991). Por otro lado, el extracto etanólico presentó un efecto anti-inflamatorio significativo (Pérez *et al.*, 1995).

En relación a los compuestos presentes en la planta, se ha demostrado que la aplicación tópica de la tingenona (5) es efectiva en el tratamiento del carcinoma epidérmico. Para este triterpenoide se ha descrito también su citotoxicidad *in vitro* contra varios sistemas de tumores (sarcoma de Yoshida, sarcoma 180 y KB). Por su parte el canofilal (3), otro de los triterpenoides aislados, presentó actividad antimicrobiana específica, aunque de moderada intensidad, contra *Pseudomonas aeruginosa* (Rojas *et al.*, 1991).

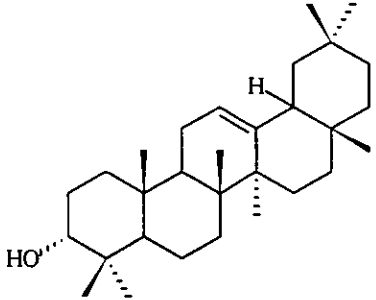
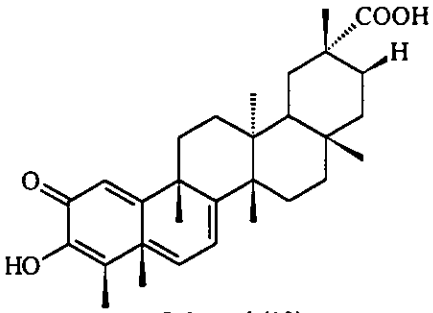
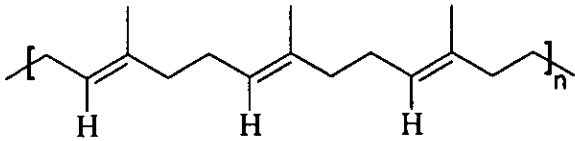
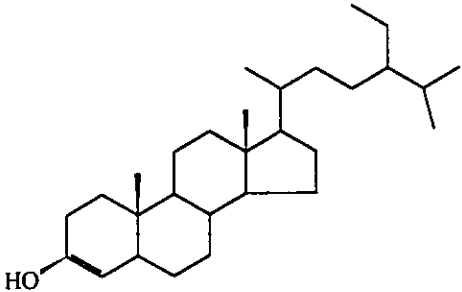
**CUADRO 3.** Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Hippocratea excelsa* HBK.

COMPUESTO	REFERENCIA
 <p>Friedelina (1)</p>	Calzada <i>et al.</i> , 1991
 <p>Canofilol (2)</p>	Calzada <i>et al.</i> , 1991
 <p>Canofilal (3)</p>	Calzada <i>et al.</i> , 1991
 <p>Ácido canofilico (4)</p>	Calzada <i>et al.</i> , 1991

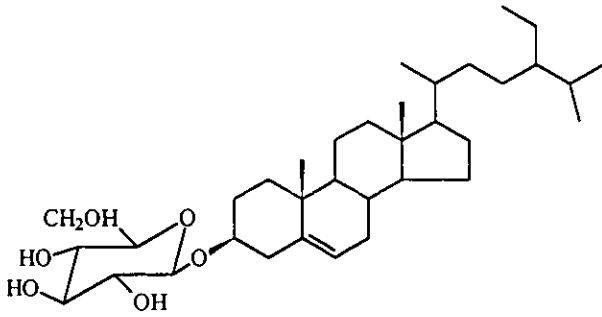
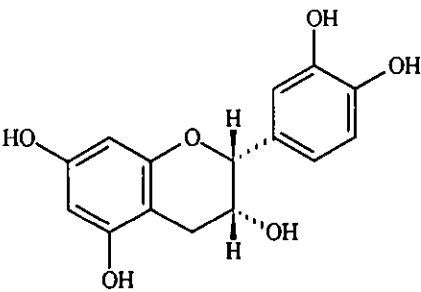
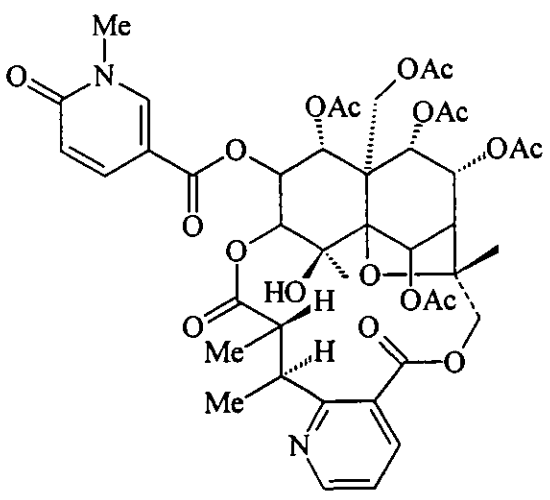
**CUADRO 3.** Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Hippocratea excelsa* HBK. (Continuación).

COMPUESTO	REFERENCIA
 <p>Tingenona (5)</p>	Calzada <i>et al.</i> , 1991
 <p>Pristimerina (6)</p>	Calzada <i>et al.</i> , 1991
 <p>Excelsina (7)</p>	Calzada <i>et al.</i> , 1991
 <p><math>\beta</math>-amirina (8)</p>	Trejo Miranda, 1998

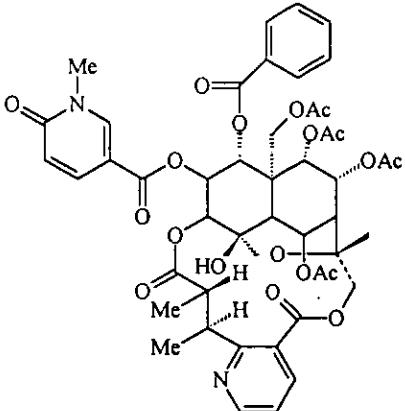
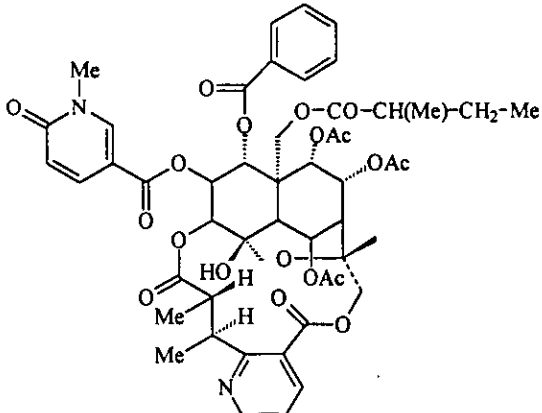
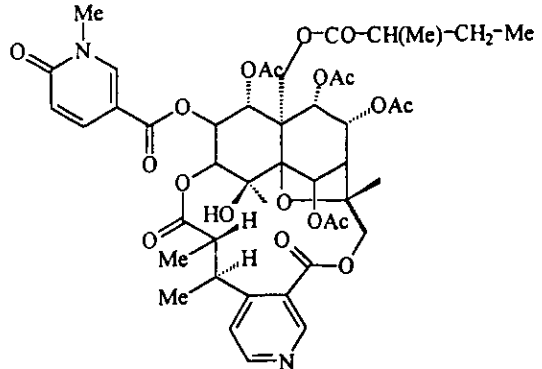
**CUADRO 3.** Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Hippocratea excelsa* HBK. (Continuación).

COMPUESTO	REFERENCIA
 <p style="text-align: center;"><math>\alpha</math>-amirina (9)</p>	Trejo Miranda, 1998
 <p style="text-align: center;">Celastrol (10)</p>	Calzada <i>et al.</i> , 1991
 <p style="text-align: center;">Cis-poliisopreno (11)</p>	Palacios <i>et al.</i> , 1989
 <p style="text-align: center;"><math>\beta</math>-sitosterol (12)</p>	Trejo Miranda, 1998

**CUADRO 3.** Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Hippocratea excelsa* HBK. (Continuación).

COMPUESTO	REFERENCIA
 <p style="text-align: center;">β-D-glucositosterol (13)</p>	Trejo Miranda, 1998
 <p style="text-align: center;">Epicatequina (14)</p>	Trejo Miranda, 1998
 <p style="text-align: center;">Emarginatina (15)</p>	Mata <i>et al.</i> , 1990

**CUADRO 3.** Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Hippocratea excelsa* HBK. (Continuación).

COMPUESTO	REFERENCIA
 <p>Hippocrateína I (16)</p>	Mata <i>et al.</i> , 1990
 <p>Hippocrateína II (17)</p>	Mata <i>et al.</i> , 1990
 <p>Hippocrateína III (18)</p>	Mata y Calzada, 1995



En un reciente estudio cuyo objetivo era determinar la actividad antiulcérica de extractos, fracciones y productos puros derivados de la especie (Tabla 1), se comprobó que el extracto metanólico de la corteza de la raíz posee una notable actividad antiulcérica (Trejo Miranda, 1998). De acuerdo con estas determinaciones, los constituyentes más activos fueron el  $\beta$ -D-glucositolsterol (13), el  $\beta$ -sitosterol (12) y la (-)-epicatequina (14). Debe hacerse notar que el crudo alcaloideo obtenido por una partición ácido-base y la mezcla de  $\alpha$ -amirina (9) y  $\beta$ -amirina (8) (en proporción 1:1) también contribuyen a la actividad antiulcérica demostrada por el extracto total (Trejo Miranda, 1998).

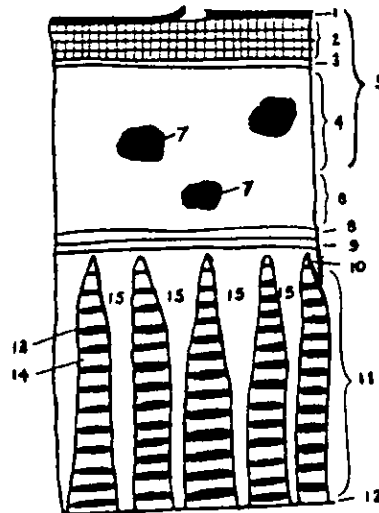
**Tabla 1.** Porcentajes de gastroprotección inducidos por el extracto, fracciones y compuestos puros aislados de *H. excelsa* HBK. (Trejo Miranda, 1998).

Extracto, fracción o compuesto puro.	Dosis mg/Kg	% Gastroprotección
Extracto metanólico	100	22.50±30.24
Extracto metanólico	300	73.79±7.97
Fracción A	300	89.10±11.81
Fracción B	300	89.40±2.69
Fracción C	300	71.60±13.34
Fracción D	300	61.23±9.15
$\alpha$ y $\beta$ amirina (8 y 9)	100	50.70±17.41
Canofilol (2)	100	16.36±14.86
Canofilal (3)	100	20.00±13.80
Friedelina (1)	100	21.98±12.49
(-)-epicatequina (14)	100	72.10±12.72
$\beta$ -sitosterol (12)	100	85.67±6.29
$\beta$ -D-glucositolsterol (13)	100	93.41±2.17
Subsalicilato de Bismuto (Pepto Bismol®)*	90	34.52±19.82

\* Control positivo

Por último, cabe destacar que un estudio reciente sobre las características microscópicas de numerosas plantas medicinales, realizado por investigadores del Jardín Botánico (Instituto de Biología, UNAM) se analizó la raíz de *H. excelsa* HBK. Los aspectos más relevantes de este análisis se resumen a continuación:

El corte transversal de *H. excelsa* HBK. muestra la siguiente distribución de tejidos: floema y células radiales, córtex, felodermis, felógeno y felema, que se localizan del límite de la madera hacia el exterior (por fuera del cambium) de acuerdo a la Figura 4 (Villa Fernández, 1994).



**Figura 4.** Ordenación típica de los tejidos en una corteza: (1) superficie externa; (2) súber; (3) cambium del súber o felógeno; (4) felodermo o corteza secundaria; (5) peridermo; (6) parte interior de la corteza primaria; (7) grupos de esclerenquima cortical; (8) endodermis; (9) periciclo; (10) líber primario; (11) líber secundario; (12) cambium; (13) banda de fibras lignificadas; (14) elementos cribosos; (15) radios medulares.

Es importante notar que en las cortezas comerciales, las estructuras indicadas en la Figura 4 pueden estar modificadas debido a la actividad del cambium cortical o felógeno (Villa Fernández, 1994).

La corteza interna y externa de la especie suma 5 mm de grosor; no existe diferenciación anatómica entre ambas. El peridermo, se encuentra compuesto por las siguientes zonas:

- a) Felodermis, zona externa al córtex, en ella se observa una zona de células cuadradas muy regulares, ordenadas en hileras radiales de 3; en algunas se aprecian abundantes cristales solitarios o agrupados, taninos y esclereidas de tamaños variados (Figura 5a).
- b) Felógeno, zona externa a la felodermis, en ella se encuentra una hilera de células rectangulares, orientadas hacia la zona del felema.
- c) Felema, zona que se observa exterior al felógeno, formado por capas de células cuadradas muy homogéneas, de pared delgada, sin contenidos. El grosor total de la peridermis es de 1067 micras (Villa Fernández, 1994).

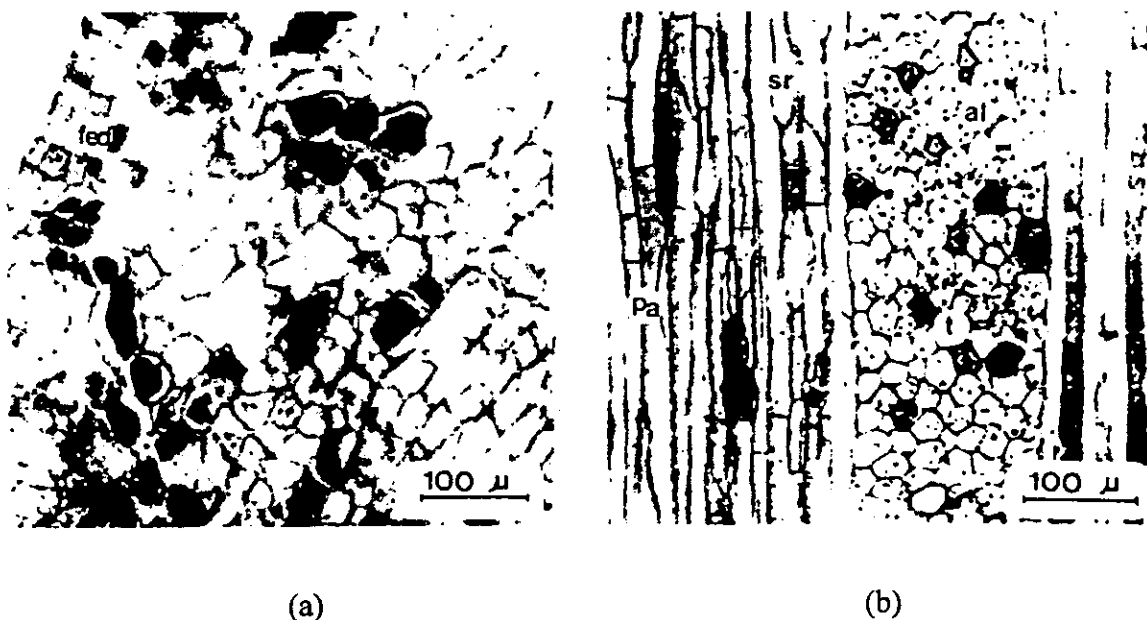
El floema secundario esta integrado por dos áreas organizadas a manera de triángulos complementarios, unos son los elementos axiales y los otros son los elementos radiales. Esta área mide 1710 micras de grosor total. Los elementos axiales se encuentran organizados a manera de un triángulo visto en el corte transversal, con su base cerca del cambium y su ápice hacia el córtex. Los elementos estructurales del floema comprenden:

- a) Los tubos cribosos, distribuidos en todo el floema de manera abundante, de forma isodiamétrica y miden 12 micras de diámetro. En algunos casos, se encuentran asociadas a las paredes del tubo, dos células ajenas o compañeras. Cabe destacar que, cuando dichas células acompañantes se colapsan demasiado, éstas se observan como un engrosamiento de la pared del tubo criboso. Las células compañeras, tienen la particularidad de presentar un protoplasma denso, un núcleo bien desarrollado y una fina membrana de celulosa.

- b) El parénquima taninífero, distribuido irregularmente por todo el floema, se asocia en algunos casos con almidón. Las células del parénquima son alargadas tangencialmente y se encuentran intercaladas con las células radiales. Con respecto al parénquima cristalífero, este es poco abundante y solitario, especialmente en células radiales. Las fibras son de dos tipos: unas de pared gruesa, escasas, con una longitud de 784 micras; otras de paredes extremadamente delgadas, de extremos romos, muy abundantes con 935 micras de

longitud, cuyo contenido no se encuentra identificado (Figura 5b). Los radios medulares se encuentran organizados a manera de triángulos, con su base hacia el córtex y su ápice hacia el cambium. Se encuentran formados hasta por 8 células de ancho; la forma de las células varían conforme se sitúan hacia el ápice del triángulo. Primero son alargadas radialmente y luego llegan a tener forma rectangular. Las células taniníferas se encuentran dispersas e intercaladas entre el resto de las células. Los cristales solitarios son abundantes conforme se acercan al córtex, además se encuentran diversos grupos de esclereidas. Las esclereidas son de forma irregular u ovoide, con membranas gruesas, lignificadas y atravesadas por canales en forma de embudo.

c) Finalmente el córtex está constituido por varias capas de células alargadas tangencialmente, ordenadas en hileras y con algunos grupos de células colapsadas. También se observan células parenquimáticas y taniníferas, así como abundantes cristales de almidón y paquetes de esclereidas. Esta área mide 1063 micras (Villa Fernández, 1994).



**Figura 5.** (a) Corte transversal de la felodermis (fed); (b) células radiales taniníferas [t], con almidón [al], parénquima axial [pa] y fibras de extremos romos [sr].

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 MATERIAL VEGETAL**

En el presente estudio se utilizaron tres muestras del material vegetal (corteza de raíz). La primera (muestra A) fue recolectada en la Costa Grande de Guerrero, en el mes de Febrero de 1997, por el Dr. Andrés Navarrete (Facultad de Química, UNAM). Una muestra de herbario fue depositada en el Herbario de plantas útiles Efraim Hernández (Universidad Autónoma Chapingo) [Voucher XOLO 199141]. La segunda (muestra B) fue adquirida en el mercado de Sonora (México, D.F.) por el Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM). Esta muestra fue recolectada en el mes de Agosto de 1997 proveniente del estado de Guerrero. Por último, la tercera (muestra C) fue adquirida en el mercado La Bola (México, D.F.), en el mes de Septiembre de 1998. Cabe mencionar, que las muestras adquiridas comercialmente se obtuvieron bajo la forma de drogas crudas.

#### **3.2 DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS EXTRAÑOS**

Para determinar la cantidad de elementos extraños presentes en el material vegetal, se pesaron 500 g del material vegetal y se extendieron sobre una superficie formando una capa delgada. Los elementos extraños se detectaron por inspección a simple vista y se separaron del resto del material. Posteriormente, los elementos extraños se pesaron y se determinó el porcentaje que representan.

#### **3.3 FRAGMENTACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

Para la realización de los diferentes análisis del presente trabajo, el material vegetal libre de elementos extraños se fragmentó en un molino Thomas-Willey Modelo 4 a tamaño de polvo fino (malla 180).

### **3.4 ENSAYOS DE IDENTIDAD**

#### **3.4.1 CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS Y ORGANOLEPTICAS DE LA DROGA ENTERA**

Se realizó el reconocimiento macroscópico de la droga entera mediante la observación directa del color, olor y sabor.

#### **3.4.2 ENSAYOS QUÍMICOS DE IDENTIDAD DE UN GRUPO PARTICULAR DE COMPUESTOS EN LA DROGA PULVERIZADA**

a) Ensayo para taninos: una pequeña cantidad del polvo se mezcló con unas gotas de una solución de cloruro férrico 0.1 M. La aparición de una coloración azul en presencia de una solución de ferrocianuro de potasio 0.08 M, es indicativa de una prueba positiva para taninos. Como controles positivos se emplearon ácido gálico y catequina (Price y Butler, 1977; Mole y Waterman, 1987; Inoue y Hagerman, 1988; Waterman y Mole, 1994).

b) Ensayo para catequina: un pequeño fragmento de madera se impregnó con el extracto metanólico de la planta, se desecó y posteriormente se sumergió en ácido clorhídrico concentrado. El desarrollo de una coloración rosa o roja después de calentar cerca de una llama indica la presencia de catequina. Como control positivo se utilizó catequina (Price y Butler, 1977; Mole y Waterman, 1987; Inoue y Hagerman, 1988; Waterman y Mole, 1994).

c) Ensayo para aceites esenciales y fijos: 100 g de material vegetal se sometió a un proceso de destilación por medio de arrastre con vapor de agua de acuerdo con la metodología previamente descrita en la literatura (Real Farmacopea Española, 1997; WHO, *Quality Methods for Medicinal Plant Materials*, 1988). Adicionalmente, una pequeña cantidad de la droga cruda pulverizada se comprimió entre papel de filtro. La aparición de una mancha oleosa, que persiste después de calentar el papel en una estufa, indica que el polvo contiene en su mayoría aceites fijos (Trease y Evans, 1989).

d) Ensayo para mucílagos: una pequeña cantidad del polvo se mezcló con 2 mL de ácido sulfúrico diluido (1:1). Posteriormente, se adicionó 1 mL una solución saturada de carbonato de calcio y se observó si se producía efervescencia. La producción de efervescencia, sugiere la existencia de mucílagos en las muestras. Como control positivo se utilizó agar (Trease y Evans, 1989).

### 3.4.3 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Para el análisis cromatográfico cualitativo en capa fina se emplearon placas de vidrio recubiertas de gel de sílice con un espesor de 0.25 mm (Sílica gel F<sub>254</sub> Merck). El proceso de elución se llevó a cabo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:acetona (85:15) o con una mezcla de AcOEt: ácido fórmico: agua (80:13:7); como agente cromógeno se utilizó una solución reactivo de vainillina (1 g de vainillina en 100 mL de etanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, mezclados en ese orden) (Stahl, 1969); para el desarrollo de color fue necesario calentar por 2 minutos a 100°C aproximadamente. Antes de revelar con el reactivo anterior, se procedió a visualizar la placa con luz UV (onda corta 254 nm y onda larga 365 nm).

Las muestras se prepararon de la siguiente forma: 5 g del material vegetal finamente dividido, se extrajeron con 50 mL de una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1:1) por 24 horas. Al término de la extracción la solución resultante se filtró y se concentró a presión reducida. El extracto resultante se reconstituyó en exactamente 15 mL de la mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1:1). La aplicación de la muestra (20 µL) se realizó con una micropipeta en forma de banda. Como estándares se utilizaron los siguientes compuestos: friedelina (1), canofilol (2), canofilal (3), ácido canofilico (4), tingenona (5), hipocrateína I (16), ácido oleanólico y catequina (14) (1 mg en 1 mL de metanol). Todos estos compuestos se aislaron en forma pura en estudios anteriores (Mata *et al.*, 1990; Calzada *et al.*, 1991; Mata y Calzada, 1995; Trejo Miranda, 1998).

### **3.5 ENSAYOS DE PUREZA**

#### **3.5.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD**

La determinación del contenido de humedad se realizó en una termobalanza Ohaus modelo 6010, mediante la introducción de 3 g de cada una de las muestras de prueba en una charola de aluminio. La temperatura de la termobalanza se mantuvo en 80°C. La lectura del parámetro de humedad perdida se registra después de 15 minutos de calentamiento. Se trabajaron diez réplicas por muestra y los resultados se expresan como porcentaje de humedad perdida.

#### **3.5.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS**

Para la determinación de cenizas totales e insolubles en ácido se emplearon crisoles de porcelana cuyo peso se determinó como constante de acuerdo al siguiente procedimiento: Se calentaron los crisoles al rojo ( $600\pm 25^\circ\text{C}$ ) durante 30 minutos en un horno mufla; posteriormente se enfriaron en un desecador y se pesaron. Este procedimiento se repitió hasta que, el peso de los crisoles fue constante.

##### **a) CENIZAS TOTALES**

En un crisol de peso constante, se pesó exactamente 1g de la droga seca y pulverizada. La muestra se precalcinó con un mechero durante 20 minutos. En seguida, se inició la calcinación de la muestra a  $600\pm 25^\circ\text{C}$  en un horno mufla durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, los crisoles se dejaron enfriar en un desecador y a continuación se pesaron. La calcinación de la muestra se repitió hasta que la masa fue constante.



## **b) CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO**

Para obtener las cenizas insolubles en ácido, se adicionó al residuo obtenido en la determinación de cenizas totales 15 mL de agua y 10 mL de ácido clorhídrico concentrado. La solución resultante se calentó a ebullición suave durante 10 minutos. Al cabo de este tiempo, el residuo se filtró a través de un papel filtro libre de cenizas y se lavó con agua caliente hasta que el filtrado fue neutro. El residuo junto con el papel filtro se desecó en un crisol de peso constante durante 1 hora a 100°C. Posteriormente, el residuo se calcinó en un horno mufla a  $600\pm 25^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas. La calcinación de la muestra se repitió hasta que la diferencia entre dos pesadas sucesivas no fue superior a 1 mg. Se trabajaron seis réplicas por muestra y los resultados se expresan con respecto a 100 g de droga seca.

### **3.5.3 DETERMINACIÓN DE MATERIAL EXTRAIBLE**

Para determinar la cantidad de material extraíble se prepararon tres extractos diferentes, utilizando como disolventes hexano, etanol o etanol-agua (70:30) de acuerdo al siguiente procedimiento: 4 g del material vegetal se extrajeron mediante un proceso de maceración con 100 mL de cada uno de los disolventes mencionados. La mezcla resultante se mantuvo en agitación constante durante las primeras 6 horas. Al cabo de este tiempo, la mezcla se mantuvo en reposo hasta que transcurrieron 24 horas. Al término de la extracción, la solución resultante se filtró cuantitativamente. 25 mL de este filtrado se transfirieron a un matraz de bola previamente tarado y se concentraron a presión reducida hasta sequedad. El residuo obtenido se secó a 105°C durante 6 horas en una estufa; antes de pesarlo se enfrió en un desecador por 30 minutos.

Se trabajaron seis réplicas por tratamiento para cada muestra. El contenido de material extraíble se expresa en mg por g de droga seca.

### **3.5.4 DETERMINACIÓN DEL INDICE DE HINCHAMIENTO**

En una probeta graduada de 25 mL con tapón esmerilado, se introdujo 1 g del material vegetal finamente dividido. En seguida, se agregó 1 mL de etanol y 25 mL de agua. La mezcla anterior se agitó enérgicamente cada 10 minutos durante un período de 1 hora. Posteriormente, la mezcla se dejó en reposo durante 3 horas. Al cabo de este tiempo, se eliminó por rotación alrededor del eje vertical la mayor cantidad posible del líquido retenido al nivel de la droga, incluyendo las partículas de la misma que flotaban en la superficie del líquido. Finalmente, se midió el volumen ocupado por la droga.

Para esta determinación se efectuaron nueve repeticiones (tres ensayos simultáneos) por muestra.

### **3.5.5 DETERMINACIÓN DEL LIMITE MICROBIANO**

#### **a) Preparación de la muestra**

Las muestras a evaluar se prepararon de la siguiente forma: 10 g del material vegetal objeto de estudio se suspendieron en 90 mL de una disolución tampón peptona-cloruro de sodio previamente esterilizada. A partir de la suspensión anterior se prepararon las diluciones necesarias para que 1 mL de la misma contenga entre 30 y 300 UFC (Unidades Formadoras de Colonias).

#### **b) Recuento de bacterias**

Los ensayos se realizaron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro interno. Para cada muestra de prueba se prepararon 8 diluciones seriadas, de forma tal de obtener concentraciones finales de 100, 10, 1, 0.1 mg/mL 10, 1, 0.1 µg/mL y 100 ng/mL. A continuación, se transfirieron a las cajas de Petri 1 mL de las diluciones de prueba conteniendo las concentraciones antes indicadas y 15 mL del medio agar soya tripticaseína previamente esterilizado y mantenido en baño de agua a una temperatura

aproximada de 45-48°C. Con movimientos rotatorios suaves, se mezcló la alícuota de la muestra con el medio de cultivo. Posteriormente, se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente. Las placas se incubaron en posición invertida a 35°C durante 48 horas. Al finalizar el tiempo de incubación se procedió a contar con ayuda de una lupa el número de UFC.

c) Recuento de hongos

El recuento de hongos filamentosos y levaduras se realizó de acuerdo a la metodología descrita anteriormente (Real Farmacopea Española, 1997; WHO, *Quality Control Methods for Medicinal Plants Materials*, 1988). Para este ensayo se empleó como medio de cultivo agar Sobouraud-dextrosa con antibióticos. Las placas se incubaron en posición invertida a 25°C por un período de 5 días.

Los resultados se expresan como el número de UFC por gramo de droga seca.

d) Método en tubo (Número más probable, NMP)

1 mL de las diluciones  $10^{-1}$ - $10^{-8}$  se transfirieron a ocho tubos de ensayo conteniendo exactamente 9 mL de medio caldo soya tripticaseína, previamente esterilizado. Los tubos se incubaron a 35°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se procedió a contar el número de tubos que presentaban turbidez debido al crecimiento microbiano.

Los resultados se expresan como el número más probable de microorganismos por gramo de droga seca.

### 3.5.6 DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

a) Detección de *Escherichia coli*

Preparación de la muestra: 10 g del material objeto de estudio se suspendieron en 90 mL de caldo lactosa. La suspensión anterior se agitó para homogeneizar y se incubó a 35°C durante 3 horas.

100 mL de medio líquido MacConkey se inocularon con 1 mL del cultivo anterior, correspondiente a 0.1 g del material a examinar. El cultivo se incubó a 43°C durante 24 horas. Posteriormente, se realizaron subcultivos sobre placas de agar MacConkey y agar eosina azul de metileno (EMB). Las placas se incubaron a 43°C durante 48 horas.

b) Detección de *Salmonella* sp.

Preparación de la muestra: 10 g del material vegetal se suspendieron en 90 mL de caldo soya tripticaseína. La suspensión anterior se agitó para homogeneizar y se incubó a 35°C durante 12 horas.

ENSAYO PRIMARIO: 10 mL del cultivo anterior se transfirieron a 100 mL del medio líquido compuesto por tetracionato, bilis y verde brillante. El cultivo anterior se incubó a 42°C durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se prepararon subcultivos sobre placas de agar *Salmonella-Shigella*, agar sulfito de bismuto, agar xilosa, lisina y desoxicolato y agar verde brillante. Las placas se incubaron a 42°C durante 48 horas.

ENSAYO SECUNDARIO: Las colonias que presentaron las características de bacterias del género *Salmonella*, se transfirieron al medio sólido agar triple azúcar con hierro, mediante siembra en superficie y profundidad.

c) Detección de *Pseudomonas aeruginosa*

10 g de la droga cruda pulverizada se suspendieron en 90 mL de la disolución tampón peptona-cloruro de sodio pH 7.0. La suspensión anterior se agitó para homogeneizar y se incubó a 37°C durante 48 horas. Posteriormente, se prepararon subcultivos sobre placas con el medio sólido agar cetrimida y se incubaron a 37°C por 48 horas.

d) Detección de *Staphylococcus aureus*

La muestra a analizar se preparó de acuerdo a la metodología descrita para *P. aeruginosa*. Posteriormente, se prepararon subcultivos sobre placas de agar sal manitol, agar Voguel Johnson y agar gelosa sangre y se incubaron a 37°C por 48 horas.

e) Reacciones bioquímicas diferenciales

Las colonias que presentaron las características del género *Escherichia* y *Salmonella* se transfirieron a los siguientes medios: agar semisólido SIM, agar hierro de Kligler, caldo RMVP (Rojo de metilo-Voges-Proskauer), caldo rojo de fenol con glucosa y caldo rojo de fenol con lactosa. Adicionalmente, una porción de estas colonias se transfirió a un tubo de ensayo que contenía exactamente 2.2 mL de medio de inóculo, cuya composición es la siguiente: 8.50 g de NaCl; 0.8372 g de ácido-3-morfolino propano sulfónico y agua destilada a 1000 mL. La mezcla anterior se transfirió al panel comercial BBL CRYSTAL® de acuerdo con la metodología descrita por el fabricante.

**PRUEBA DE LA OXIDASA:** Una tira de papel filtro se impregnó con una disolución al 1% de diclorohidrato de N,N,N',N' tetrametil p-fenilendiamina y se colocó sobre ella una pequeña porción de la colonia sospechosa. La ausencia de una coloración púrpura en 10 segundos fue indicativa de una prueba negativa para *P. aeruginosa*. Como control positivo se empleó una cepa de referencia de *P. aeruginosa*.

**PRUEBA DEL INDOL:** 10 mL del medio líquido caldo triptona se inocularon con la colonia en estudio. El cultivo se incubó a 35°C por 24 horas. Al cabo de este tiempo se adicionó al cultivo anterior 1 mL de cloroformo. En seguida, se agregó por la pared interna del tubo, 5 gotas del reactivo de Erlich (2 g de p-dimetilaminobenzaldehído, 190 mL de alcohol etílico y 40 mL de ácido clorhídrico concentrado). La ausencia de una coloración púrpura en la interfase de los líquidos fue indicativa de una prueba negativa para la producción de indol. Como control positivo se empleó una cepa de *Klebsiella pneumoniae*.

Como control positivo en todos los ensayos se emplearon las cepas de referencia indicadas en el Cuadro 4. El mismo procedimiento se siguió para los controles negativos que contenían únicamente la disolución tampón peptona-cloruro de sodio. Se trabajaron cinco réplicas independientes por muestra. La composición de todos los medios de cultivo empleados se incluye en el Apéndice II.

**Cuadro 4.** Microorganismos de referencia empleados para los diferentes ensayos.

MICROORGANISMO	NÚMERO DE CEPA
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 6017
<i>Candida albicans</i>	ATCC 2091

### 3.5.7 DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS

En un crisol de peso constante, se pesó exactamente 250 mg de la droga seca y pulverizada. Posteriormente, se adicionó 1 mL de la mezcla de digestión compuesta de: ácido nítrico y ácido perclórico (2:1). La suspensión resultante se calentó a 100°C en un horno mufla durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se incrementó gradualmente la temperatura del horno, hasta alcanzar 240°C; la muestra se mantuvo a esta temperatura durante 4 horas. El residuo inorgánico obtenido, se disolvió en 2.5 mL de ácido nítrico concentrado y se analizó por espectrofotometría de absorción atómica. El mismo procedimiento, se siguió para los controles negativos que contenían únicamente la mezcla de digestión. Como control positivo se emplearon soluciones estándar de plomo, cadmio y mercurio.

Se trabajaron seis réplicas por tratamiento en las muestras de prueba y en los controles.

### 3.5.8 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CATEQUINA Y DE FENOLES TOTALES MEDIANTE EL MÉTODO DE PRICE Y BUTLER

A) Preparación de la muestra: 30 mg de la droga pulverizada se extrajeron con 3 mL de metanol durante 1 minuto. La solución resultante se filtró rápidamente con ayuda de un embudo y el matraz se enjuagó con 3 mL adicionales de metanol; la solución se vertió en el embudo y se reunió con la solución anterior. El filtrado anterior se llevó a un volumen de 50 mL con agua destilada.

B) Procedimiento: A 50 mL de la solución a analizar, se adicionaron 3 mL de una solución 0.1 M de cloruro férrico (en HCl 0.1 M) y se agitó durante 3 minutos. Al cabo de este tiempo, se adicionaron 3 mL de una solución 0.08 M de ferrocianuro de potasio y se agitó para homogeneizar. Después de 10 minutos se cuantifica el contenido de fenoles totales o catequina midiendo la absorbancia a 720 nm en un espectrofotómetro marca Beckman Du modelo 600.

Los resultados se expresan como equivalentes de fenol o catequina a partir de una curva estándar preparada bajo las mismas condiciones del análisis con ácido gálico o catequina (Price y Butler, 1977; Mole y Waterman, 1987).

### **3.5.9 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL METODO ANALÍTICO.**

#### **3.5.9.1 ESPECIFICIDAD/SELECTIVIDAD**

Preparación de la matriz de trabajo: 1 mg de los compuestos 1-5, 12, 13 y 16 se disolvieron en 100 mL de metanol. La solución resultante, constituye la matriz de trabajo o solución placebo.

Para evaluar la especificidad/selectividad del método se registraron los espectros de absorción al visible de 400 a 900 nm del extracto total de la especie, de la solución placebo y de la solución placebo adicionada de forma independiente con ácido gálico y catequina.

#### **3.5.9.2 LINEARIDAD**

A) Linearidad del sistema: La linearidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración (concentración vs. densidad óptica) de acuerdo al siguiente procedimiento: 10 mg de ácido gálico o catequina se disuelven en 10 mL de metanol. A partir de la solución anterior se preparan las diluciones necesarias para que 1 mL de la misma contenga entre 0.2 y 3 µg/mL (Price y Butler, 1977; Mole y Waterman, 1987). Posteriormente, se cuantificó el contenido de fenoles totales o catequina de acuerdo a la

metodología descrita en el inciso 3.5.8 B. Para el cálculo de la ordenada al origen (b), la pendiente de la recta (m), el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), se utilizó un análisis de regresión lineal simple.

Los parámetros estadísticos, así obtenidos, se comparan con el siguiente criterio:  $b=0$ ,  $m \neq 0$ ,  $r \geq 0,99$  y  $r^2 \geq 0,98$  (Hokanson, G., 1994; Johnson y Van Buskirk, 1996; USP XXIV).

B) Linearidad del método: Para evaluar la linearidad del método se prepararon una serie de soluciones estándar mediante la adición de diferentes concentraciones del compuesto a evaluar (ácido gálico o catequina) en 3 mL de la matriz de trabajo. La densidad óptica de las soluciones se midió empleando el procedimiento descrito anteriormente (ver inciso 3.5.8 B). Los resultados obtenidos (cantidad adicionada vs cantidad recuperada) se analizaron mediante un análisis de regresión lineal simple y se calcularon los parámetros estadísticos b, m, r y  $r^2$  (CRITERIO:  $b=0$ ,  $m=1$ ,  $r \geq 0,99$  y  $r^2 \geq 0,98$ ) (Hokanson, G., 1994; Johnson y Van Buskirk, 1996; USP XXIV).

### **3.5.9.3 EXACTITUD**

La exactitud del método analítico se determinó utilizando la misma metodología descrita en el inciso 3.5.9.2 B. Los resultados obtenidos se expresan en términos de porcentaje de la cantidad recuperada (% de recobro).

CRITERIO: El porcentaje de recuperación se debe encontrar en el intervalo de 98 a 102% y la Desviación Estándar Relativa (DER) debe ser menor del 2% (Hokanson, G., 1994; Johnson y Van Buskirk, 1996; USP XXIV).

### **3.5.9.4 PRECISION**

A) Precisión del sistema: Se evaluó a partir del análisis de una solución estándar compuesta por: 1.2  $\mu\text{g}$  del compuesto a evaluar (en 1 mL de metanol) y 3 mL de la matriz



de trabajo en 46 mL de agua destilada. Se realizaron seis réplicas independientes y los resultados se expresan en términos de Desviación Estándar ( $S$ ) o DER. (CRITERIO:  $DER \leq 2\%$ ) (Hokanson, G., 1994; Johnson y Van Buskirk, 1996; USP XXIV).

B) Precisión del método (evaluada como repetibilidad). La repetibilidad del método se evaluó mediante el análisis de seis réplicas de una misma solución estándar preparada como se describe anteriormente (ver inciso 3.5.9.4 A).

CRITERIO:  $DER \leq 2\%$  (Hokanson, G., 1994; Johnson y Van Buskirk, 1996; USP XXIV).

C) Precisión del método (evaluada como reproducibilidad). La reproducibilidad del método se evaluó mediante el análisis por triplicado de una solución estándar, la cual contiene 1.2  $\mu\text{g}$  del compuesto a analizar. El análisis se realizó en dos diferentes días y por dos diferentes analistas. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales se analizaron mediante la prueba estadística ANDEVA.

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Como se indicó, en la sección introductoria, el auge de la medicina herbolaria en los países desarrollados ha estimulado de manera notable la investigación conducente al establecimiento de los criterios de calidad y la estandarización de los métodos utilizados para tal fin (Artiges, 1991; Bonati, 1991; Keller, 1991; Reuter, 1991; Escamilla *et al.*, 1995; Hersch, 1996; Bauer, 1998).

El control de calidad de las materias primas vegetales que se venden en los mercados o que se utilizan para la elaboración de remedios herbolarios es por supuesto de considerable importancia para el uso racional de estos recursos medicinales. Este proceso comprende, desde la identificación del material y la determinación de su pureza, hasta la cuantificación del contenido de sus principios activos.

En el caso de México, el empleo intensivo de los remedios herbolarios ha conducido, entre otros aspectos, a la aparición y desarrollo de una actividad comercial con poco control, que ha rebasado la capacidad de los órganos oficiales para desarrollar los mecanismos de regulación efectivos, para la producción, distribución y consumo de estos productos. Este surgimiento, de toda una corriente de elaboración y venta de preparados a partir de plantas medicinales no solo es expresión de la dinámica búsqueda de lucro por parte de algunos comerciantes; su demanda, también expresa en los hechos, un nivel de eficacia terapéutica no cuantificado (Lozoya, 1993; Hersch, 1996).

La información actualizada sobre las propiedades benéficas y los posibles efectos adversos de los remedios herbolarios, así como el desarrollo de los métodos analíticos y técnicas de control de calidad, permitirán asistir a las autoridades sanitarias nacionales para llevar a cabo el registro de documentación y revisión de tales productos.

Comparando con los productos sintéticos utilizados para la elaboración de medicamentos alopáticos, los criterios y las estrategias para la determinación del control de calidad de los productos herbolarios son más complejas. En el caso de éstas últimas, son muchos los factores que afectan su calidad. Así, los productos herbolarios están

constituidos por mezclas complejas de productos. En algunos casos, los principios activos presentes en esas mezclas pertenecen a una sola categoría de productos naturales, sin embargo, en otros, los principios activos son de diversa naturaleza, dificultando, por lo tanto, el establecimiento de las estrategias para su identificación y cuantificación. Aún más, el contenido de productos en las plantas silvestres, está sujeto a variaciones, dependiendo de su localización y ontogenia, por lo tanto, la calidad de diferentes recolecciones de plantas, es variable. En ese sentido, Bonati hace el planteamiento de que el uso de las plantas medicinales silvestres debe abandonarse o limitarse lo más posible, ocupando su lugar las plantas cultivadas y la aplicación de tecnología alternativa. El objetivo de este procedimiento es estandarizar la calidad y asegurar la continuidad de las propiedades farmacológicas y organolépticas de las plantas medicinales, objetivo imposible de alcanzar a partir de poblaciones silvestres (Artiges, 1991; Bonati, 1991; Wijesekera, 1991; Hersch, 1996; Bauer, 1999).

Por otro lado, Palevitch también considera que las plantas medicinales cultivadas ofrecen numerosas ventajas en relación a las silvestres. Las plantas cultivadas garantizan una mayor disponibilidad; un suministro constante; la posibilidad de mejoramiento genético y manipulación agronómica; un manejo poscosecha adecuado, y por último, disminuye la posibilidad de adulteración (Hersch, 1996).

De lo anterior se desprende que para cada droga cruda es necesario establecer de manera específica los criterios de calidad, aún cuando existen criterios de calidad obligatorios para todas las drogas crudas, las cuales se indican en el Cuadro 1 (Bauer, 1998; WHO, *Monographs on selected medicinal plants*, 1999).

Para el diseño del protocolo original del presente trabajo se consideró además de los criterios de calidad establecidos por la OMS y las Farmacopeas Mexicana (FEUM, sexta edición), Española y de los Estados Unidos de América del Norte (USP XXIV) el conjunto de información científica derivada de las diversas investigaciones de la especie *H. excelsa* HBK., así como su amplio uso y comercialización como planta curativa a nivel nacional.

La adquisición de las muestras comerciales se realizó de manera aleatoria. Para ello, se recopiló información acerca de los centros comerciales de distribución de plantas medicinales más representativos de la zona en cada delegación política, el resultado fue un total de 31 mercados (Cuadro 5). De esta lista, se visitaron de manera aleatoria dos sucursales: Los mercados de Sonora (Muestra B) y La Bola (Muestra C). Ante la existencia de más de un puesto expendedor de plantas medicinales, se tomó al azar uno de ellos y se adquirió en promedio cuatro kilogramos de la droga cruda.

Como se indicó anteriormente la primera muestra de material vegetal se recolectó en el Estado de Guerrero (Muestra A), de acuerdo a una serie de normas generales y especiales para la especie. Es importante destacar, que el proceso de recolección y almacenamiento es de extraordinaria importancia ya que, el aspecto, las características organolépticas y la calidad de las sustancias, entre otras, dependen del modo como se ha realizado la recolección y almacenamiento.

Siendo tan diversa la naturaleza de las drogas vegetales, en fresco y en seco, enteras o en polvo y con una composición química tan compleja, es necesario recurrir a los medios más diversos para evaluar la calidad de las mismas, recurriendo para ello a las diversas estrategias que, en general comprenden los siguientes ensayos:

- Ensayos de Identidad
- Ensayos de Pureza
- Ensayos químicos conducentes a la cuantificación de principio(s) activos(s) y/o compuestos marcadores.

#### **4.2 ENSAYOS DE IDENTIDAD**

Los ensayos de identidad realizados en la presente investigación incluyeron: la determinación de elementos extraños, la identificación macroscópica de la droga cruda y la determinación de las características macroscópicas de la droga pulverizada. Como se indicó previamente, la selección de los mismos se realizó con base en las normas establecidas por la OMS.

Cuadro 5. Relación de mercados en la ciudad de México.

<i>Mercado</i>	<i>Delegación</i>
1. Agrícola Oriental	Iztacalco
2. Azcapotzalco	Azcapotzalco
3. Central de Abasto	Iztapalapa
4. Coyoacán	Coyoacán
5. Culhuacán	Iztapalapa
6. Granada*	Miguel Hidalgo
7. Hidalgo	Cuauhtémoc
8. Jamaica	Venustiano Carranza
9. La Bola	Coyoacán
10. La Cruz	Magdalena Contreras
11. La Merced	Venustiano Carranza
12. La Villa	Gustavo A. Madero
13. Los Culhuacanes	Coyoacán
14. Magdalena Contreras*	Magdalena Contreras
15. Martínez de la Torre	Cuauhtémoc
16. Milpa Alta	Milpa Alta
17. Molino de Rosas*	Álvaro Obregón
18. Nopalera	Tláhuac
19. Portales	Benito Juárez
20. Puebla	Venustiano Carranza
21. Reynosa	Azcapotzalco
22. San Angel	Álvaro Obregón
23. San Juan de Letrán	Cuauhtémoc
24. Sonora	Venustiano Carranza
25. Tacuba	Miguel Hidalgo
26. Tacubaya	Miguel Hidalgo
27. Torres de Padierna	Tlalpan
28. Villa Coapa	Tlalpan
29. Xochimilco	Xochimilco
30. Mixcoac	Benito Juárez
31. San Mateo	Cuajimalpa

\* Mercados sin locales de ventas de plantas medicinales.

#### 4.2.1 Elementos extraños

La primera operación que hay que realizar antes de proceder con los ensayos de identidad, pureza y determinación de compuestos marcadores y biodinámicos, es privar a los materiales de los elementos extraños que los acompañan. Los elementos extraños están constituidos, en su totalidad o en parte, por:

1. Partes extrañas: todo elemento que procede de la planta originaria pero no constituye la droga propiamente dicha.
2. Materias extrañas: todo elemento ajeno a la planta de origen, de procedencia animal o mineral (Real Farmacopea Española, 1997).

Las tres muestras de material vegetal examinadas, mediante inspección visual, se encontraron exentas de cantidades apreciables de materias orgánicas, excrementos de animales, insectos y moho. Sin embargo, se encontraron algunos materiales de tipo inorgánico como piedras, polvo y terrones, entre otros. Estos materiales extraños se separaron del resto del material vegetal y se determinó que representan en promedio el 0.2% m/m en relación al peso seco de las muestras. En el Cuadro 6 se indican los resultados específicos para cada muestra.

**Cuadro 6.** Porcentaje de elementos extraños encontrados en las muestras de prueba.

Muestra	Porcentaje de elementos extraños
Muestra A	0.19
Muestra B	0.22
Muestra C	0.18

#### 4.2.2 Características macroscópicas de la droga cruda

En el caso de drogas enteras, los caracteres macroscópicos y organolépticos son suficientes, por lo general, para identificarlas. El aspecto global de la muestra indica frecuentemente, si es probable que ésta cumpla especificaciones oficiales. Sin embargo, las drogas pueden cumplir con las descripciones dadas en las Farmacopeas y no ser de la

calidad adecuada, pues con frecuencia, es difícil describir específicamente el deterioro de las drogas debido a una recolección, embarque o almacenamiento defectuoso, o por la alteración debida a la edad (San Martín, 1977; Wichtl, 1994).

Dentro de este panorama, el reconocimiento macroscópico de las drogas enteras debe comprender los siguientes aspectos:

- El olor entre las características organolépticas, es muy orientador en los exámenes micrográficos, siendo extraordinariamente típico para muchas especies con esencias (umbelíferas, compuestas, labiadas, etc).
- El sabor puede ser valioso en el caso de muchos materiales con sabor amargo (glucósidos, alcaloides, esencias, etc), o el astringente de los taninos.
- También el color puede desempeñar un papel diagnóstico. Así, colores muy marcados y característicos orientan sobre la posible presencia de algunas cortezas (quinas, granado, etc).

Con base en estas consideraciones, la descripción macroscópica correspondiente a la raíz desecada de la especie *H. excelsa* HBK. que constituye la droga cruda de venta en los mercados se estableció de la siguiente manera: La corteza de raíz tiene un color café rojizo o rosáceo, con abundantes manchas grisáceas. No tiene olor, el sabor es ligeramente astringente, de textura lisa a ligeramente fibrosa. Este tejido presenta la característica de contener numerosas fibras que le dan una consistencia elástica. Esta última característica se encuentra asociada al alto contenido de gutapercha en la raíz (Palacios *et al.*, 1989). Es importante mencionar que las características de las tres muestras analizadas fueron idénticas.

#### **4.2.3 Características macroscópicas de la droga pulverizada**

El examen de las drogas en polvo cobra mayor importancia que el de las drogas enteras porque bajo esta forma están más expuestas a las falsificaciones parciales o

totales. De extraordinaria utilidad para el examen de las drogas en polvo es el estudio del contenido celular. En el jugo celular, y con frecuencia en algunas vacuolas, se encuentran disueltos todos los principios sintetizados por las diferentes partes celulares, más aquellos otros que se han originado por las reacciones que entre éstos se verifican cuando se encuentran en condiciones favorables (San Martín, 1977; Wichtl, 1994).

Una vez realizada la identificación macroscópica de la droga entera, se llevó a cabo una serie de ensayos químicos preliminares, conducentes a la identificación macroscópica de la droga pulverizada.

Las reacciones químicas que se practicaron a las diferentes muestras de la droga pulverizada, incluyeron: determinación de taninos, determinación de catequina, determinación de aceites esenciales, ensayo para mucílagos y por último un análisis cualitativo por cromatografía en capa delgada. A continuación se describen los resultados de estos análisis.

a) Ensayos para taninos:

Los taninos son solubles en agua, álcalis diluidos, alcohol, glicerina y acetona, pero en general solo ligeramente solubles en otros disolventes orgánicos. Las soluciones precipitan con metales pesados, alcaloides, heterósidos y gelatina. Con sales férricas, galotaninos y elagitaninos dan precipitados de color azul oscuro y los taninos condensados verde parduzco (Price y Butler, 1977; Mole y Waterman, 1987; Inoue y Hagerman, 1988; Waterman y Mole, 1994).

Para la realización del ensayo, una pequeña cantidad del polvo se mezcló con unas gotas de una solución de cloruro férrico 0.1 M. En presencia de una solución de ferrocianuro de potasio 0.08 M se obtuvo un color azul oscuro, comparable al desarrollado por una muestra de ácido tánico y catequina.

b) Ensayo para catequina:

Las catequinas por calentamiento con ácidos, forman floroglucinol, y por ello, pueden detectarse mediante una modificación del ensayo de la lignina (Waterman y



Mole, 1994). Para ello, un pequeño fragmento de madera se sumergió en el extracto de la planta, se desecó y se empapó con ácido clorhídrico concentrado. Posteriormente, al calentarlo cerca de una llama se observó la aparición de un color rojizo, debido a la presencia de floroglucinol.

c) Ensayo para aceites esenciales y fijos:

Los aceites esenciales son generalmente mezclas de hidrocarburos y compuestos oxigenados derivados de ellos. El olor y sabor de las esencias están determinados principalmente por estos componentes oxigenados que, por lo general, son apreciablemente solubles en agua (agua de azahar, agua de rosas, etc), pero más solubles en alcohol (tinturas o perfumes de limón, etc). Por otra parte, los aceites fijos y grasas son mezclas naturales de lípidos, que pueden ser tanto líquidas como sólidas, ya que, los términos aceite y grasa no tienen una significación muy precisa. El aceite de chaulomoogra, por ejemplo, puede llamarse aceite en los trópicos, donde es un líquido, y grasa en los climas templados, donde es un sólido graso (Trease y Evans, 1989).

Para discriminar entre la presencia de aceites esenciales o fijos, 100 g de cada una de las drogas crudas se sometió a un proceso de destilación por medio de arrastre con vapor de agua, de acuerdo con la metodología descrita por la OMS ( en WHO, *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*, 1988). Los resultados de estas determinaciones indicaron, que en las tres muestras de material vegetal examinadas no se obtuvo un volumen cuantificable de aceites esenciales. Por tal motivo, no se consideró la determinación de aceites esenciales como ensayo de pureza para la especie *H. excelsa* HBK.

De manera adicional, una pequeña cantidad del polvo, se comprimió entre papel de filtro. La aparición de una mancha oleosa, que persistió cuando el papel fue calentado en la estufa, indicó que el polvo contiene en su mayoría aceites fijos.

c) Ensayo para mucílagos:

Los mucílagos son polisacáridos complejos, constituidos por unidades de azúcar y ácido urónico. Son insolubles en alcohol, pero se disuelven o se hinchan en agua. Por lo

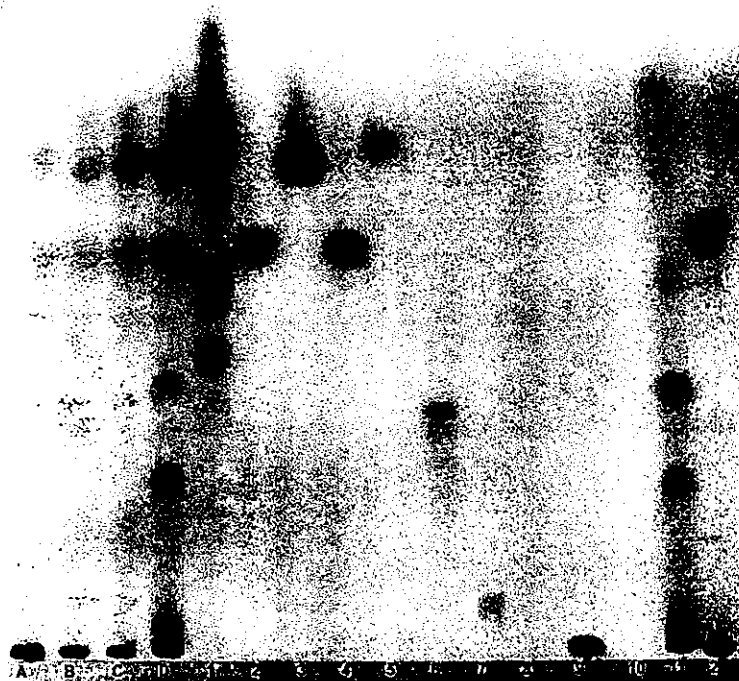
general, se forman a partir de la membrana celular, como el tragacanto, o se depositan sobre ella en capas sucesivas (Trease y Evans, 1989).

Para determinar la naturaleza gomosa o mucilaginoso de la droga pulverizada, una pequeña cantidad del polvo se mezcló con ácido sulfúrico diluido. La reacción positiva para mucílagos produce efervescencia cuando se adiciona una solución saturada de carbonato de calcio. En este caso particular, la reacción fue positiva para las tres muestras ensayadas, por lo que, la determinación de índice de hinchamiento es aplicable para esta especie.

d) Análisis por cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina junto con el examen microscópico juega un papel muy importante en la identificación y control de calidad de las drogas vegetales. Para realizar este ensayo se prepararon extractos cuantitativos de las muestras de material vegetal y se compararon cromatográficamente con soluciones estándar de los siguientes compuestos: la friedelina (1), el canofilol (2), el canofilal (3), el ácido canofílico (4), la tingenona (5), la epicatequina (14), el ácido oleanólico y el ácido ursólico. De manera adicional, se aplicó una muestra del extracto total [ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (1:1)] de la preparación comercial *Yagabil* y de las cápsulas elaboradas con cancerina. Todos los metabolitos utilizados como estándares se habían aislado en forma pura durante la realización de estudios fitoquímicos previos (Mata *et al.*, 1990; Calzada *et al.*, 1991; Calzada y Mata, 1995; Trejo Miranda, 1998). En las Figuras 6 y 7 se muestran los cromatogramas en capa fina correspondientes.

Como se puede observar en las Figuras 6 y 7, extractos de las muestras A-C y del *Yagabil* resultaron cromatográficamente similares identificándose la presencia de todos los compuestos utilizados como estándares. Es importante hacer notar que en el extracto elaborado con el material vegetal que contienen las cápsulas de cancerina no se detectó ninguno de los estándares. Estos resultados sugieren que las cápsulas de cancerina se elaboran con una especie distinta a la *H. excelsa* HBK. Los diversos valores de *R<sub>f</sub>*



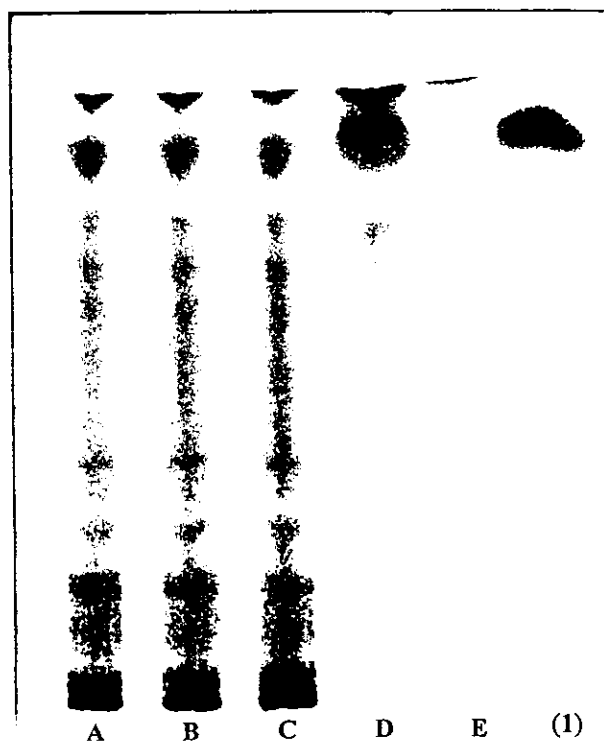
Parámetros de separación:

Cantidad aplicada: 20  $\mu\text{L}$  de muestra. Placas: Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck. Sistema de elución:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : acetona 85:15. Evaluación directa: UV 254 nm y 365 nm. Agente cromógeno: Vainillina

Muestras: [A] Muestra A, [B] Muestra B, [C] Muestra C, [D] Muestra D (preparación comercial *Yagabil*), [10] Muestra E (cápsulas elaboradas con cancerina) y [1] Extracto hexánico.

Estándares: [2] Canofilol, [3] Canofilal, [4] Ácido canofílico, [5] Friedelina, [6] Tingenona, [7] Ácido oleanólico, [8] Ácido ursólico y [9] catequina (1 mg en 1 mL).

Figura 6. Cromatograma en capa fina de diferentes muestras de *Hippocratea excelsa* HBK.



Parámetros de separación:

Cantidad aplicada: 20  $\mu$ L de muestra. Placas: Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck. Sistema de elución: AcOEt: ácido fórmico: agua 80:13:7. Evaluación directa: UV 254 nm y 365 nm. Agente cromógeno: Vainillina

Muestras: Muestra A, Muestra B, Muestra C, Muestra D (preparación comercial *Yagabil*) y Muestra E (cápsulas elaboradas con cancaerina).

Estándares: Epicatequina (1) (1 mg en 1 mL).

Figura 7. Cromatograma en capa fina de diferentes muestras de *Hippocratea excelsa* HBK.

(relación del desplazamiento, es decir distancia recorrida por el producto dividido entre la distancia recorrida por el frente del disolvente) de los compuestos, determinados en condiciones específicas son característicos y pueden emplearse como ayuda para su identificación. En las condiciones experimentales señaladas en las Figuras 6 y 7, se obtuvieron los valores de  $R_f$  que se indican en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Valores de  $R_f$  de los diversos metabolitos utilizados como estándares.

Compuesto	$R_f$
Friedelina	0.7634±0.0148
Canofilol	0.6216±0.0052
Canofilal	0.7373±0.0223
Ácido canofílico	0.6478±0.0816
Tingenona	0.5635±0.0035
Ácido oleanólico	0.0090±0.0192
Ácido ursólico	0.0375±0.0227
Epicatequina	0.9002±0.0054

Cada valor representa el promedio de seis réplicas ± Desviación Estándar.

La intensidad de las manchas cromatográficas visualizadas en el cromatograma, permitió establecer que el canofilol (2), el canofilal (3) y la catequina (14) constituyen los mejores compuestos marcadores para la identificación de la especie. Cabe destacar, que los productos canofilol, canofilal, ácido canofílico, friedelina, tingenona, ácido oleanólico, ácido ursólico y catequina se detectaron en todas las placas realizadas. Sin embargo, la hipocrateína I sólo se detectó en el caso de la muestra A. Estos resultados, aunque cualitativos sugieren que el contenido de alcaloides podría estar sujeto a variaciones ontogénicas y de tipo geográfico.

### 4.3 ENSAYOS DE PUREZA

Los ensayos de pureza realizados en el presente estudio comprenden las siguientes determinaciones: humedad, cenizas (totales e insolubles en ácido), material extraíble, índice de hinchamiento, contaminación microbiológica y metales pesados.

### 4.3.1 HUMEDAD

Se entiende por humedad el agua libre, es decir, no combinada químicamente, que tiene una sustancia. En las drogas desecadas al aire, este contenido de agua es un componente normal (10-12%). Un exceso de humedad en las drogas no es deseable, ya que puede provocar la activación de enzimas y crear condiciones favorables para la proliferación de microorganismos. Como la mayoría de las drogas vegetales contienen todos los elementos esenciales para la nutrición de mohos, insectos y ácaros, el deterioro puede ser muy rápido una vez iniciada la infestación (WHO, *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*, 1988; Wichtl, 1994).

De manera adicional, la determinación de humedad informa sobre el proceso de desecación y se relaciona, asimismo, con el registro del peso, es decir, tiene utilidad cuando se maneja un número considerable de muestras y cuando se necesita un registro continuo de la pérdida del peso con el tiempo (Trease y Evans, 1989).

En la actualidad, se emplea un considerable número de métodos para la determinación de la humedad, muchos de ellos utilizados en industrias no relacionadas con la Farmacia. La determinación de pérdida de peso por desecación se emplea en la Farmacopea de Europa, Inglaterra y de los Estados Unidos de América del Norte. Aunque la pérdida de peso en las muestras ensayadas por este procedimiento se debe principalmente al agua, también contribuyen a la pérdida de peso pequeñas cantidades de productos volátiles. Como se demostró previamente la droga cruda derivada de la especie *Hippocratea excelsa* HBK. no contiene cantidades considerables de sustancias volátiles, por lo que, en el presente trabajo se utilizó un método por desecación directa. El resultado de estas determinaciones indican que el contenido de agua en la muestras comerciales B y C es de  $1.8 \pm 0.1\%$  y  $2.1 \pm 0.1\%$ , respectivamente y de  $1.9 \pm 0.1\%$  en la muestra A.

Como se desprende de los resultados obtenidos, el contenido de agua en las muestras es bajo y por lo tanto las muestras no son susceptibles a contaminación por hongos y bacterias por exceso de humedad.

### 4.3.2 CENIZAS

Cuando las drogas vegetales se incineran, dejan una ceniza inorgánica que, en el caso de muchas drogas (ruibarbo, por ejemplo), varía entre límites amplios y, por lo tanto, tiene escaso valor para fines de tipificación. En otros casos (como en el regaliz mondado o sin mondado), el contenido de cenizas totales es importante, e indica, en cierta medida, el cuidado que se ha tenido en la preparación de la droga (San Martín, 1977; Wichtl, 1994).

El contenido de cenizas totales se refiere a las sustancias minerales de origen natural o fisiológico en la planta y está influido extraordinariamente por las diferencias geográficas (clima, tipo de suelo, cultivo, abono, etc). Normalmente, las cenizas totales se componen de carbonatos, fosfatos, silicatos y sílice (Trease y Evans, 1989; Wichtl, 1994; Escamilla *et al.*, 1995).

Por otra parte, las cenizas insolubles en ácido representan el residuo obtenido después de tratar las cenizas totales con HCl diluido. En el Cuadro 8 se resumen los resultados obtenidos de estas determinaciones.

**Cuadro 8.** Contenido de cenizas totales e insolubles en ácido encontrados en las muestras de prueba.

MUESTRA	CONTENIDO DE CENIZAS TOTALES (g)	CONTENIDO DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO (g)
Muestra A	0.0886±0.0012	0.0073±0.0015
Muestra B	0.0584±0.0004	0.0062±0.0003
Muestra C	0.0612±0.0006	0.0071±0.0008

Los resultados están dados con respecto a 1 g de material vegetal. Cada valor representa el promedio de seis réplicas ± Desviación Estándar.

El tratamiento estadístico de los resultados no reveló diferencia significativa entre las muestras ensayadas después de someter los resultados a un Análisis de Varianza ( $\alpha=0.05$ ).

### 4.3.3 MATERIAL EXTRAIBLE

La determinación de los materiales extractivo-hidrosolubles o alcohol-solubles se utiliza como medio de valoración de drogas cuyos componentes activos no pueden determinarse fácilmente por otros procedimientos. De manera general, la determinación de materia extractiva se realizó cuantificando, la cantidad de constituyentes extraíbles con diferentes disolventes de naturaleza polar y no polar. La selección del método y del disolvente de extracción se realizó considerando las propiedades fisicoquímicas de los diferentes constituyentes presentes en un extracto vegetal incluyendo los principios activos. Así, por ejemplo, en hexano pasan a la solución constituyentes de naturaleza poco polar como triglicéridos, éteres aromáticos, ácidos grasos, ceras, esteroides, triterpenoides poco polares, entre otros. En contraste, en etanol y etanol diluido pasan a la solución constituyentes de naturaleza polar como son heterósidos, taninos, glucosa, ácidos orgánicos, resinas, alcaloides, antranoles, aminas, etc. Los resultados de estas determinaciones se resumen en el Cuadro 9.

**Cuadro 9.** Resultados de la determinación de material extraíble en diferentes disolventes.

DISOLVENTE	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C
Hexano	0.0099±0.0002	0.0102±0.0004	0.0010±0.0002
EtOH	0.0781±0.0024	0.0763±0.0017	0.0775±0.0010
EtOH diluido	0.1954±0.0031	0.1907±0.0057	0.1931±0.0038

Los resultados están dados con respecto a 4 g de material vegetal. Cada valor representa el promedio de seis réplicas ± Desviación Estándar.

Es importante mencionar que el método de extracción utilizado fue el de maceración, ya que la planta contiene compuestos fenólicos cuya oxidación se ve favorecida en presencia de calor.

### 4.3.4 INDICE DE HINCHAMIENTO

El índice de hinchamiento se define como el volumen en mililitros ocupado por 1 g de droga y mucílago, después de su hinchamiento por permanecer 4 horas en un líquido acuoso. Esta determinación solo es aplicable para drogas que contienen mucílago como



es el caso de las semillas de lino. En el Cuadro 10 se indican los resultados específicos para cada muestra.

**Cuadro 10.** Resultados de la determinación del índice de hinchamiento en las muestras de prueba.

MUESTRA	Volumen (mL) ocupado por 1 g de droga después de su hinchamiento.
MUESTRA A	5.1±0.1
MUESTRA B	5.0±0.1
MUESTRA C	5.4±0.1

Cada valor representa el promedio de nueve réplicas ± Desviación Estándar. El volumen ocupado por la droga seca fue en todos los casos de 2.2±0.1 mL.

#### 4.3.5 DETERMINACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA

La calidad sanitaria de las plantas medicinales debe evaluarse mediante el recuento de microorganismos aerobios viables totales, hongos filamentosos y levaduras, así como, la investigación de los siguientes microorganismos patógenos: *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (FEUM, sexta edición; WHO, *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*, 1988).

De acuerdo con las normas establecidas en países de la Comunidad Europea las drogas que han de ser administradas por vía interna, deben cumplir con los límites de contaminación por bacterias y mohos que se citan a continuación:

Carga microbiana total	Máximo 10 <sup>5</sup> /g
Levaduras y mohos	Máximo 10 <sup>3</sup> /g
Enterobacterias	Máximo 10 <sup>3</sup> /g
<i>Escherichia coli</i>	Máximo 10 <sup>1</sup> /g
Salmonelas	Ausencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia

Hay que tener en cuenta, por otra parte, que durante la preparación de una infusión o de una decocción se produce una fuerte reducción de la carga microbiana. Sin embargo, en el caso de las maceraciones y otras extracciones acuosas en frío, cuando las drogas se mantienen en agua durante muchas horas, resulta posible la proliferación de los gérmenes y la carga microbiana puede aumentar hasta hacer discutible la calidad higiénica de la preparación. Este principio está contemplado por algunas Farmacopeas que permiten límites mayores para aquellos preparados destinados a infusiones y decocciones (Wichtl, 1994). Así la Farmacopea Europea 3, en su monografía sobre la calidad microbiológica de las preparaciones farmacéuticas, para los preparados a base de drogas vegetales fija límites distintos de acuerdo a las dos categorías siguientes:

A. Medicamentos a partir de drogas vegetales en cuyo empleo interviene agua hirviente (tisanas):

Carga microbiana total	Máximo $10^7/g$
Levaduras y mohos	Máximo $10^4/g$
<i>Escherichia coli</i>	Máximo $10^2/g$

B. Otros medicamentos a partir de drogas vegetales:

Carga microbiana total	Máximo $10^5/g$
Levaduras y mohos	Máximo $10^4/g$
Enterobacterias	Máximo $10^3/g$
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia
Salmonelas	Ausencia

Al fijar los límites para la contaminación microbiana de las drogas vegetales, debe tenerse en cuenta también que prácticamente no existe ningún procedimiento que permita destruir la carga microbiana sin deteriorar, de alguna manera, los componentes de la droga. En el presente estudio se determinó tanto el límite microbiano como la ausencia de microorganismos patógenos (WHO, *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*, 1988).

#### **4.3.5.1 DETERMINACIÓN DEL LIMITE MICROBIANO**

El recuento de microorganismos aerobios viables totales se determinó por los métodos de recuento en placa y dilución serial (NMP) (FEUM, sexta edición; Collins y Lyne, 1989). Estos métodos se fundamentan en la observación de la formación de colonias en placas de agar y en la producción de turbiedad, gas o cambios de pH en los medios de cultivo.

##### **4.3.5.1.1 Método de recuento en placa**

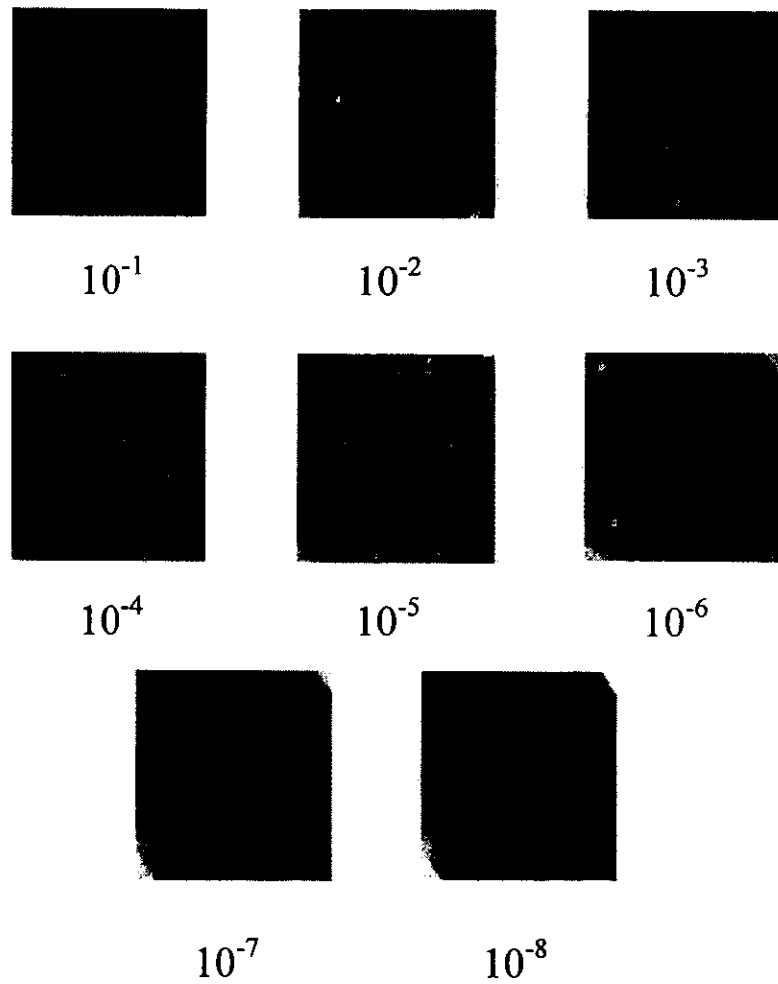
Mediante la aplicación de este método, se realizó tanto el recuento de bacterias como de hongos. De acuerdo con estas determinaciones las muestras comerciales B y C presentan una cuenta microbiana total de  $7.1 \times 10^{10}$  y  $4.6 \times 10^{11}$  UFC por gramo, respectivamente. Así mismo, la muestra A presentó una cuenta microbiana total de  $5.8 \times 10^3$  UFC por gramo.

Los resultados anteriores indican que las Muestras B y C presentan una cuenta microbiana total que rebasa los límites establecidos por los países de la Comunidad Europea. Sin embargo, es importante hacer notar que las drogas constituidas por raíces contienen más residuos del suelo y por lo tanto presentarán siempre mayor cantidad de microorganismos, en comparación, por ejemplo, con drogas constituidas por flores, las cuales ofrecen a bacterias y hongos un ambiente menos favorable.

Por otro lado, las tres muestras de material vegetal se encuentran libres de contaminación por hongos filamentosos y levaduras. En la Figura 8, y a manera de ejemplo se ilustran las superficies de las cajas de Petri donde se realizaron las diferentes diluciones para el recuento de bacterias en la muestra comercial B.

##### **4.3.5.1.2 Método de dilución serial (NMP)**

El método de dilución serial es de carácter estadístico y se fundamenta en la teoría de la probabilidad. Para calcular el número de microorganismos más probable por gramo de muestra, se utilizó la Tabla 2. Los resultados obtenidos de esta determinación se resumen en el Cuadro 11.



**Figura 8.** Efecto de las diluciones en el desarrollo del número de colonias bacterianas (Muestra B).

La validez de ambos métodos se demostró mediante la aplicación de la metodología descrita anteriormente (ver inciso 3.5.5) a las cepas de los microorganismos de referencia indicadas en el Cuadro 4. Los resultados para la especie *Escherichia coli* se ilustran en la Figura 9.

**Cuadro 11.** Número más probable de microorganismos encontrados en las muestras.

Muestra	Número más probable de microorganismos por gramo de muestra
Muestra A	$0.7 \times 10^8$
Muestra B	$1.1 \times 10^8$
Muestra C	$2.2 \times 10^4$

#### 4.3.5.2 Determinación de microorganismos patógenos

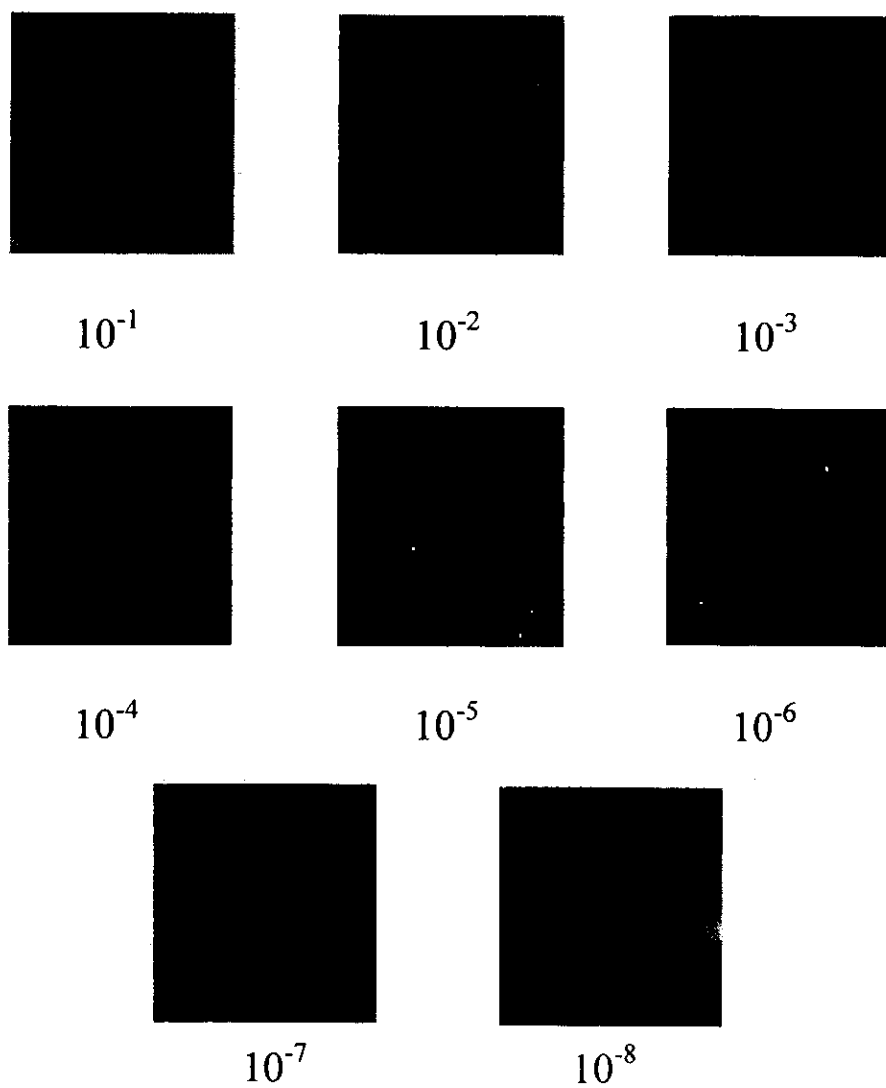
Los resultados de la determinación de la posible presencia de microorganismos patógenos en las muestras de prueba se dividen en dos partes. La primera abarca todo lo concerniente a la identificación de *Escherichia coli* y *Salmonella* sp. (Enterobacteriaceae). La segunda, comprende la identificación de *Staphylococcus aureus* (Micrococcaceae) y *Pseudomonas aeruginosa* (Pseudomonadaceae).

##### a) Detección de *E. coli* y *Salmonella* sp.

Antes de describir y discutir los resultados relativos a la determinación de *E. coli* y *Salmonella* sp. es importante destacar algunos aspectos relacionados con la identificación presuntiva de los miembros de la familia Enterobacteriaceae. Los miembros de esta familia se encuentran ampliamente dispersos en la naturaleza, encontrándoseles en suelos y agua, en plantas y como lo indica el nombre de la familia, en el tubo digestivo de humanos y animales. Estos microorganismos pueden estar incriminados virtualmente en cualquier tipo de enfermedad infecciosa y ser recuperados de cualquier muestra recibida en los laboratorios. *E. coli* es la especie más comúnmente recuperada en los laboratorios clínicos y es la causa de enfermedades infecciosas en todos

**Tabla 2.** Número más probable para usar con diluciones decimales y cinco tubos por dilución (Collins y Lyne, 1989).

P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	Número más probable dado por P <sub>3</sub>					
		0	1	2	3	4	5
0	0	-----	0.018	0.036	0.054	0.072	0.090
0	1	0.018	0.036	0.055	0.073	0.091	0.110
0	2	0.037	0.055	0.074	0.092	0.110	0.130
0	3	0.056	0.074	0.093	0.110	0.130	0.150
0	4	0.075	0.094	0.110	0.130	0.150	0.170
0	5	0.094	0.110	0.130	0.150	0.170	0.190
1	0	0.020	0.040	0.060	0.080	0.100	0.120
1	1	0.040	0.061	0.081	0.100	0.120	0.140
1	2	0.061	0.082	0.100	0.120	0.150	0.170
1	3	0.083	0.100	0.130	0.150	0.170	0.190
1	4	0.110	0.130	0.150	0.170	0.190	0.220
1	5	0.130	0.150	0.170	0.190	0.220	0.240
2	0	0.045	0.068	0.091	0.120	0.140	0.160
2	1	0.068	0.092	0.120	0.140	0.170	0.190
2	2	0.093	0.120	0.140	0.170	0.190	0.220
2	3	0.120	0.140	0.170	0.200	0.220	0.250
2	4	0.150	0.170	0.200	0.230	0.250	0.280
2	5	0.170	0.200	0.230	0.260	0.290	0.320
3	0	0.078	0.110	0.130	0.160	0.200	0.230
3	1	0.110	0.140	0.170	0.200	0.230	0.270
3	2	0.140	0.170	0.200	0.240	0.270	0.310
3	3	0.170	0.210	0.240	0.280	0.310	0.350
3	4	0.210	0.240	0.280	0.320	0.360	0.400
3	5	0.250	0.290	0.320	0.370	0.410	0.450
4	0	0.130	0.170	0.210	0.250	0.300	0.360
4	1	0.170	0.210	0.260	0.310	0.360	0.420
4	2	0.220	0.260	0.320	0.380	0.440	0.500
4	3	0.270	0.330	0.390	0.450	0.520	0.590
4	4	0.340	0.400	0.470	0.540	0.620	0.690
4	5	0.410	0.480	0.560	0.640	0.720	0.810
5	0	0.230	0.310	0.430	0.580	0.760	0.950
5	1	0.330	0.460	0.640	0.840	1.100	1.300
5	2	0.490	0.700	0.950	1.200	1.500	1.800
5	3	0.790	1.100	1.400	1.800	2.100	2.500
5	4	1.300	1.700	2.200	2.800	3.500	4.300
5	5	2.400	3.500	5.400	9.200	1.600	-----



**Figura 9.** Efecto de las diluciones en el desarrollo del número de colonias bacterianas (*Escherichia coli* ATCC 8739).

los tejidos y órganos humanos. Ciertas cepas de *E. coli* pueden causar enteritis o gastroenteritis por diferentes mecanismos, dando como resultado síndromes clínicos distintos. La *E. coli* también es uno de los microorganismos comunes involucrados en sepsis por gramnegativos y shock inducido por endotoxinas. Las infecciones urinarias y de heridas, la neumonía en pacientes inmunosuprimidos hospitalizados y la meningitis en neonatos son otras infecciones comunes causadas por *E. coli* (Brock *et al.*, 1987; MacFaddin, 1990; Koneman *et al.*, 1992; Joklik y Phil, 1994).

Por otra parte, las infecciones humanas con salmonelas ocurren de manera habitual por la ingesta de alimentos, agua o leche contaminados por heces de humanos o animales. Es posible diferenciar cuatro tipos clínicos de infección por salmonelas: 1) gastroenteritis, la manifestación más frecuente; 2) bacteremia o septicemia (la *S. choleraesuis* es particularmente invasiva); 3) fiebre entérica, potencialmente causada por cualquier cepa de especies de *Salmonella* y 4) un estado de portador en el cual sujetos con una infección previa, en especial por *S. typhi*, pueden continuar eliminando el microorganismo en sus heces hasta un año después de la remisión de los síntomas (Koneman *et al.*, 1992; Joklik y Phil, 1994).

La identificación presuntiva de estos microorganismos puede realizarse preparando una tinción de Gram o bien, observando la morfología de las colonias en medios sólidos, como por ejemplo agar sangre de carnero. No obstante, la diferenciación de las Enterobacterias se basa principalmente en la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético de los cromosomas bacterianos. Estas enzimas dirigen el metabolismo bacteriano a lo largo de una de las diversas vías que pueden detectarse con medios especiales utilizados en las técnicas de cultivo *in vitro* (Brock *et al.*, 1987; MacFaddin, 1990; Koneman *et al.*, 1992).

Con base en las consideraciones anteriores, se realizó una selección de medios de cultivo, para evaluar las diferentes características metabólicas de los microorganismos, de tal manera que se estableció un perfil bioquímico que permitió la identificación de las especies buscadas.



Para la recuperación de la especie *E. coli* se utilizaron los medios de MacConkey y EMB (eosina-azul de metileno). Estos medios son moderadamente inhibidores impidiendo el crecimiento de bacterias grampositivas. También, inhiben muchas especies de microorganismos exigentes tales como especies de *Bordetella* y *Brucella*, entre otras. Como se indicó, en la sección experimental, las muestras de material vegetal objeto de estudio, se suspendieron en caldo lactosa y se incubaron a 35°C durante 3 horas, período de tiempo suficiente para reactivar a los microorganismos presentes pero, insuficiente para favorecer su multiplicación (WHO, *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*, 1988). Posteriormente, se inoculó 1 mL de este cultivo en 100 mL de medio líquido MacConkey, por las razones arriba indicadas. Finalmente, se realizaron los subcultivos en los medios selectivos y/o diferenciales para detectar las características bioquímicas más importantes en la identificación preliminar de la especie. En la Figura 10 se muestran las superficies de agar MacConkey, con un crecimiento de 24 horas que ilustran colonias fermentadoras de lactosa en coloración roja y colonias más pequeñas, no fermentadoras de lactosa y claras. Así mismo, en la Figura 10 se muestran las superficies de agar EMB que ilustran la generación de un pigmento de color verde metálico. La producción de este pigmento es característico de la especie *E. coli*.

Como se puede observar en la Figura 10, las características morfológicas de las colonias desarrolladas por las muestras de prueba no corresponden con las características morfológicas desarrolladas por la cepa de referencia. En principio esto permite inferir que las muestras se encuentran libres de *E. coli*, sin embargo, para la confirmación definitiva del resultado se realizaron pruebas bioquímicas adicionales.

Las pruebas diferenciales empleadas para evaluar las características metabólicas de *E. coli* fueron las siguientes: citocromooxidasa, producción de indol, utilización de carbohidratos, rojo de metilo, prueba de Voges-Proskauer, producción de sulfuro de

## Agar MacConkey



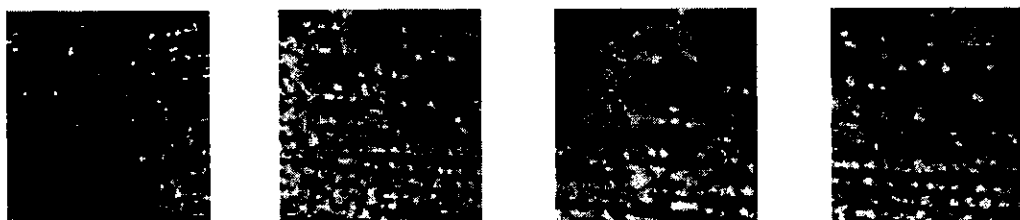
1

2

3

4

## Agar EMB (eosina-azul de metileno)



1

2

3

4

**Figura 10.** Morfología macroscópica de las colonias bacterianas desarrolladas en las superficies de agar MacConkey y agar EMB: 1) Cepa de *E. coli* ATCC 8739, 2) Muestra A, 3) Muestra B y 4) Muestra C

hidrógeno y motilidad, además de los 30 sustratos bioquímicos incluidos en el panel comercial BBL CRYSTAL<sup>®</sup>. Los resultados de estas evaluaciones se resumen en el Cuadro 12.

El análisis detallado de los resultados obtenidos permiten comprobar por una parte, que las muestras ensayadas cumplen con el requisito de ausencia de *E. coli*, y por la otra que los microorganismos recuperados en las muestras presentan el perfil bioquímico característico de la especie *Enterobacter cloacae*.

En la recuperación de la especie *Salmonella* sp, se utilizaron los siguientes medios selectivos: agar *Salmonella-Shigella* (SS), agar xilosa, lisina y desoxicolato (XLD), agar sulfito de bismuto y agar verde brillante. La selectividad de estos medios permite el

empleo de inóculos grandes para recuperar especies significativas de *Salmonella* de muestras fuertemente contaminadas. Así, el agar SS es un medio altamente selectivo que inhibe el crecimiento de muchos microorganismos coliformes. Por otra parte, los agares con sulfito de bismuto y verde brillante son medios selectivos, diseñados específicamente para recuperar *Salmonella typhi* (Brock *et al.*, 1987; MacFaddin, 1990; Koneman *et al.*, 1992).

De nueva cuenta, el material vegetal se suspendió en caldo lactosa. Posteriormente, se inoculó 1 mL de esta mezcla en 100 mL del medio de enriquecimiento compuesto por tetracionato, bilis y verde brillante. Este medio de enriquecimiento mantiene en fase de latencia (lag) a microorganismos como *E. coli*, pero favorece el crecimiento exponencial (log) de especies de *Salmonella* y *Shigella*. En este caso particular, los subcultivos en los medios selectivos se realizaron a las 8 horas de incubación, ya que con el transcurso del tiempo el crecimiento de *E. coli* y otros microorganismos gramnegativos, ya no se suprime. En la Figura 11 se ilustran las superficies de las placas, con un crecimiento de 24 horas.

A continuación se enumeran las características morfológicas más relevantes, de las colonias desarrolladas por las muestras de prueba:

- A. Las placas de agar XLD ilustran claramente el cambio de coloración del medio de rojo a amarillo, debido al desarrollo de colonias que producen ácidos. La producción de ácidos a su vez indica la utilización de carbohidratos.
- B. Las colonias desarrolladas en agar SS son pequeñas, de pigmentación rosa pálido e inducen un cambio de color en el medio que las circunda, de rosa claro a amarillo paja.
- C. Las colonias desarrolladas en agar verde brillante son en su mayoría de coloración rosa, rodeadas por una zona roja. También, se observan colonias de pigmentación amarillo brillante, mismas que ocasionan un cambio de color en el medio (de rojo naranja o rojo intenso) que las circunda.

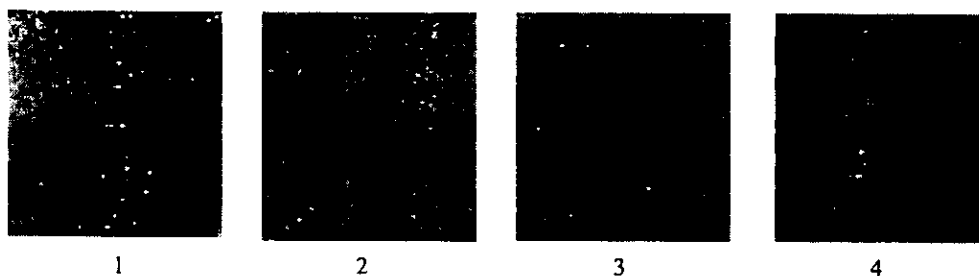
Cuadro 12. Reacciones bioquímicas de las muestras de prueba y de la especie *E. coli*.

Reacción Bioquímica	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Muestra A	Muestra B	Muestra C
Oxidasa	-	-	-	-	-
Indol	+	-	-	-	-
Rojo de Metilo	+	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	+	+	+	+
Motilidad	+	+	+	+	+
Producción de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-
Lactosa	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+
Arabinosa	V	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+
Sucrosa	-	+	+	+	+
Melibiosa	+	+	+	+	+
Ramnosa	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+
Adonitol	-	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	+	+	+
p-n-p-fosfato	V	V	+	+	+
p-n-p- $\alpha$ - $\beta$ -glucósido	-	V	+	+	+
p-n-p- $\beta$ -galactósido	+	+	+	+	+
Prolina-nitroanilida	-	-	-	-	-
p-n-p-bifosfato	V	V	+	+	+
p-n-p-xilósido	-	+	+	+	+
p-n-p- $\alpha$ -arabinósido	(+)	(+)	+	+	+
p-n-p-fosforilcolina	-	-	-	-	-
p-n-p- $\beta$ -glucorónido	+	-	-	-	-
p-n-p-N-acetil-glucosaminida	-	+	+	+	+
$\gamma$ -L-glutamil-p-nitroanilida	-	+	+	+	+
Esculina	-	V	+	+	+
p-nitro-DL-fenilalanina	-	-	-	-	-
Urea	-	V	+	+	+
Glicina	-	-	-	-	-
Citrato	-	+	+	+	+
Malonato	-	+	+	+	+
Tetrazolio	(+)	+	+	+	+
Arginina	V	(+)	+	+	+
Lisina	+	V	+	+	+

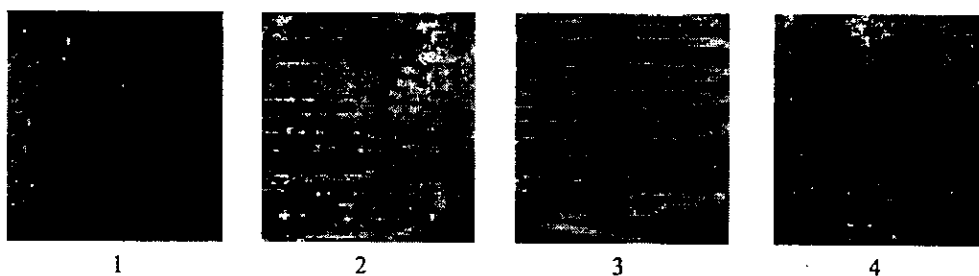
+ Reacción positiva, - Reacción negativa, V Reacción variable, (+) generalmente positiva pero a veces negativo.

D. En agar sulfito de bismuto las colonias desarrolladas presentan un brillo negro.

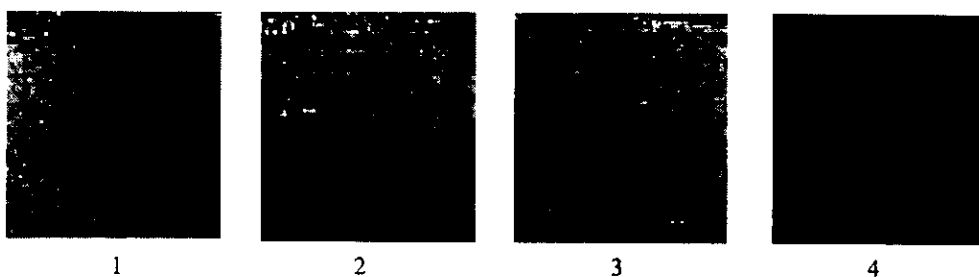
Agar *Salmonella-Shigella*



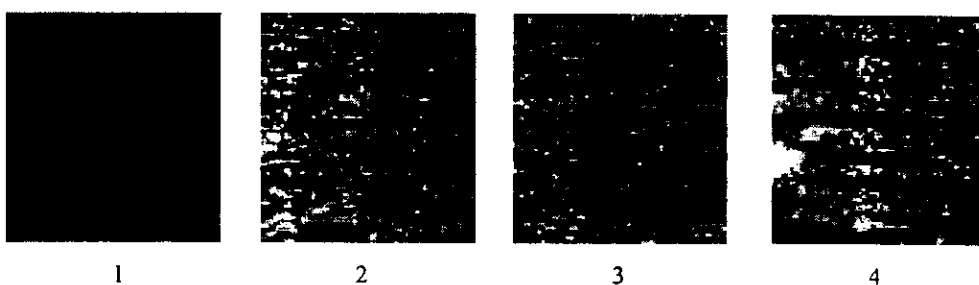
Agar XLD



Agar sulfito de bismuto



Agar verde brillante



**Figura 11.** Morfología macroscópica de las colonias bacterianas desarrolladas en las superficies de agar SS, agar XLD, agar sulfito de bismuto y agar verde brillante: 1) Cepa de *Salmonella typhi*, 2) Muestra A, 3) Muestra B y 4) Muestra C.

El análisis de las características morfológicas desarrolladas por las colonias en los medios selectivos sugieren la presencia de especies del género *Salmonella* en las muestras de prueba. Es importante destacar que la morfología de las colonias desarrolladas en agar XLD no corresponden con las características morfológicas descritas para esta especie. El aspecto de las mismas sugiere la presencia de bacterias coliformes que utilizan la lactosa que contiene el medio. Es importante mencionar que el número de colonias de coliformes detectadas no fue significativo.

Las colonias que presentaron las características de bacterias del género *Salmonella*, se transfirieron al medio sólido agar triple azúcar con hierro (TSI), mediante siembra en superficie y profundidad. En todos los casos, se observó pico de flauta alcalino, profundidad ácida, producción de H<sub>2</sub>S y gas. Estos resultados sugieren la presencia de bacterias no fermentadoras de lactosa y productoras de H<sub>2</sub>S como es el caso de las pertenecientes al género. De igual manera, para realizar una mayor identificación de la especie, se realizaron pruebas bioquímicas adicionales. Los resultados de estas evaluaciones se resumen en el Cuadro 13.

Los resultados de estas evaluaciones, permiten comprobar que las muestras ensayadas se encuentran libres de especies de *Salmonella*, sin embargo, se recuperaron microorganismos bioquímicamente sugestivos del género *Klebsiella*.

b) Detección de *S. aureus* y *Pseudomonas aruginosa*.

La familia Micrococcaceae se compone de tres géneros: *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Planococcus*. Dentro del género *Staphylococcus* la especie más patógena para el hombre es el *S. aureus*, un microorganismo capaz de causar infección en cualquier sitio del organismo. Las infecciones en la piel pueden ser de leves a graves e incluyen abscesos, impétigo, forúnculos, carbunco e infecciones sistémicas graves que pueden asociarse con exfoliación superficial de la epidermis (síndrome de la piel escaldada). La bacteremia de *S. aureus* es común y puede relacionarse con endocarditis

Cuadro 13. Reacciones bioquímicas de las muestras de prueba y de la especie *Salmonella typhi*.

Reacción Bioquímica	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Muestra A	Muestra B	Muestra C
Oxidasa	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
Rojo de Metilo	+	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	+	+	+	+
Motilidad	+	-	-	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S	+	-	+	+	+
Lactosa	-	+	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+
Arabinosa	+	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+
Sucrosa	-	+	+	+	+
Melibiosa	+	V	+	+	+
Ramnosa	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+
Adonitol	-	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+	+	+
Inositol	-	+	+	+	+
p-n-p-fosfato	-	V	+	+	+
p-n-p- $\alpha$ - $\beta$ -glucósido	-	+	+	+	+
p-n-p- $\beta$ -galactósido	-	+	+	+	+
Prolina-nitroanilida	+	V	-	-	-
p-n-p-bifosfato	+	V	+	+	+
p-n-p-xilósido	-	+	+	+	+
p-n-p- $\alpha$ -arabinósido	-	(+)	+	+	+
p-n-p-fosforilcolina	-	-	-	-	-
p-n-p- $\beta$ -glucorónido	-	-	-	-	-
p-n-p-N-acetil-glucosaminida	-	-	+	+	+
$\gamma$ -L-glutamyl-p-nitroanilida	+	+	+	+	+
Esculina	-	+	+	+	+
p-nitro-DL-fenilalanina	-	-	-	-	-
Urea	-	V	+	+	+
Glicina	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+
Malonato	-	+	+	+	+
Tetrazolio	+	+	+	+	+
Arginina	+	V	+	+	+
Lisina	+	+	+	+	+

+ Reacción positiva, - Reacción negativa, V Reacción variable, (+) generalmente positiva pero a veces negativo.

valvular mitral y aórtica aguda, osteomielitis y abscesos pulmonares embólicos. Algunas cepas de *S. aureus* pueden envenenar los alimentos mediante la producción de enterotoxinas en ciertos productos que han sido almacenados sin refrigeración (Koneman *et al.*, 1992; Joklik y Phil, 1994).

Los cocos grampositivos aerobios y anaerobios facultativos pueden ser recuperados de casi todas las muestras que contengan una población mixta de bacterias. Éstos crecen bastante bien en medios de aislamiento no selectivos convencionales, especialmente agar sangre de carnero. Sin embargo, el medio por excelencia para recuperar estafilococos patógenos de poblaciones mixtas es el agar manitol-salado. Este medio incorpora en su formulación concentraciones altas de cloruro de sodio (7.5%), compuesto inhibitorio que suprime el desarrollo de casi todas las demás bacterias.

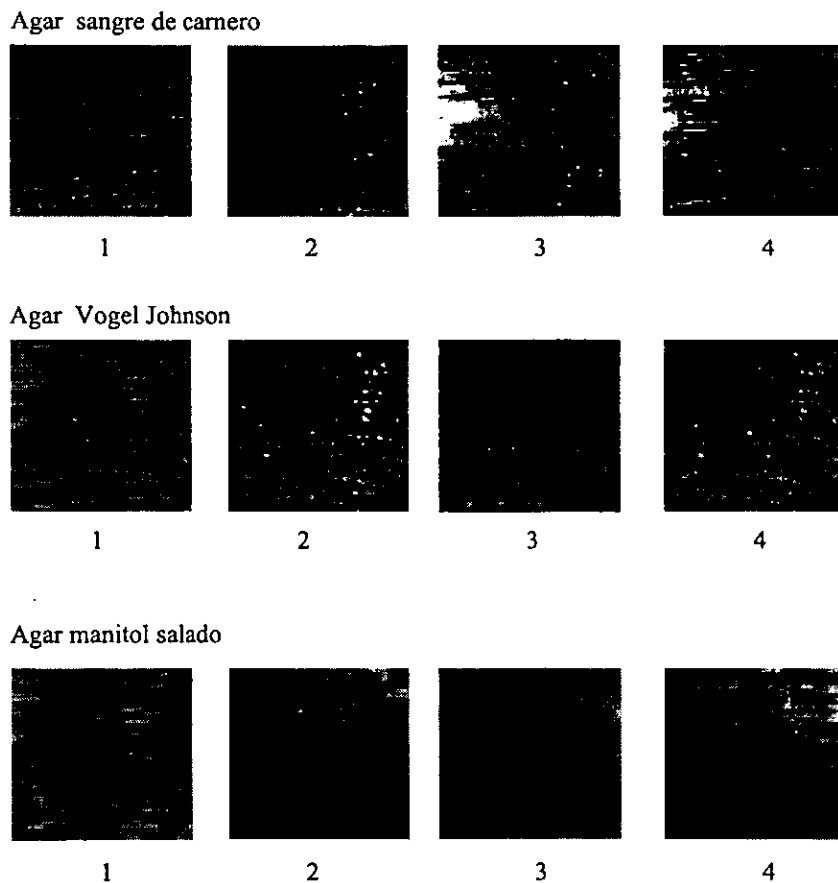
Con el objetivo de recuperar estos microorganismos se emplearon los medios selectivos agar manitol-salado y agar Vogel Johnson. Adicionalmente, se incorporó al análisis el medio gelosa sangre, con la finalidad de observar la presencia de hemolisinas.

En la Figura 12 se ilustran las superficies de las placas con un crecimiento de 24 horas. Las características morfológicas de las colonias desarrolladas en los medios de prueba son las siguientes:

- Las placas de agar sangre de carnero ilustran el desarrollo de colonias blancas y no hemolíticas.
- Las colonias desarrolladas en agar Vogel Johnson son grandes, de bordes regulares y con pigmentación rosa claro. La coloración roja del medio indica que las colonias desarrolladas no utilizan el manitol presente en el medio.

La comparación de la morfología colonial entre la cepa de referencia y las muestras de prueba, así como, la prueba de la coagulasa (negativa en todas las muestras) permitió realizar la siguiente conclusión: las tres muestras analizadas cumplen con el requisito de ausencia de *S. aureus*.





**Figura 12.** Morfología macroscópica de las colonias bacterianas desarrolladas en las superficies de agar sangre de carnero, agar Vogel Johnson y agar manitol salado: 1) Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, 2) Muestra A, 3) Muestra B y 4) Muestra C.

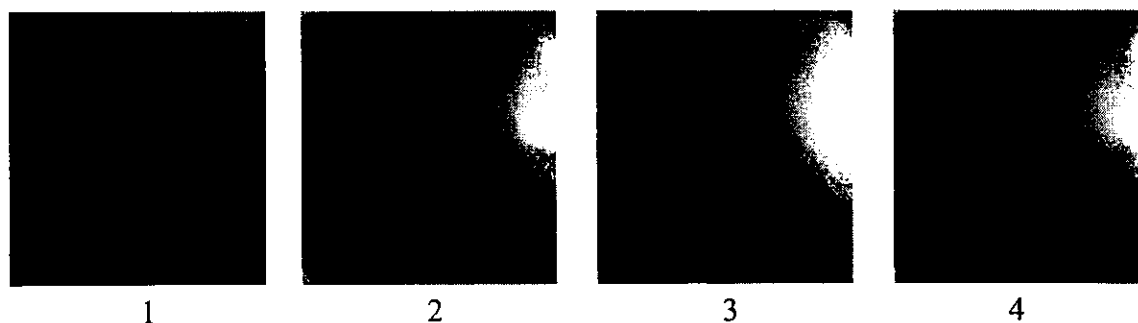
Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* ocurren por lo común en cualquier sitio donde tiende a acumularse la humedad: durante procesos invasivos tales como traqueotomías, catéteres, sondas y heridas cutáneas que exudan. La *P. aeruginosa* también causa infecciones urinarias, respiratorias y oculares (Koneman *et al.*, 1992).

La especie *Pseudomonas aeruginosa* puede identificarse de manera presuntiva si se detecta pigmento azul-verde y un olor a tortillas húmedas. El medio que contiene

cetrimida, es altamente selectivo para el crecimiento de *P. aeruginosa* y también es valioso para la demostración de piocianina, pigmento característico de esta bacteria; por lo tanto, la recuperación de este microorganismo se realizó mediante el empleo de agar cetrimida.

En este caso particular, no se observó crecimiento microbiano en la superficie del medio, por lo que se concluye que las muestras analizadas se encuentran libres de *P. aeruginosa*. En la Figura 13 se muestran las superficies de agar cetrimida, que ilustran la producción de piocianina (en el caso de la cepa de referencia) y la ausencia de colonias en las muestras de prueba.

#### Agar cetrimida



**Figura 13.** Morfología macroscópica de las colonias bacterianas desarrolladas en la superficie de agar cetrimida: 1) Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, 2) Muestra A, 3) Muestra B y 4) Muestra C.

En síntesis, la carga microbiana total en las muestras comerciales B y C fue de  $7.1 \times 10^{10}$  y  $4.6 \times 10^{11}$  respectivamente y de  $5.8 \times 10^3$  en la muestra A. Así mismo, las tres muestras de material vegetal se encuentran libres de contaminación por hongos, levaduras y microorganismos patógenos.

#### 4.3.6 DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS

En los últimos años, la contaminación ambiental por plomo, cadmio y mercurio ha sido objeto de numerosos informes, debido a la toxicidad que causa en los seres humanos. En general, los metales pesados, ejercen su efecto tóxico al combinarse con uno o más grupos reactivos esenciales para las funciones fisiológicas normales. Los antagonistas de metales pesados (agentes quelantes) están diseñados específicamente para competir con los metales pesados por estos grupos, de tal forma que previenen o revierten el efecto tóxico causado. Los metales pesados, y en particular los de la serie de transición, pueden reaccionar en el organismo con ligandos que contienen oxígeno (-OH, -COO<sup>-</sup>, -OPO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, C=O), sulfuro (-SH, -S-S-) y nitrógeno (-NH<sub>2</sub>, NH) formando, un complejo metálico mediante la formación de un enlace coordinado (Klaassen, 1996).

El ZEBS (Zentrale Erfassungsund Bewertungsstelle für Umweltchemikalien), organización alemana que tiene como función la valoración y seguimiento de la presencia de productos químicos en el ambiente establece los siguientes límites para productos alimenticios:

Plomo	Máximo 10 ppm (frutos. cereales o raíces) Máximo 10 ppm (hortalizas constituidas por hojas)
Cadmio	Máximo 0.10 ppm (frutos. cereales y hortalizas constituidas por hojas) Máximo 0.05 ppm (hortalizas constituidas por raíces)
Mercurio	Máximo 0.03 ppm (cereales)

El análisis de metales pesados en las tres muestras de material vegetal se realizó mediante espectroscopía de absorción atómica, después de tratar las muestras con una mezcla de digestión compuesta por ácido nítrico y ácido perclórico (ver inciso 3.5.7). Los resultados de estas determinaciones indicaron que las muestras comerciales B y C contienen 2.50 y 2.56 ppm de plomo, respectivamente. Asimismo la muestra A contiene 1.82 ppm de plomo. Por otra parte, las tres muestras de material vegetal se encuentran libres de contaminación por cadmio y mercurio.

#### 4.4 ENSAYOS QUÍMICOS CONDUCENTES A LA CUANTIFICACIÓN DE PRINCIPIO(S) ACTIVO(S)

Durante los últimos 30 años se han establecido métodos precisos para la valoración de drogas oficinales de origen botánico y de sus preparaciones, apareciendo en las monografías los procedimientos adecuados. Pero en los remedios vegetales que se expenden sin regulación, generalmente faltan métodos de ensayo para extractos y cuando los componentes activos son desconocidos, no hay forma de establecer la potencia terapéutica, como no sea mediante el empleo de ensayos biológicos, cuando esto es factible. Desde el punto de vista de los partidarios de la terapéutica vegetal, el efecto del extracto completo de la planta es el más deseable, por lo que tal vez sea el ensayo biológico, el único que refleja la actividad verdadera de la droga en forma más clara. Si se conocen los componentes bioactivos, la calidad puede ser valorada mediante determinaciones químicas de sus contenidos (Trease y Evans, 1989).

Como se indicó anteriormente, el estudio biológico conducente a determinar la actividad antiulcérica de extractos, fracciones y productos derivados de *H. excelsa*, permitió establecer que una fracción de naturaleza fenólica con un alto contenido de (-)-epicatequina (14) y la (-)-epicatequina (14) aislada en forma pura son los responsables en gran medida de las propiedades antiulcéricas atribuidas a la especie. El  $\beta$ -sitosterol (12) y el  $\beta$ -D-glucositolsterol (13), presentes en la especie también demostraron actividad antiulcérica, sin embargo, la mayor potencia la demostraron la fracción fenólica y la (-)-epicatequina (14). Con base en estas consideraciones, y con la finalidad de establecer un método para la valoración de los principios activos presentes en el extracto crudo de *H. excelsa*, se diseñó un procedimiento espectrofotométrico conducente a la cuantificación del contenido total de fenoles y de catequina. El procedimiento desarrollado se basa en el método de Price y Butler (Price y Butler, 1977; Mole y Waterman, 1987), y tiene la ventaja de ser rápido, sensible y económico.

El método tiene como fundamento una reacción de óxido-reducción, en la cual tiene lugar de manera simultánea la oxidación de los iones fenolato y la reducción de los iones férricos. Éstos últimos son detectados por la formación del complejo azul de Prusia en presencia de ferrocianuro de potasio (Price y Butler, 1977; Mole y Waterman, 1987).

De manera general, para la valoración cuantitativa de una sustancia (o grupo de sustancias) mediante un método espectrofotométrico es necesario, en primer lugar, determinar la densidad óptica de una serie de soluciones del compuesto tipo (empleando luz de longitud de onda conveniente; por lo general aquella a la que el compuesto dé un máximo de absorción). Los resultados derivados de esta determinación permiten la construcción de una curva estándar, que será utilizada para determinar la concentración de la muestra objeto de análisis.

Por otro lado, una parte integral en el desarrollo de cualquier método analítico y en particular el conducente a cuantificar ingredientes activos es la validación de éste. La validación de un método analítico puede definirse como el proceso mediante el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método son adecuadas para la aplicación que se pretende (Martín-Smith y Rudd, 1988; Hokanson, 1994; Johnson y Van Buskirk, 1996).

Las características o parámetros de calidad que integran un método analítico validado han recibido una atención considerable por parte de las agencias reguladoras. De tal manera, que en 1997, la agencia oficial Food and Drug Administration (FDA) publicó una guía para la validación de métodos analíticos bajo el título de "*Validation of Analytical Procedures: Methodology*" (ICH, Food and Drug Administration, 1997). En general, el documento presenta una amplia discusión con relación a las características o parámetros de calidad que deben considerarse durante la validación de procedimientos analíticos.

Las características a valorar en un método, dependen de la clasificación del mismo. En el Cuadro 14 se indican las características que deben evaluarse en cada caso (Martín-Smith y Rudd, 1988; Hokanson, 1994; Johnson y Van Buskirk, 1996).

**Cuadro 14.** Características de validación para métodos analíticos.

Característica del método	Tipo de método analítico			
	Pruebas de identificación	Cuantificación del contenido de impurezas	Prueba límite para impurezas	Cuantificación de ingredientes activos*
Linealidad	No	Sí	No	Sí
Precisión-Sistema	No	Sí	No	Sí
Precisión-Método	No	Sí	No	Sí
Precisión-R&R*	No	Sí	No	Sí
Exactitud	No	Sí	No	Sí
Especificidad	Sí	Sí	Sí	Sí
Límite de detección	No	No	Sí	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	No
Rango	No	Sí	No	Sí

R&R Repetibilidad-Reproducibilidad

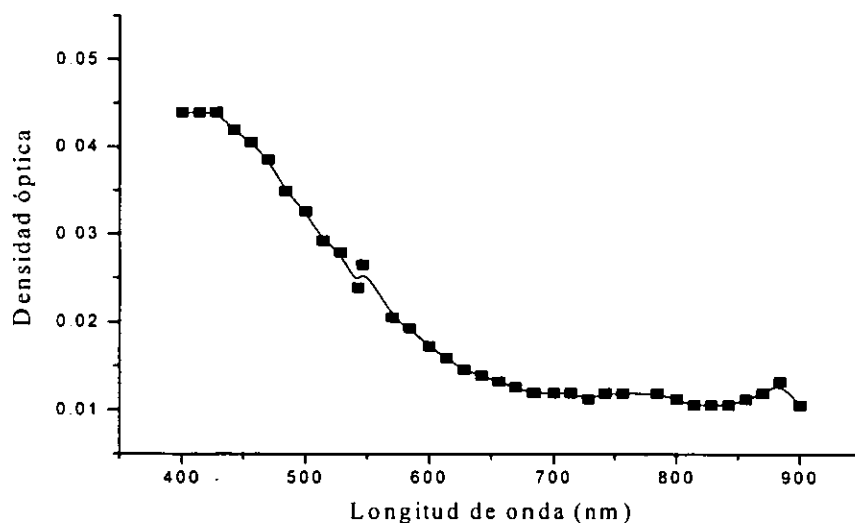
Dentro de este panorama, las características de calidad que se evaluaron para validar el método analítico propuesto comprenden: Especificidad, Linealidad, Precisión y Exactitud. A continuación, se resumen los resultados obtenidos para cada característica de calidad evaluada.

#### 4.4.1 MÉTODO PARA CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

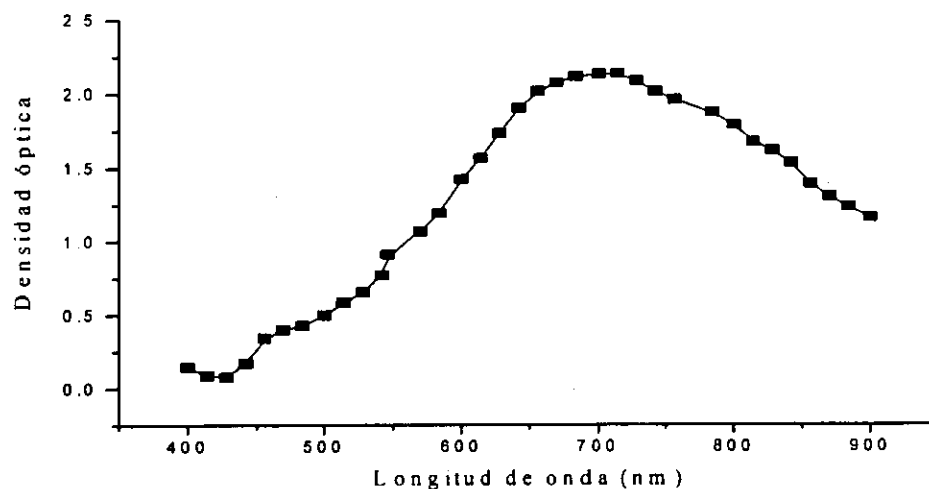
##### 4.4.1.1 Especificidad/Selectividad

La USP XXIV define la selectividad de un método analítico como su capacidad para medir con exactitud un analito en presencia de interferencias, como excipientes, enantiómeros y productos de degradación, entre otras.

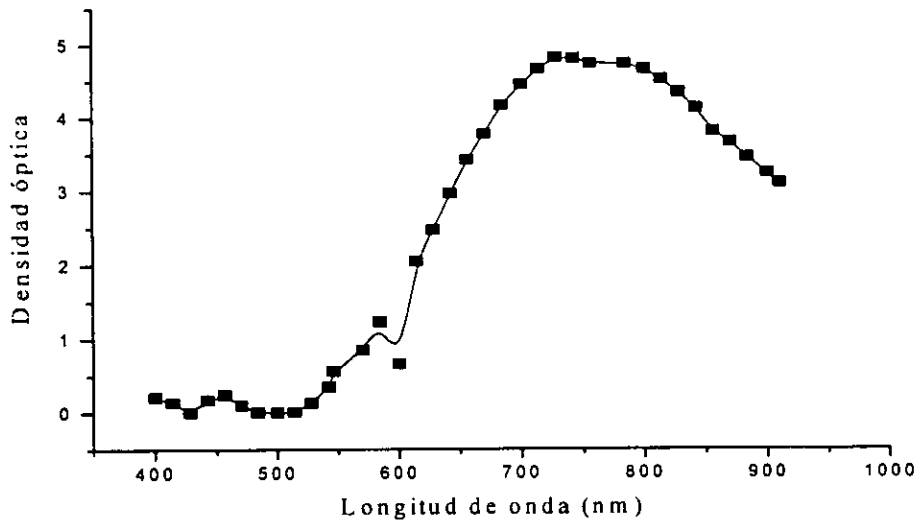
La selectividad del método propuesto (cuantificación de fenoles totales y catequina) se demostró, mediante la obtención de los espectros de absorción al UV-Visible del extracto metanólico total de la especie, de la matriz de trabajo o blanco (ver inciso 3.5.9.1) y de la matriz de trabajo enriquecida con el (los) compuesto (s) de interés. Los resultados de estas determinaciones se ilustran en las Figuras 14-17.



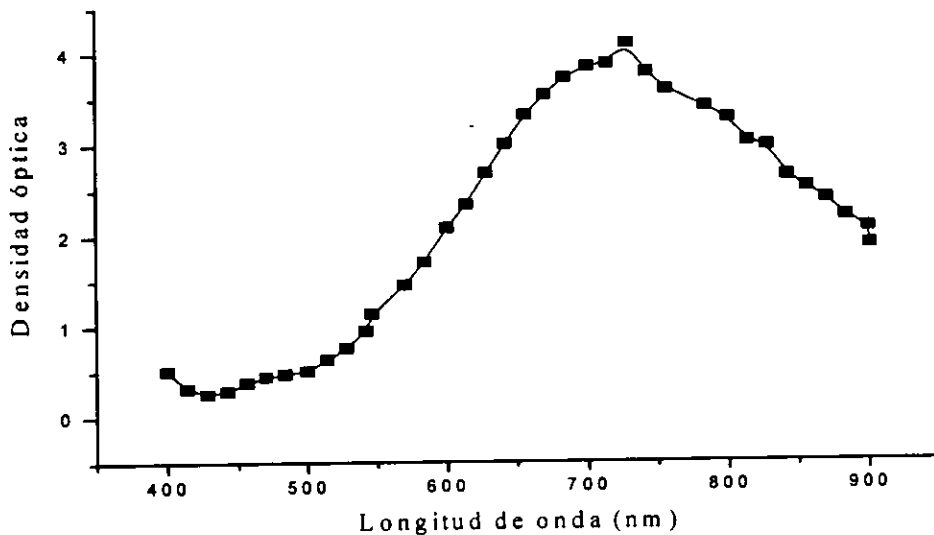
**Figura 14.** Espectro de absorción al UV-Visible de la matriz de trabajo (blanco). Condiciones de análisis: Espectrofotómetro (Beckman Du-600); Longitud de onda  $\lambda=$  400-900 nm; Disolvente, metanol-agua (6:44); Método, Price y Butler; Tiempo de adquisición de la corrida, 30 segundos.



**Figura 15.** Espectro de absorción al UV-Visible del extracto metanólico de la especie *H. excelsa* HBK. Condiciones de análisis: Espectrofotómetro (Beckman Du-600); Longitud de onda  $\lambda=$  400-900 nm; Disolvente, metanol-agua (6:44); Método, Price y Butler; Tiempo de adquisición de la corrida, 30 segundos.



**Figura 16.** Espectro de absorción al UV-Visible de la matriz de trabajo enriquecida con 50 µg de ácido gálico. Condiciones de análisis: Espectrofotómetro (Beckman Du-600); Longitud de onda  $\lambda = 400-900$  nm; Disolvente, metanol-agua (6:44); Método, Price y Butler; Tiempo de adquisición de la corrida, 30 segundos.



**Figura 17.** Espectro de absorción al UV-Visible de la matriz de trabajo enriquecida con 50 µg de catequina. Condiciones de análisis: Espectrofotómetro (Beckman Du-600); Longitud de onda  $\lambda = 400-900$  nm; Disolvente, metanol-agua (6:44); Método, Price y Butler; Tiempo de adquisición de la corrida, 30 segundos.



Como se puede observar en las Figuras 14-17 la matriz de trabajo no produce respuesta significativa en el intervalo de longitud de onda analizado (400-900 nm). Por otro lado, esta misma matriz adicionada con 50 µg de ácido gálico y catequina, produjo un incremento en la respuesta, comparable con la respuesta producida por 1 mg del extracto metanólico de la especie. Estos resultados a su vez indican que la respuesta se debe a la presencia de compuestos de naturaleza fenólica.

#### 4.4.1.2 Linearidad

##### a) Linearidad del sistema

La linearidad de un método analítico es su capacidad de obtener resultados que sean directamente proporcionales a las concentraciones de analitos en las muestras, dentro de un determinado rango. La linearidad del sistema se determinó, construyendo una curva de calibración con diferentes niveles de concentración, que cubren el 50-150% de la concentración encontrada como 100%, mediante la realización de ensayos preliminares a las muestras de material vegetal objeto de estudio. Los resultados de estos experimentos se resumen en el Cuadro 16 y en la Figura 18.

El ajuste de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple (Cuadro 15). Para el cálculo de los coeficientes de regresión se utilizó el programa de análisis estadístico STATISTICA for Windows (Release 4.2, StatSoft, Inc. 1993). Los coeficientes de regresión calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar la siguiente ecuación:

$$\text{Densidad Óptica} = -0.09852 + 0.366865 (\text{Concentración})$$

**Cuadro 15.** Resumen de la regresión lineal simple.

Resumen de la regresión				
R= 0.99695594; R <sup>2</sup> = 0.99392114 y R <sup>2</sup> ajustada= 0.99386963				
F calculada (1,118)=19294; p<0.0000; Error Std estimado: 0.01842				
N=120	B	Err. St. de B	t(118)	p-level
Intercepto	-0.009852	0.003262	-3.0206	0.003093
Pendiente	0.366865	0.002687	136.5286	0.000000

Intervalo de confianza al 95% para el intercepto (b): -0.016312<b<-0.003392

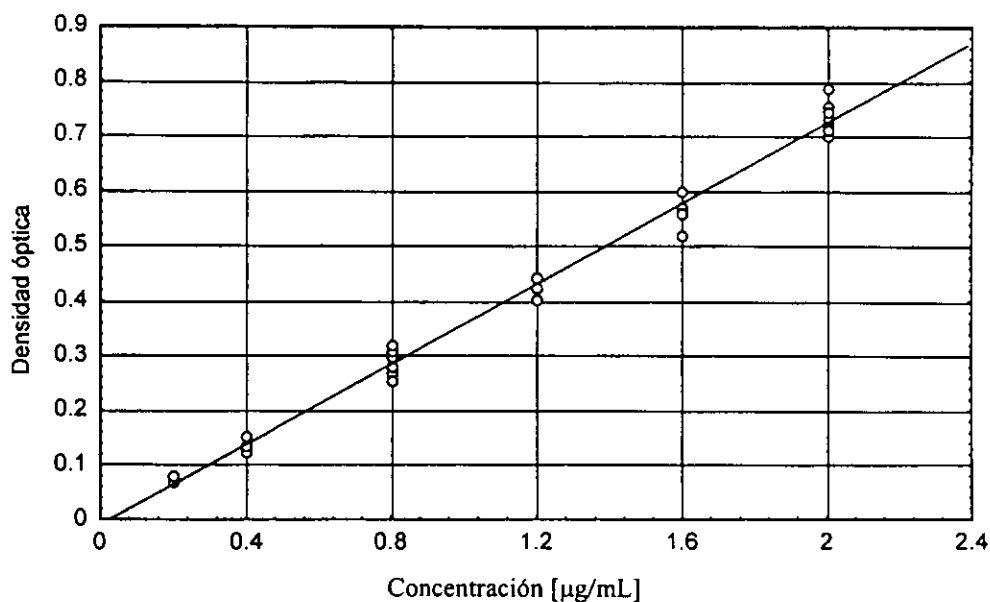
Intervalo de confianza al 95% para la pendiente (m): 0.361544<m<0.372186

**Cuadro 16.** Resultados experimentales para evaluar la linealidad del sistema

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
Réplica 1	0.0703	0.1251	0.2693	0.4230	0.5713	0.7017
Réplica 2	0.0792	0.1352	0.2631	0.4269	0.5596	0.7022
Réplica 3	0.0776	0.1297	0.2759	0.4234	0.5179	0.7009
Réplica 4	0.0635	0.1303	0.2551	0.4162	0.5778	0.7214
Réplica 5	0.0614	0.1208	0.2727	0.4038	0.5759	0.7132
Réplica 6	0.0609	0.1252	0.2581	0.3968	0.5370	0.7027
Réplica 7	0.0720	0.1526	0.2745	0.4009	0.5639	0.7881
Réplica 8	0.0636	0.1161	0.2521	0.4004	0.5101	0.7294
Réplica 9	0.0674	0.1293	0.2964	0.4236	0.6001	0.7548
Réplica 10	0.0768	0.1347	0.2915	0.4426	0.5715	0.7346
Réplica 11	0.0690	0.1485	0.3074	0.4452	0.5911	0.7418
Réplica 12	0.0651	0.1337	0.2802	0.4168	0.5771	0.7475
Réplica 13	0.0609	0.1542	0.2940	0.4516	0.6008	0.7354
Réplica 14	0.0614	0.1405	0.2857	0.4158	0.5501	0.7210
Réplica 15	0.0699	0.1483	0.3177	0.4298	0.6000	0.7391
Réplica 16	0.0756	0.1517	0.2998	0.4079	0.5428	0.7037
Réplica 17	0.0669	0.1354	0.2984	0.4225	0.6031	0.7398
Réplica 18	0.0611	0.1400	0.2734	0.4406	0.6030	0.7432
Réplica 19	0.0624	0.1447	0.2762	0.4441	0.6102	0.7476
Réplica 20	0.0719	0.1499	0.3062	0.4824	0.6500	0.7126
Media	0.0678	0.1373	0.2809	0.4424	0.5757	0.7241
Desviación Estándar	$5.9579\text{E}^{-3}$	$1.0999\text{E}^{-2}$	$2.0705\text{E}^{-2}$	$2.2028\text{E}^{-2}$	$3.2853\text{E}^{-2}$	$4.4596\text{E}^{-2}$

Los resultados se encuentran expresados en términos de densidad óptica.

Para evaluar si la ecuación de regresión describe adecuadamente la relación entre las dos variables y si puede utilizarse convenientemente con fines de predicción y estimación, se realizó, en primer lugar un análisis de variancia, con la finalidad de probar la hipótesis nula ( $H_0$ ), es decir, de que el modelo propuesto no describe la relación lineal entre las variables, contra la hipótesis alterna ( $H_a$ ), que el modelo propuesto describe dicha relación. Los cálculos realizados se resumen en el Cuadro 17.



**Figura 18.** Gráfica de linealidad en la que se ilustra la relación directamente proporcional entre las variables (Concentración vs Densidad óptica).

**Cuadro 17.** Análisis de Variancia para la regresión lineal simple.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	Nivel de probabilidad
Modelo	6.550041	1	6.550041	18640.06	$1 E^{-2}$
Residuo	0.041465	118	0.000351	-	-
Total	6.591506	-	-	-	-

Como se desprende de los resultados indicados en el Cuadro 17, el estadístico F calculado (18640.06) supera su valor crítico [ $F_{0.05}(1,118) = 3.92$ ], por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) y se concluye que la variación en la respuesta, se encuentra explicada por el modelo propuesto, es decir, el modelo estadístico es adecuado.

Posteriormente, se realizaron las pruebas de hipótesis relativas a los coeficientes de regresión. Estas pruebas de hipótesis demostraron que la pendiente de la recta de regresión es diferente de cero y la ordenada al origen tiene un valor de  $-0.009852$ .

Finalmente, el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) calculado es igual a 0.9969, lo cual indica que aproximadamente el 99% de la variación total de la variable Y (D. O.) se encuentra explicada por una relación lineal con los valores de la variable aleatoria X (Concentración). Con base en las evidencias presentadas anteriormente, se establece que el método analítico propuesto es lineal en el intervalo de concentraciones establecido.

### b) Linearidad del método

La linealidad del método se determinó preparando una serie de muestras que contenían cinco diferentes concentraciones de ácido gálico en la matriz de trabajo. Los resultados de estos experimentos se resumen en el Cuadro 18 y en la Figura 19.

**Cuadro 18.** Resultados experimentales para evaluar la linealidad del método.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.40	0.80	1.20	1.60	2.00
Réplica 1	0.3928	0.8051	1.1816	1.5884	2.0148
Réplica 2	0.4103	0.7890	1.1920	1.5996	1.9930
Réplica 3	0.3871	0.7983	1.1980	1.5879	2.0312
Réplica 4	0.4078	0.8111	1.1781	1.5966	2.0026
Réplica 5	0.3953	0.8155	1.2143	1.5756	1.9868
Réplica 6	0.3953	0.8043	1.2203	1.613	1.9707
Media	0.3981	0.8039	1.1974	1.5935	1.9998
Desviación Estándar	$9.0299\text{E}^{-3}$	$1.6875\text{E}^{-2}$	$1.7098\text{E}^{-2}$	$1.2687\text{E}^{-2}$	$2.1358\text{E}^{-3}$

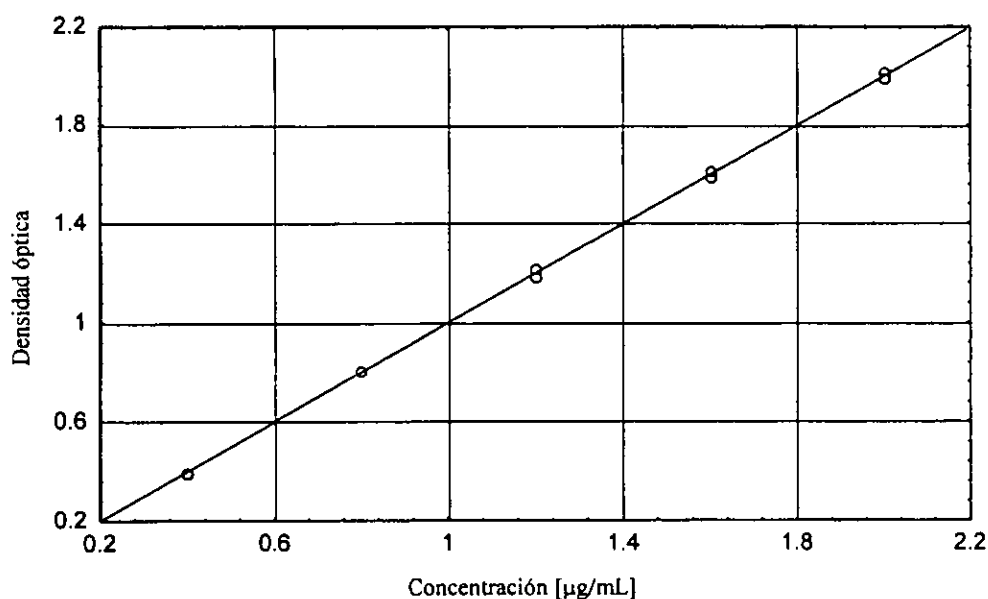
Los resultados se encuentran expresados en términos de cantidad recuperada.

De nueva cuenta, el ajuste de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple (Cuadro 19). Los coeficientes de regresión calculados mediante dicho análisis permitió estimar la siguiente ecuación:

$$\text{Densidad Óptica} = 0.366865 (\text{Concentración})$$

**Cuadro 19.** Resumen de la regresión lineal simple.

Resumen de la regresión				
R= 0.99970170; R <sup>2</sup> = 0.99940348 y R <sup>2</sup> ajustada= 0.99938218				
F calculada (1,28)=11522; p<0.0000; Error Std estimado: 0.01428				
N=30	B	Err. St. de B	t(28)	p-level
Intercepto	0.000607	0.006115	0.0992	0.921674
Pendiente	0.998283	0.004609	216.5898	0.000000
Intervalo de confianza al 95% para el intercepto (b): -0.011919<b<0.013133				
Intervalo de confianza al 95% para la pendiente (m): 0.988842<m<1.007724				

**Figura 19.** Relación lineal entre la variable X (Concentración) y la variable Y (Densidad óptica).

#### 4.4.1.3 Exactitud

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Este parámetro se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia de interés. Los resultados de este parámetro de calidad del método, se resumen en el Cuadro 20. De estas evaluaciones se infiere que el método analítico es exacto (Recobro entre 98-102% y DER  $\leq$  2.00).

**Cuadro 20.** Resultados experimentales para evaluar la exactitud del método.

Cantidad adicionada	Cantidad recuperada	% Recobro	Nivel de concentración
0.80 µg/mL	0.8051	100.64	66.66%
	0.7890	98.63	
	0.7983	99.78	
	0.8111	101.39	
	0.8155	101.93	
	0.8043	100.53	
	Media= 0.8039 S= 9.3954 E <sup>-3</sup> DER= 1.16		
1.20 µg/mL	1.1816	98.47	100.00%
	1.1920	99.53	
	1.1980	99.83	
	1.1781	98.17	
	1.2143	101.20	
	1.2203	101.70	
	Media= 1.1974 S= 1.7098 E <sup>-2</sup> DER = 1.43		
1.60 µg/mL	1.5884	99.28	133.33%
	1.5996	99.97	
	1.5879	99.24	
	1.5966	99.79	
	1.5756	98.48	
	1.6130	100.81	
	Media= 1.5935 S= 1.2687 E <sup>-2</sup> DER = 0.80%		

#### 4.4.1.4 Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a una misma muestra. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar (S) o Desviación Estándar relativa (DER). La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación. Para evaluar esta característica de calidad se realizaron diferentes experimentos conducentes a determinar la precisión del sistema (repetibilidad), del método e intermedia (reproducibilidad). Los resultados de estas determinaciones se resumen en los Cuadros 21, 22 y 23 respectivamente.

**Cuadro 21.** Datos experimentales para evaluar la precisión del sistema (repetibilidad).

Cantidad Adicionada	Cantidad Recuperada ( $\mu\text{g}$ )
1.2 $\mu\text{g}$	1.1934 $\mu\text{g}$
1.2 $\mu\text{g}$	1.2075 $\mu\text{g}$
1.2 $\mu\text{g}$	1.1901 $\mu\text{g}$
1.2 $\mu\text{g}$	1.1999 $\mu\text{g}$
1.2 $\mu\text{g}$	1.1912 $\mu\text{g}$
1.2 $\mu\text{g}$	1.1972 $\mu\text{g}$
Media	1.1965 $\mu\text{g}$
Desviación Estándar (S)	6.5068 E <sup>-3</sup>
Desviación Estándar relativa (DER)	0.54%

**Cuadro 22.** Datos experimentales para evaluar la precisión del método.

Cantidad Recuperada	Cantidad recuperada (%)
1.1811 $\mu\text{g}$	98.42
1.1934 $\mu\text{g}$	99.45
1.1780 $\mu\text{g}$	98.17
1.2045 $\mu\text{g}$	100.38
1.2258 $\mu\text{g}$	102.15
1.2228 $\mu\text{g}$	101.90
Media	100.08
Desviación Estándar (S)	1.7022
Desviación Estándar relativa (DER)	1.70%

**Cuadro 23.** Datos experimentales para evaluar la precisión intermedia (reproducibilidad).

Nivel de concentración (100%)	Analista 1	Analista 2
Día 1	102.29	98.17
	101.85	98.67
	99.67	100.29
Día 2	98.65	98.40
	98.67	100.31
	100.54	101.56

Los resultados se encuentran expresados como porcentaje de la cantidad recuperada.

De acuerdo con los resultados indicados en los Cuadros 21 y 22 el método analítico es preciso ( $DER \geq 2.0\%$ ). Por otro parte, con los resultados indicados en el Cuadro 23 se realizó un análisis de variancia (Cuadro 24). Como se desprende de estos resultados obtenidos en el Cuadro 24, los valores del estadístico F (0.4028 y 2.1842) son inferiores a sus respectivos valores críticos (7.57 y 6.6), por lo tanto, se concluye, que el método analítico es reproducible por los analistas en diferentes días.

**Cuadro 24.** Resumen del Análisis de Variancia para los datos indicados en el Cuadro 23.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	F tablas
Analista	1	1.519408	1.519408	0.4028	7.57
Día	2	7.543683	3.771841	2.1842	6.06
Error	8	13.814939	1.726867	-----	

#### 4.4.2 METODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINA

Con la finalidad de poder expresar en términos de catequina el contenido de fenoles totales presente en las muestras de material vegetal objeto de estudio se construyó una curva de calibración utilizando como estándar catequina. De nueva cuenta, la validez de este método se evaluó utilizando la misma estrategia descrita en los párrafos anteriores. Los resultados obtenidos para cada característica de calidad evaluada se incluyen en el Apéndice III. Asimismo, el análisis estadístico derivado de los distintos resultados obtenidos para cada característica de calidad se enlistan en el Apéndice IV.

En síntesis, el método propuesto tanto para cuantificar el contenido de fenoles totales como el contenido de catequina es: lineal en el intervalo de concentraciones utilizado (0.2-3.0  $\mu\text{g/mL}$ ), exacto, preciso y reproducible.

Una vez demostrada la validez del método analítico, se procedió a cuantificar el contenido de fenoles totales y catequina en las tres muestras de prueba. Los resultados de estas determinaciones indicaron que la muestra A contiene 39.10  $\mu\text{g}$  de catequina y 55.30  $\mu\text{g}$  de fenoles totales por gramo de material vegetal. La muestra comercial B contiene 32.38  $\mu\text{g/g}$  de catequina y 53.12  $\mu\text{g/g}$  de fenoles totales. Finalmente, el contenido de fenoles totales y de catequina en la muestra C fue de 39.69  $\mu\text{g/g}$  y 24.17  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente.



## V. CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación contiene, además de los procedimientos de control de calidad, la información científica relacionada con la farmacología y química de la especie *Hippocratea excelsa* HBK., planta medicinal ampliamente utilizada en la medicina tradicional por sus propiedades antiulcéricas. Dicha información constituye la base para la elaboración de la monografía correspondiente.

De manera general, el tratamiento estadístico aplicado a los resultados derivados de las distintas pruebas de pureza y químicas para la cuantificación del principio activo principal no reveló diferencias significativas entre las muestras de material vegetal ensayadas. Sin embargo, en las muestras comerciales B y C no se detectó la presencia de alcaloides.

Las presente investigación constituye un protocolo metodológico, para evaluar la calidad de la especie *H. excelsa* HBK. como principio activo de preparados fitofarmacéuticos; medicamentos, ampliamente utilizados por la población mexicana para la atención primaria de la salud.

## **VI. PERSPECTIVAS GENERALES DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN**

Determinar, en las tres muestras de material vegetal objeto de estudio, los residuos de plaguicidas tanto organofosforados como organoclorados.

Realizar el análisis microscópico de la droga cruda pulverizada. Afortunadamente, se dará inicio a estas actividades, que completarán la monografía.

Realizar el análisis de un mayor número de muestras con la finalidad de establecer los correspondientes límites farmacopeicos para cada determinación.

Desarrollar el método por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar tanto el contenido de principios activos como de compuestos marcadores.

Aplicar la metodología desarrollada en la presente investigación para el análisis de cápsulas y preparados medicinales elaborados con cancerina.

Realizar estudios de toxicidad (aguda y crónica) y clínicos de la droga cruda o en su caso de la preparación propuesta.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

Argueta, A.V., Cano, L. M. y Rodarte, M. E. (1981). Cancerina. En Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, Vol. 2. Instituto Nacional Indigenista, México.

Artiges, A. (1991). What are the legal requirements for the use of phytopharmaceutical drugs in France. *Journal of Ethnopharmacology*, **32**, 231-234.

Bauer, R. (1999). Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drugs standard be achieved?. *Drug Information Journal*, **32**, 101-110.

Bonati, A. (1991). How and why should we standardize phytopharmaceutical drugs for clinical validation?. *Journal of Ethnopharmacology*, **32**, 195-197.

Brock, T. D., Brock, K. M. and Ward, D. M. (1987). Bacterial Diseases. En Basic Microbiology with applications, Third edition. Editorial Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, pp 219-313.

Bye, R., Linares, E. and Estrada, E. (1995). In phytochemistry of medicinal plants. Recent advances in phytochemistry, 29. Arnason, J. T., Romeo, J. T. and Mata. R. Editores Plenum Press, Nueva York, 65-82.

Calzada, F. and Mata, R. (1995). Hippocrateine III. A sesquiterpene alkaloid from *Hippocratea excelsa*. *Phytochemistry*, **40**, 583-585.

Calzada, F., Mata, R., López, R., Linares, E., Bye, R., Barreto, V. M. and Del Río, F. (1991). Friedelanes and Triterpenoid Quinone Methides from *Hippocratea excelsa*. *Planta Medica*, **57**, 194-195.

Collins, C.H. y Lyne, P. M. (1989). Recuento de microorganismos. En Métodos microbiológicos. Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp 149-164.

Elisabetsky, E. (1991). Sociopolitical, economic and ethical issues in medicinal plant research. *Journal of Ethnopharmacology*, **32**, 235-239.

Escamilla, C., Ugalde, M. y Navarrete, A. (1995). Control de calidad de los medicamentos herbolarios. En Lecturas para el Diplomado Internacional "Plantas Medicinales de México", Segunda edición. Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, 547-559.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Sexta edición (1994). Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, pp 127-129, 147-150, 189-196.

Hersh, P. (1996). En Destino común: los recolectores y su flora medicinal. Instituto Nacional de Antropología e Historia, México.

Hokanson, G. C. (1994). A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part. 1: The initial method validation process. *Pharmaceutical Technology*, 118-130.

ICH, Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. International Conference on Harmonisation; Guideline on the Validation of Analytical Procedures: Methodology, Availability, Notice. Federal Register March 1996, Vol. 60 No. 46, pp 9315-9319.

Inoue, K. H. and Hagerman, A. E. (1988). Determination of gallotannin with rhodanine. *Analytical Biochemistry*, **169**, 363-369.

Johnson, J. D. and Van Buskirk, G. E. (1996). Analytical Method Validation. *Journal of Validation Technology*, **2**, 88-105.

Joklik, W. K. and Phil, D. (1994). Enterobacteriaceae: Características generales, Enterobacteriaceae oportunistas, Enterobacteriaceae: *Salmonella* y *Shigella*, patógenos intestinales, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*. En Zinsser Microbiología, Veinteava edición. Editorial Médica Panamericana, pp 554-575 y 736-771.

Keller, K. (1991). Legal requirements for the use of phytopharmaceutical drugs in the Federal Republic of Germany. *Journal of Ethnopharmacology*, **32**, 225-229.

Klaassen, C. D. (1996). Heavy metals and heavy-metals antagonists. En Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics, Ninth edition. Hardman, J. G. and Limbird, L. E., Editores McGraw-Hill, New York, pp 1649-1669.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Janda, W. M., Sommers, H. M. and Winn, W. C. (1992). Enterobacteriaceae. En Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas color, Tercera edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 305-307 y 412-452.

Lozoya, X. (1993). Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI. En La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Edición conmemorativa, Secretaría de Salud, México, 255-270.

MacFaddin, J. F. (1990). Pruebas Bioquímicas individuales. En Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, Cuarta edición. Editorial Médica Panamericana, pp 27-60 y 111-190.

Martin-Smith, M. and Rudd, D. R. (1988). Validation of Analytical Methods. *Analytical Proceedings*, **25**, 154-155.

Mata, R., Calzada, F. and Toscano, R. (1990). Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine XV. Sesquiterpene evoninoate alkaloids from *Hippocratea excelsa*. *Journal of Natural Products*, **53**, 1212-1219.

Mole, S. and Waterman, P. G. (1987). A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. *Oecologia*, **72**, 137-147.

Palacios, J., Mata, R. and López, R. (1989). *Hippocratea excelsa* (Hippocrateaceae) a new source of trans polyisoprene. *Economic Botany*, **43**, 508-509.

Pérez, R. M., Pérez, S., Zavala, M. A. and Salazar, M. (1995). Anti-inflammatory activity of the bark of *Hippocratea excelsa*. *Journal of Ethnopharmacology*, **47**, 85-90.

Prance, G. T. (1991). What is ethnobotany today?. *Journal of Ethnopharmacology*, **32**, 209-216.

Price M. L., and Butler, L. G. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **25**, 1268-1273.

Real Farmacopea Española (1997), Primera edición. Ministerio de Sanidad y Consumo, Centro de publicaciones, pp 86-93, 123-129, 900-902.

Reuter, H. D. (1991). What are the possibilities and limits of therapy with European native drugs in modern clinical medicine?. *Journal of Ethnopharmacology*, **32**, 187-193.

Rojas, A., Hernández, L., Pereda, R. and Mata, R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude extracts and pure natural products from mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **31**, 388-389.

San Martín, R. (1977). En tratado de Farmacognosia, Primera edición, Editorial Científico-Médica, Barcelona.

Smith, A. C. (1940). The American species of Hippocrateaceae. *Brittonia*, **3**(3), 410-417.

Trejo, J. L. (1998). "Valoración Farmacológica de la actividad gastroprotectora de los constituyentes de *Hippocratea excelsa* H.B.K." Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

United States Pharmacopeia XXIV. The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, pp 1710-1712, 1814-1818 y 1884-1890.

Villa, M. G. (1994). "Anatomía vegetative de *Hippocratea excelsa* HBK. (Hippocrateaceae)." Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Waterman, P. G. and Mole, S. (1994). Extraction and chemical quantification. En *Methods in ecology. Analysis of phenolic plants metabolites*. Primera edición. Editorial Blackwell Scientific Publication, Oxford.

WHO Monographs on selected medicinal plants. Vol. 1 (1999). World Health Organization, Geneva.

WHO, Quality control methods for medicinal plant materials (1988). World Health Organization, Geneva.

Wichtl, M. (1994). *Herbal drugs and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientific basis*. Norman Grainger Bisset, Editores CRC PRESS and Meadpharm, German.

Wijesekera, R. O. B. (1991). Is there an industrial future for phytopharmaceuticals drugs?. An outline of UNIDO programmes in the sector. *Journal of Ethnopharmacology*, 32, 217-224.

**Propuesta de Monografía.**  
*Hippocratea excelsa* HBK.



**Definición**

La droga está constituida por la corteza de la raíz de la especie *Hippocratea excelsa* HBK. (Hippocrateaceae).

**Sinónimos**

*Hemiangium excelsum* HBK.

**Nombres comunes**

Los nombres comunes con los que se designa a esta especie son los siguientes: Cancerina, mata piojo (Oaxaca), fruta de rosa, aguacui, palo de piojo, piojo, barajilla, palo de reguilete, atzultó (Chiapas), chumloop, salbeets (Yucatán) y zaccuche.

**Descripción botánica de la especie**

*Hippocratea excelsa* HBK. (Hippocrateaceae) es un bejuco leñoso, delgado, de hasta 17 m de largo y posee una corteza de color café-rojizo. Presenta un tallo de 10 cm de diámetro; las hojas son

oblongoelípticas, pecioladas, redondeadas en el ápice y miden entre 6 y 12 cm de largo; las flores son blancas, de sépalos abovado dentados y se encuentran agrupadas en racimos. El fruto, de forma elíptica llega a medir hasta 6 cm de diámetro.

**Descripción de la droga**

La corteza de raíz tiene un color café rojizo o rosáceo, con abundantes manchas grisáceas. No tiene olor, el sabor es ligeramente astringente, de textura lisa a ligeramente fibrosa. Este tejido presenta la característica de contener numerosas fibras que le dan una consistencia elástica. Esta última característica se encuentra asociada al alto contenido de gutapercha en la raíz.

La corteza interna y externa de la especie suma 5 mm de grosor; no existe diferenciación anatómica entre ambas. El peridermo, se encuentra compuesto por las siguientes zonas:

- a) Felodermis, zona externa al córtex, en ella se observa una zona de células cuadradas muy regulares, ordenadas en hileras radiales de 3; en algunas se aprecian abundantes cristales solitarios o agrupados, taninos y esclereidas de tamaños variados.
- b) Felógeno, zona externa a la felodermis, en ella se encuentra una hilera de células rectangulares, orientadas hacia la zona del felema.
- c) Felema, zona que se observa exterior al felógeno, formado por capas de células cuadradas muy homogéneas, de pared delgada, sin contenidos. El grosor total de la peridermis es de 1067 micras.

El floema secundario está integrado por dos áreas organizadas a manera de triángulos complementarios, unos son los elementos axiales y los otros son los elementos radiales. Esta área mide 1710 micras de grosor total. Los elementos axiales se encuentran organizados a manera

de un triángulo visto en el corte transversal, con su base cerca del cambium y su ápice hacia el córtex. Los elementos estructurales del floema comprenden:

a) Los tubos cribosos, distribuidos en todo el floema de manera abundante, de forma isodiamétrica y miden 12 micras de diámetro. En algunos casos, se encuentran asociadas a las paredes del tubo, dos células ajenas o compañeras. Cabe destacar que, cuando dichas células acompañantes se colapsan demasiado, éstas se observan como un engrosamiento de la pared del tubo criboso. Las células compañeras, tienen la particularidad de presentar un protoplasma denso, un núcleo bien desarrollado y una fina membrana de celulosa.

b) El parénquima taninífero, distribuido irregularmente por todo el floema, se asocia en algunos casos con almidón. Las células del parénquima son alargadas tangencialmente y se encuentran intercaladas con las células radiales. Con respecto al parénquima cristalinífero, este es poco abundante y solitario, especialmente en células radiales. Las fibras son de dos tipos: unas de pared gruesa, escasas, con una longitud de 784 micras; otras de paredes extremadamente delgadas, de extremos romos, muy abundantes con 935 micras de longitud, cuyo contenido no se encuentra identificado. Los radios medulares se encuentran organizados a manera de triángulos, con su base hacia el córtex y su ápice hacia el cambium. Se encuentran formados hasta por 8 células de ancho; la forma de las células varían conforme se sitúan hacia el ápice del triángulo. Primero son alargadas radialmente y luego llegan a tener forma rectangular. Las células taniníferas se encuentran dispersas e intercaladas entre el resto de las células. Los cristales solitarios son abundantes conforme se acercan al córtex, además se encuentran diversos

grupos de esclereidas. Las esclereidas son de forma irregular u ovoide, con membranas gruesas, lignificadas y atravesadas por canales en forma de embudo.

Finalmente el córtex está constituido por varias capas de células alargadas tangencialmente, ordenadas en hileras y con algunos grupos de células colapsadas. También se observan células parenquimáticas y taniníferas, así como abundantes cristales de almidón y paquetes de esclereidas. Esta área mide 1063 micras.

### Distribución geográfica

La especie *H. excelsa* HBK. se distribuye principalmente en la América tropical, desde el sur de México hasta Colombia, Venezuela, Brasil y Paraguay. En México se localiza en los estados de Durango, Estado de México, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Yucatán.

### Ensayos generales de identidad

Los ensayos generales de identidad comprenden los siguientes análisis: Macroscópico (véase descripción de la droga), microscópico (véase características microscópicas), organoléptico y por cromatografía en capa fina (CCF) para determinar la presencia de los siguientes compuestos: friedelina, canofilol, canofilal, ácido canofílico, tingenona, hipocrateína I, ácido oleanólico y epicatequina.

### Ensayo de identidad mediante CCF.

Extracto a investigar: Extraer 5 g del material vegetal finamente dividido, con una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (1:1) por 24 horas. Al término del proceso de extracción filtrar la solución resultante y concentrarla a presión reducida. Reconstituir el extracto resultante en 15 mL de la mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (1:1).

Estándares de referencia: Disolver por separado 1 mg de los siguientes



compuestos: friedelina, canofilol, canofilal, ácido canofilico, tingenona, hipocrateína I, ácido oleanólico y epicatequina en 1 mL de metanol.

**Siembra:** Realizar la aplicación de la muestra (20 µL) con una micropipeta en forma de banda.

**Eluyente:** El proceso de elución se lleva a cabo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: acetona (85:15) o con una mezcla de AcOEt: ácido fórmico: agua (80:13:7).

**Revelado:** como agente cromógeno se utiliza una solución reactivo de vainillina (1 g de vainillina en 100 mL de etanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, mezclados en ese orden). Para desarrollar el color es necesario calentar la placa durante 2 minutos a 100°C aproximadamente. Antes de revelar con el reactivo anterior, visualizar la placa con luz UV (onda corta 254 nm y onda larga 365 nm).

**Interpretación:** En el extracto a investigar deben identificarse plenamente la presencia de todos los compuestos utilizados como estándares (Figura 1).

**Ensayos de pureza**

A) Microbiológico

El ensayo para *Salmonella* sp. y *Pseudomonas aeruginosa* en la droga debe ser negativo. Los límites aceptables por contaminación con otros microorganismos son los siguientes:

1) Preparaciones en cuyo empleo interviene agua hirviendo:

Bacterias aerobias Máximo 10<sup>7</sup>/g  
totales

Levaduras y mohos Máximo 10<sup>5</sup>/g  
*Escherichia coli* Máximo 10<sup>2</sup>/g

2) Preparaciones para uso interno:

Bacterias aerobias Máximo 10<sup>5</sup>/g  
totales

Levaduras y mohos Máximo 10<sup>4</sup>/g  
Enterobacterias Máximo 10<sup>3</sup>/g  
*Escherichia coli* Ausencia



**Figura 1.** CCF en placa de 7.5x10.5 cm. (1) Epicatequina, (A), (B) y (C): Muestras de *H. excelsa* HBK.

B) Elementos extraños

No más del 5% m/m.

C) Cenizas insolubles en ácido

No más que el 0.68%.

D) Material extraíble

En hexano, no menos del 0.25%.

En etanol, no menos del 1.93%.

En etanol diluido, no menos de 4.83%.

E) Residuos de plaguicidas

De acuerdo con requerimientos nacionales.

F) Metales pesados.

Los límites establecidos para plomo y mercurio son de 10 y 0.3 mg/Kg, respectivamente.

G) Otros ensayos de pureza

Humedad, cenizas totales e índice de hinchamiento.

## Ensayos Químicos

Contiene no menos de 40  $\mu\text{g/g}$  de catequina, cuantitativamente determinado por el método de Price y Butler.

A) Preparación de la muestra: Extraer 30 mg de la droga pulverizada con 3 mL de metanol durante 1 minuto. Filtrar la solución resultante con ayuda de un embudo y enjuagar el matraz con 3 mL adicionales de metanol; vertir la solución en el embudo y reunirla con la solución anterior. Llevar el filtrado anterior a un volumen de 50 mL con agua destilada.

B) Procedimiento: A 50 mL de la solución a analizar, adicionar 3 mL de una solución 0.1 M de cloruro de férrico (en HCl 0.1 M) y agitar durante 3 minutos. Al cabo de este tiempo, adicionar 3 mL de una solución 0.08 M de ferrocianuro de potasio y agitar para homogeneizar. Después de 10 minutos cuantificar el contenido de fenoles totales o catequina midiendo la absorbancia a 720 nm en un espectrofotómetro.

Los resultados se expresan como equivalentes de fenol o catequina a partir de una curva estándar preparada bajo las mismas condiciones del análisis con ácido gálico o catequina.

## Constituyentes químicos mayoritarios

La mayoría de los trabajos publicados a la fecha describen el aislamiento y caracterización de triterpenoides y alcaloides como los principales metabolitos secundarios presentes en la especie. También se ha descrito la presencia en grandes cantidades de un politerpenoide del tipo de la guta. Recientemente, se describió la presencia de la (-)-epicatequina en la corteza de la planta. En la Figura 2 se ilustran las estructuras de los compuestos aislados, hasta la fecha, de *H. excelsa* HBK.

## Uso tradicional

En México, la corteza de *H. excelsa* HBK., se utiliza para tratar el cáncer de la piel,

úlceras gástricas, enfermedades renales y trastornos orgánicos en la mujer. Las semillas y las hojas se utilizan para el tratamiento de los piojos y otros ácaros, de ahí, que en las zonas rurales la especie se designe con el nombre de "mata piojo". De manera adicional, se utiliza también para combatir el mal olor de los pies.

## Farmacología

El extracto hexánico preparado a partir de la corteza de las raíces y de los tallos de la especie presentó una actividad tóxica moderada en la prueba de letalidad con *Artemia salina* Leach. Por otro lado, el extracto etanólico presentó un efecto anti-inflamatorio significativo.

Con relación a los compuestos presentes en la planta, se ha demostrado que la aplicación tópica de la tingenona es efectiva en el tratamiento del carcinoma epidérmico. Para este triterpenoide se ha descrito también su citotoxicidad *in vitro* contra varios sistemas de tumores (sarcoma de Yoshida, sarcoma 180 y KB). Por su parte, el canofilal, otro de los triterpenoides aislados, presentó actividad antimicrobiana específica, aunque de moderada intensidad, contra *Pseudomonas aeruginosa*.

En un reciente estudio cuyo objetivo era determinar la actividad antiulcérica de extractos, fracciones y productos puros derivados de la especie, se comprobó que el extracto metanólico de la corteza de la raíz posee una notable actividad antiulcérica. De acuerdo con estas determinaciones, los constituyentes más activos fueron el  $\beta$ -D-glucositosterol, el  $\beta$ -sitosterol y la (-)-epicatequina. Debe hacerse notar que el crudo alcaloideo obtenido por una partición ácido-base y la mezcla de  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina (en proporción 1:1) también contribuyen a la actividad antiulcérica demostrada por el extracto total.

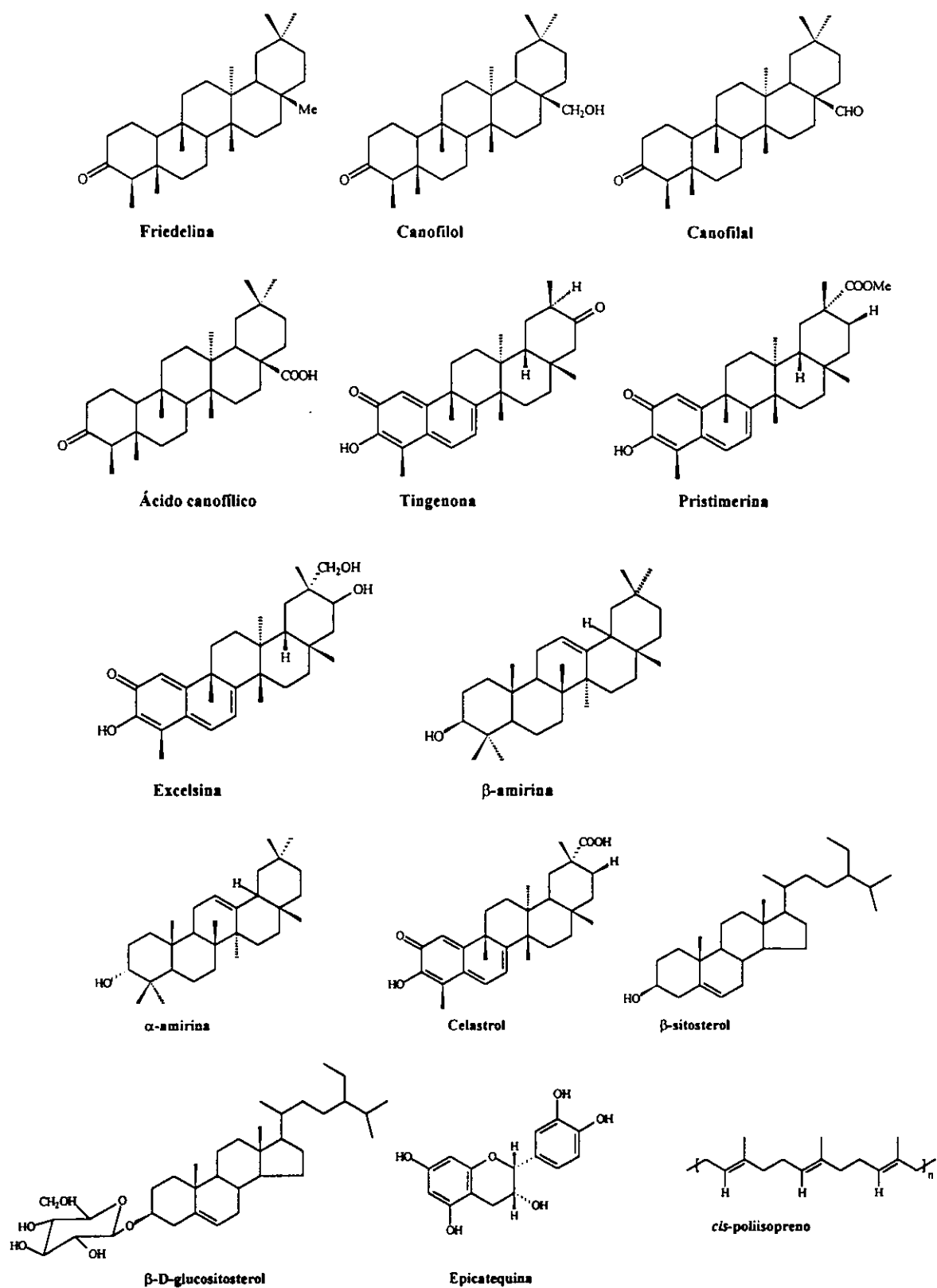


Figura 2. Metabolitos secundarios aislados de *H. excelsa* HBK.

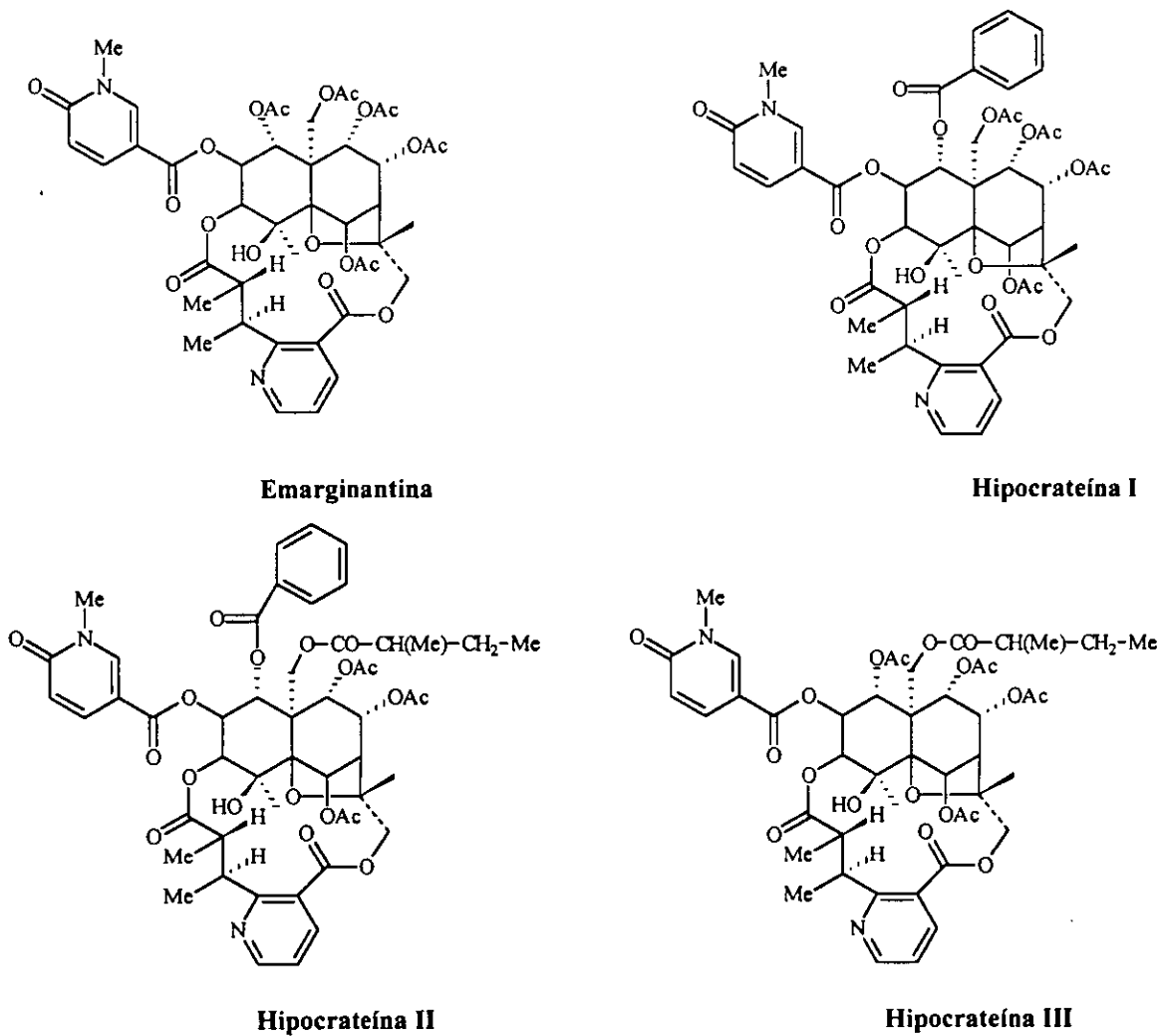


Figura 2. Metabolitos secundarios aislados de *H. excelsa* HBK.

## APÉNDICE II.

Composición de los medios de cultivo.

Disolución tampón peptona-cloruro de sodio a pH 7.2

Dihidrógeno fosfato de potasio	3.56 g
Hidrógeno fosfato de disodio dihidratado	7.23 g
Cloruro de sodio	4.30 g
Peptona de carne o de caseína	1.00 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar soya tripticaseína

Digerido pancreático de caseína	15.00 g
Digerido con papaína de harina de soya	5.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Glucosa monohidratada	15.00 g
Agar	15.00 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.3±0.2

Esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo soya tripticaseína

Digerido pancreático de caseína	17.00 g
Digerido con papaína de harina de soya	3.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Glucosa monohidratada	2.50 g
Hidrógeno fosfato de dipotasio	2.50 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.3±0.2

Esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar Sabouraud-dextrosa con antibióticos

Peptonas (de carne y de caseína)	10.00 g
Glucosa monohidratada	40.00 g
Agar	15.00 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.3±0.2

Agar Sabouraud-dextrosa con antibióticos (Continuación)

Esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos. Inmediatamente antes del uso, añadir 0.10 g de bencilpenicilina de sodio y 0.10 g de tetraciclina por litro de medio, en forma de disoluciones estériles. Alternativamente, es posible añadir 50 mg de cloranfenicol por litro de medio, antes de esterilizar.

Caldo lactosa

Extracto de buey	3.00 g
Digerido pancreático de gelatina	5.00 g
Lactosa	5.00 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	6.9±0.2

Esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos y enfriar inmediatamente.

Medio líquido de MacConkey

Digerido pancreático de gelatina	20.00 g
Lactosa	10.00 g
Bilis de buey deshidratada	5.00 g
Púrpura de bromocresol	10.00 mg
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.3±0.2

Esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar MacConkey

Digerido pancreático de gelatina	17.00 g
Peptonas (de carne y de caseína)	3.00 g
Lactosa	10.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Sales biliares	1.50 g
Agar	13.50 g
Rojo neutro	30.00 mg
Violeta cristal	1.00 mg
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.1±0.2

Calentar a ebullición durante 1 minuto con agitación constante; esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar eosina azul de metileno (EMB)

Peptona	10.00 g
Fosfato dibásico de potasio	2.00 g
Sacarosa	5.00
Lactosa	5.00 g
Agar	13.50 g
Eosina Y	0.40 g
Azul de metileno	65.0 mg
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.2±0.2

Calentar a ebullición durante 1 minuto con agitación constante; esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio líquido compuesto por tetrionato, bilis y verde brillante

Peptona	8.60 g
Bilis de buey desecada	8.00 g
Cloruro de sodio	6.40 g
Carbonato de calcio	20.00 g
Tetrionato de potasio	20.00 g
Verde brillante	70.00 mg
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.0±0.2

Para disolver los ingredientes, calentar a punto de ebullición con agitación constante. No sobrecalentar ni esterilizar.

Agar *Salmonella-Shigella* (SS)

Extracto de carne	5.00 g
Peptona	5.00 g
Lactosa	10.00 g
Sales biliares	8.50 g
Citrato de sodio	8.50 g
Tiosulfato de sodio	8.50 g
Citrato férrico	1.00 g
Rojo neutro	25.00 mg
Verde brillante	33.00 mg
Agar	12.50 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.4±0.2

Esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar sulfito de bismuto

Extracto de carne	5.00 g
Digerido pancreático de caseína	5.00 g
Digerido péptico de tejido animal	5.00 g
Dextrosa	5.00 g
Fosfato de sodio	4.00 g
Sulfato ferroso	0.30 g
Sulfito de bismuto	8.00 g
Verde brillante	25.00 mg
Agar	20.00 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.6±0.2

Para disolver los ingredientes, calentar a punto de ebullición con agitación constante. No sobrecalentar ni esterilizar.

Agar de xilosa, lisina y desoxicolato

Xilosa	3.50 g
L-Lisina	5.00 g
Lactosa	7.50 g
Sacarosa	7.50 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Extracto de levadura	3.00 g
Rojo de fenol	80.00 mg
Agar	13.50 g
Desoxicolato de sodio	2.50 g
Tiosulfato de sodio	6.80 g
Citrato de amonio y fierro (III)	0.80 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.4±0.2

Para disolver los ingredientes, calentar a punto de ebullición con agitación constante. No sobrecalentar ni esterilizar.

Agar verde brillante

Extracto de levadura	3.00 g
Digerido péptico de tejido animal	5.00 g
Digerido pancreático de caseína	5.00 g
Lactosa	10.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Sacarosa	10.00 g
Rojo de fenol	80.00 mg



Agar verde brillante (Continuación)

Verde brillante	12.50 mg
Agar	20.00 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	6.9±0.2

Esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos. Preparar el mismo día de uso.

Agar triple azúcar con hierro

Extracto de buey	3.00 g
Extracto de levadura	3.00 g
Peptonas (de carne y de caseína)	20.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Lactosa	10.00 g
Sacarosa	10.00 g
Glucosa monohidratada	1.00 g
Citrato de amonio y hierro (III)	0.30 g
Tiosulfato de sodio	0.30 g
Rojo de fenol	25.00 mg
Agar	12.00 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.4±0.2

Para disolver los ingredientes, calentar a punto de ebullición con agitación constante. Esterilizar en tubos de ensayo de 13 x 100 en un autoclave a 121°C durante 15 minutos y dejar enfriar en posición inclinada, de manera tal de obtener una parte profunda y una superficie en pendiente.

Agar sal manitol

Digerido pancreático de caseína	5.00 g
Digerido péptico de tejido animal	5.00 g
Extracto de carne	1.00 g
D-Manitol	10.00 g
Cloruro de sodio	75.00 g
Rojo de fenol	25.00 mg
Agar	15.00 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.4±0.2

Esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar Vogel-Johnson

Digerido pancreático de caseína	10.00 g
Extracto de levadura	5.00 g
Manitol	10.00 g
Fosfato dibásico de potasio	5.00 g
Cloruro de litio	5.00 g
Glicina	10.00 g
Rojo de fenol	25.00 mg
Agar	16.00 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.2±0.2

Esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.  
Adicionar 20 mL de una solución estéril 1:100 de telurito de potasio.

Agar Gelosa sangre

Infusión de corazón de buey	500 g
Triptosa	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	6.8±0.2

Esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar cetrimida

Digerido pancreático de gelatina	20.00 g
Cloruro de magnesio	1.40 g
Sulfato de potasio	10.00 g
Cetrimida	30.00 mg
Agar	13.60 g
Agua destilada	1000 mL
Glicerol	10 mL
pH después de esterilizar	7.2±0.2

Para disolver los ingredientes, calentar a punto de ebullición con agitación constante. Esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo de triptófano o caldo triptona (1% de triptófano)

Peptona o digerido pancreático de caseína (tripticasa)	2.00 g
Cloruro de sodio	0.50 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.0±0.2

Esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo RM-VP (Rojo de metilo-Voges-Proskauer)

Polipeptona	7.00 g
Glucosa	5.00 g
Fosfato dipotásico	5.00 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	6.9±0.2

Reactivo indicador de pH rojo de metilo

rojo de metilo	0.10 g
alcohol etílico 95%	300 mL
agua destilada	200 mL

**PRUEBA CON ROJO DE METILO:** 5 mL del caldo RM-VP se inocularon con un cultivo líquido y puro del microorganismo en estudio. El cultivo anterior se incubó a 35°C durante 24 a 72 h (no menos de 48 h). Al cabo de este tiempo, se agregan 5 gotas del reactivo rojo de metilo directamente al caldo. La aparición de una coloración roja estable en la superficie del medio, constituye una prueba positiva.

Como control positivo y negativo de la prueba con rojo de metilo se empleó una cepa de *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*, respectivamente.

**PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER:** 5 mL del caldo RM-VP se inocularon con un cultivo líquido y puro del microorganismo en estudio. El cultivo anterior se incubó a 35°C durante 24. Transcurrido este tiempo, se transfirió una alícuota de 1 mL de este cultivo, a un tubo de ensayo limpio y seco. Posteriormente, se adicionaron 0.6 mL de  $\alpha$ -naftol al 5% (en alcohol etílico absoluto) y 0.2 mL de KOH al 40% (en ese orden). La aparición de un color rojo después de 15 minutos de reacción, constituye una prueba positiva.

Agar-hierro de Kligler

Extracto de carne	3.00 g
Extracto de levadura	3.00 g
Peptona	15.00 g
Proteosa peptona	5.00 g
Lactosa	10.00 g
Glucosa	1.00 g
Sulfato ferroso	0.20 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Tiosulfato de sodio	0.30 g
Rojo de fenol	24.00 mg
Agar	12.00 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.4±0.2

Esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar hierro peptonado (SIM)

Extracto de carne	3.00 g
Peptona	10.00 g
Tiosulfato de sodio	25.00 mg
Cloruro de sodio	5.00 g
Agar	4.00 g
Agua destilada	1000 mL
pH después de esterilizar	7.3±0.2

Esterilizar por calentamiento en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

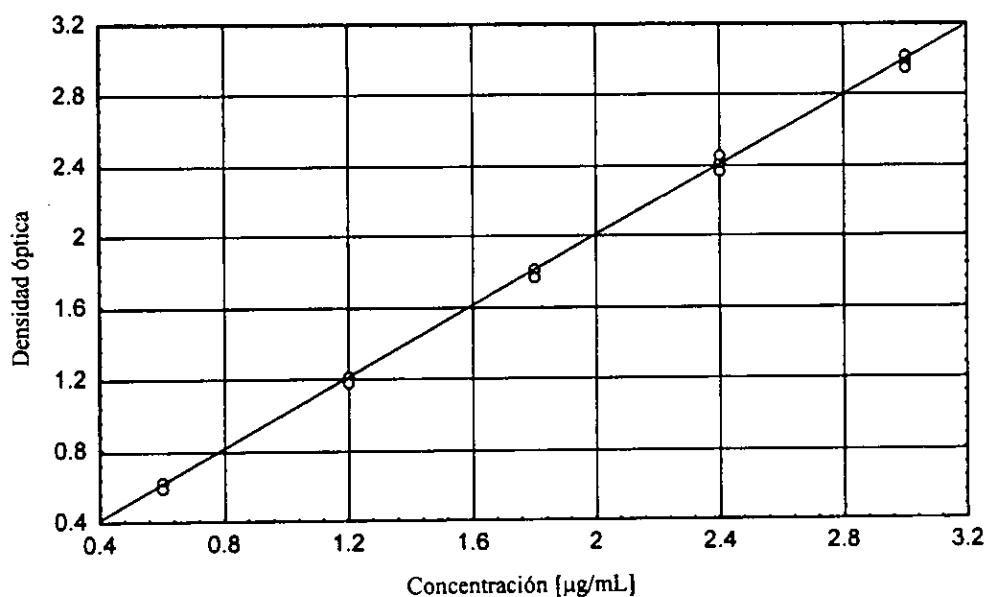
**Cuadro 28.** Resumen de la regresión lineal simple.

Resumen de la regresión  
 $R = 0.99962427$ ;  $R^2 = 0.99924868$  y  $R^2$  ajustada =  $0.99922184$   
 $F$  calculada (1,28) = 37240;  $p < 0.0000$ ; Error Std estimado: 0.02393

N=30	B	Err. St. de B	t(28)	p-level
Intercepto	0.015910	0.010244	1.5531	0.131638
Pendiente	0.993422	0.005148	192.9755	0.000000

Intervalo de confianza al 95% para el intercepto (b):  $-0.016680 < b < -0.048500$

Intervalo de confianza al 95% para la pendiente (m):  $0.982877 < m < 1.003967$



**Figura 21.** Relación lineal entre la variable X (concentración) y la variable Y (Densidad óptica).

APÉNDICE IV.

Análisis estadístico

a) Linearidad del sistema (cuantificación de fenoles totales).

STAT. MULTIPLE REGRESS.	Regression Summary for Dependent Variable: VAR2 R= .99684972 R <sup>2</sup> = .99370937 Adjusted R <sup>2</sup> = .99365606 F calculada (1,118)=18640. p<0.0000 Std.Error of estimate: .01875					
N=120	BETA	St. Err. of BETA	B	St. Err. of B	t(118)	p-level
Intercept			-.009852	.003262	-3.0206	.003093
VAR1	.996850	0.0070301	.366865	.002687	136.5286	0.000000

STAT. MULTIPLE REGRESS.	Analysis of Variance				
Effect	Sums of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Regress.	6.550041	1	6.550041	18640.06	0.00
Residual	.041465	118	.000351		
Total	6.591506				

STAT. MULTIPLE REGRESS.	Current Status of Sweep Matrix		
Variable	VAR1	VAR2	
VAR1	-1.00000	.996850	
VAR2	.99685	.006291	

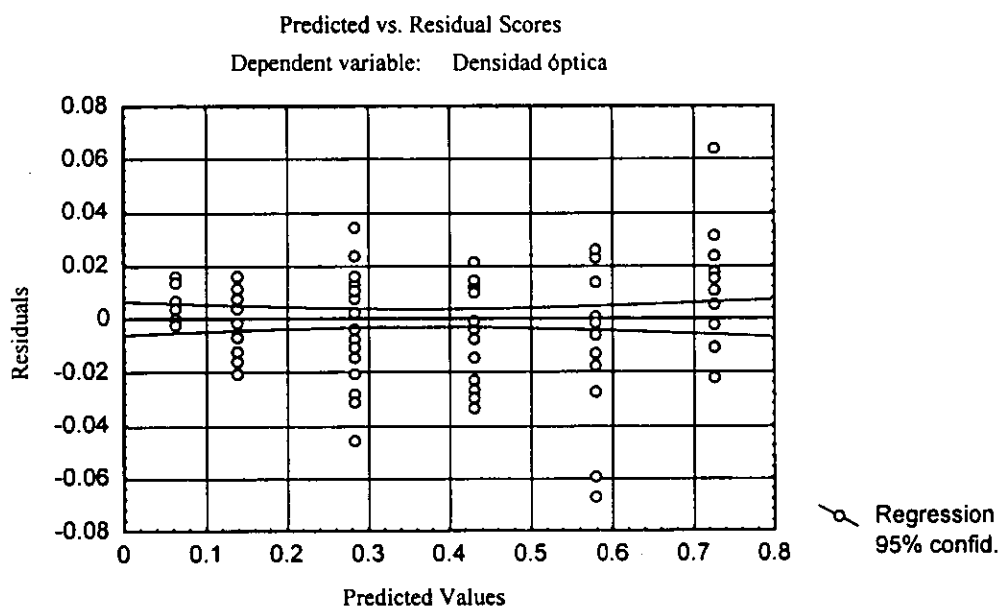
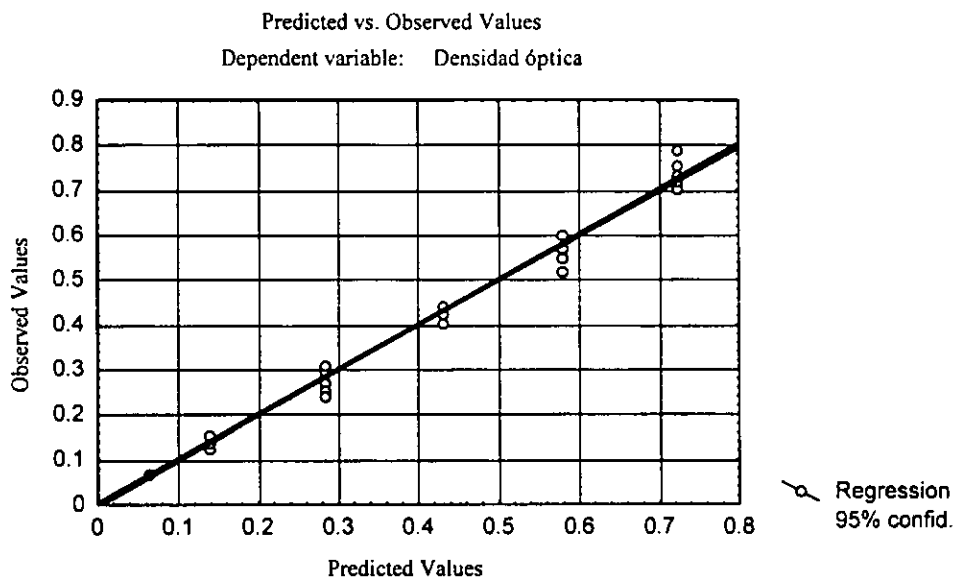
STAT. MULTIPLE REGRESS.	Variables currently in the Equation						
	Beta in	Partial Cor.	Semipart Cor.	Tolerance	R-square	t(119)	p-level
VAR1	.996850	.996850	.996850	1.000000	0.00	136.5286	0.00

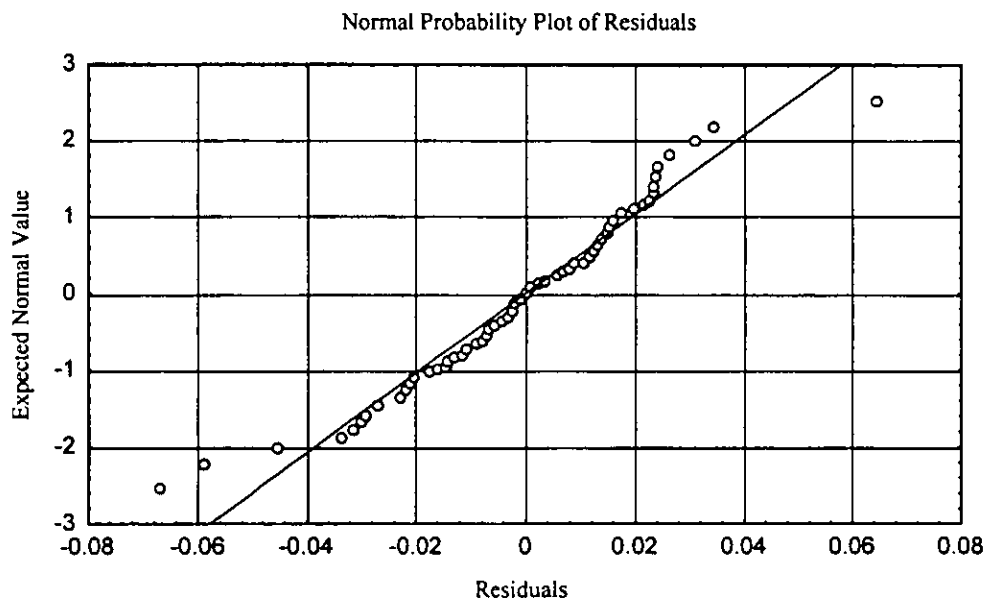
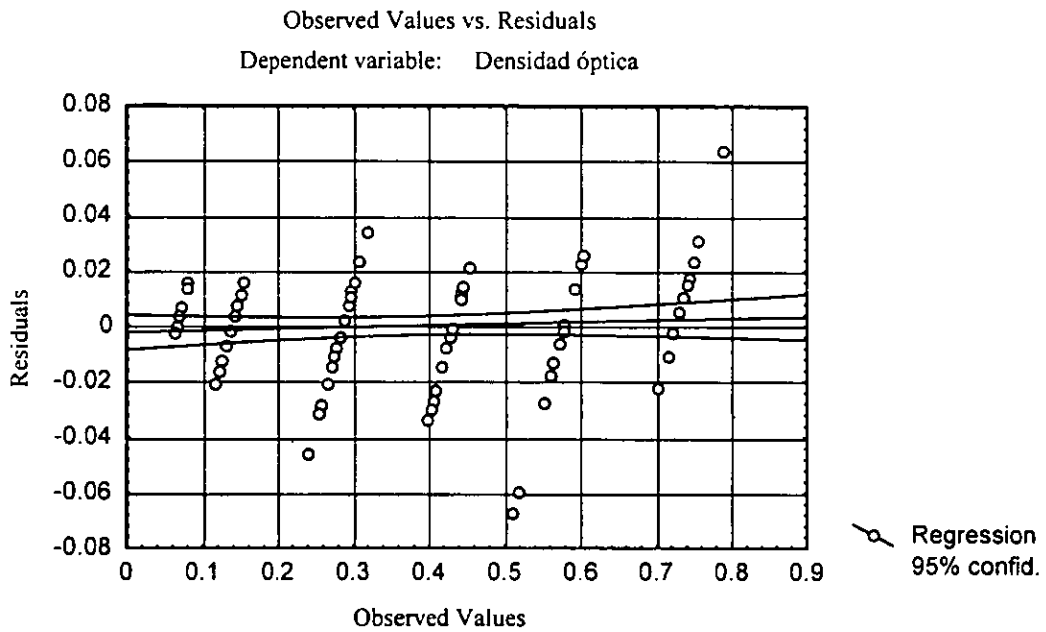
STAT. MULTIPLE REGRESS.	Predicted & Residual Values								
	Dependent variable: Densidad óptica								
Case No.	Observed Value	Predictd Value	Residual	Standard Pred. v.	Standard Residual	Std.Err. Pred.Val	Mahalns. Distance	Deleted Residual	Cook's Distance
1	.070300	.063521	-.006779	-1.30310	.36164	.002818	1.698059	.006936	.001547
2	.079200	.063521	-.015679	-1.30310	.83642	.002818	1.698059	.016042	.008276
3	.077600	.063521	-.014079	-1.30310	.75106	.002818	1.698059	.014405	.006673
4	.063500	.063521	-.000021	-1.30310	-.00111	.002818	1.698059	-.000021	.000000
5	.061400	.063521	-.002121	-1.30310	-.11314	.002818	1.698059	-.002170	.000151
6	.060900	.063521	-.002621	-1.30310	-.13981	.002818	1.698059	-.002682	.000231
7	.072000	.063521	.008479	-1.30310	.45233	.002818	1.698059	.008675	.002420
8	.063600	.063521	.000079	-1.30310	.00422	.002818	1.698059	.000081	.000000
9	.067400	.063521	.003879	-1.30310	.20693	.002818	1.698059	.003969	.000507
10	.076800	.063521	.013279	-1.30310	.70839	.002818	1.698059	.013586	.005936
11	.069000	.063521	.005479	-1.30310	.29229	.002818	1.698059	.005606	.001011
12	.065100	.063521	.001579	-1.30310	.08424	.002818	1.698059	.001616	.000084
13	.060900	.063521	-.002621	-1.30310	-.13981	.002818	1.698059	-.002682	.000231
14	.061400	.063521	-.002121	-1.30310	-.11314	.002818	1.698059	-.002170	.000151
15	.069900	.063521	.006379	-1.30310	.34030	.002818	1.698059	.006527	.001370
16	.075600	.063521	.012079	-1.30310	.64437	.002818	1.698059	.012358	.004912
17	.066900	.063521	.003379	-1.30310	.18026	.002818	1.698059	.003457	.000384
18	.061100	.063521	-.002421	-1.30310	-.12914	.002818	1.698059	-.002477	.000197
19	.062400	.063521	-.001121	-1.30310	-.05980	.002818	1.698059	-.001147	.000042
20	.071900	.063521	.008379	-1.30310	.44699	.002818	1.698059	.008573	.002364
21	.125100	.136894	-.011794	-.99035	-.62916	.002413	.980799	-.011993	.003392
22	.135200	.136894	-.001694	-.99035	-.09036	.002413	.980799	-.001722	.000070
23	.129700	.136894	-.007194	-.99035	-.38376	.002413	.980799	-.007315	.001262
24	.130300	.136894	-.006594	-.99035	-.35176	.002413	.980799	-.006705	.001060
25	.120800	.136894	-.016094	-.99035	-.85854	.002413	.980799	-.016365	.006316
26	.125200	.136894	-.011694	-.99035	-.62382	.002413	.980799	-.011891	.003335
27	.152600	.136894	.015706	-.99035	.83786	.002413	.980799	.015971	.006016
28	.116100	.136894	-.020794	-.99035	-.110927	.002413	.980799	-.021144	.010544
29	.129300	.136894	-.007594	-.99035	-.40510	.002413	.980799	-.007722	.001406
30	.134700	.136894	-.002194	-.99035	-.11703	.002413	.980799	-.002231	.000117
31	.148500	.136894	.011606	-.99035	.61914	.002413	.980799	.011802	.003285
32	.133700	.136894	-.003194	-.99035	-.17038	.002413	.980799	-.003248	.000249
33	.154200	.136894	.017306	-.99035	.92321	.002413	.980799	.017598	.007304
34	.140500	.136894	.003606	-.99035	.19237	.002413	.980799	.003667	.000317
35	.148300	.136894	.011406	-.99035	.60847	.002413	.980799	.011598	.003173
36	.151700	.136894	.014806	-.99035	.78985	.002413	.980799	.015056	.005346
37	.135400	.136894	-.001494	-.99035	-.07969	.002413	.980799	-.001519	.000054
38	.140000	.136894	.003106	-.99035	.16570	.002413	.980799	.003158	.000235
39	.144700	.136894	.007806	-.99035	.41643	.002413	.980799	.007938	.001486
40	.149900	.136894	.013006	-.99035	.69382	.002413	.980799	.013225	.004125
41	.269300	.283640	-.014340	-.36487	-.76497	.001822	.133128	-.014477	.002819
42	.263100	.283640	-.020540	-.36487	-1.09572	.001822	.133128	-.020736	.005783
43	.275900	.283640	-.007740	-.36487	-.41289	.001822	.133128	-.007814	.000821
44	.255100	.283640	-.028540	-.36487	-1.52249	.001822	.133128	-.028812	.011165
45	.272700	.283640	-.010940	-.36487	-.58360	.001822	.133128	-.011044	.001640
46	.238100	.283640	-.045540	-.36487	-2.42937	.001822	.133128	-.045974	.028427
47	.274500	.283640	-.009140	-.36487	-.48757	.001822	.133128	-.009227	.001145

STAT. MULTIPLE REGRESS.	Predicted & Residual Values								
	Dependent variable: Densidad óptica (Continuación)								
Case No.	Observed Value	Predictd Value	Residual	Standard Pred. v.	Standard Residual	Std.Err. Pred.Val	Mahalns. Distance	Deleted Residual	Cook's Distance
48	.252100	.283640	-.031540	-.36487	-1.68252	.001822	.133128	-.031841	.013635
49	.296400	.283640	.012760	-.36487	.68070	.001822	.133128	.012882	.002232
50	.291500	.283640	.007860	-.36487	.41931	.001822	.133128	.007935	.000847
51	.307400	.283640	.023760	-.36487	1.26751	.001822	.133128	.023987	.007738
52	.280200	.283640	-.003440	-.36487	-.18350	.001822	.133128	-.003473	.000162
53	.294000	.283640	.010360	-.36487	.55267	.001822	.133128	.010459	.001471
54	.285700	.283640	.002060	-.36487	.10990	.001822	.133128	.002080	.000058
55	.317700	.283640	.034060	-.36487	1.81697	.001822	.133128	.034385	.015902
56	.299800	.283640	.016160	-.36487	.86208	.001822	.133128	.016314	.003580
57	.298400	.283640	.014760	-.36487	.78740	.001822	.133128	.014901	.002986
58	.273400	.283640	-.010240	-.36487	-.54625	.001822	.133128	-.010338	.001437
59	.276200	.283640	-.007440	-.36487	-.39689	.001822	.133128	-.007511	.000759
60	.306200	.283640	.022560	-.36487	1.20349	.001822	.133128	.022775	.006976
61	.423000	.430386	-.007386	.26062	-.39400	.001769	.067922	-.007452	.000704
62	.426900	.430386	-.003486	.26062	-.18595	.001769	.067922	-.003517	.000157
63	.423400	.430386	-.006986	.26062	-.37266	.001769	.067922	-.007049	.000629
64	.416200	.430386	-.014186	.26062	-.75676	.001769	.067922	-.014313	.002596
65	.403800	.430386	-.026586	.26062	-1.41825	.001769	.067922	-.026825	.009117
66	.396800	.430386	-.033586	.26062	-1.79167	.001769	.067922	-.033888	.014549
67	.400900	.430386	-.029486	.26062	-1.57295	.001769	.067922	-.029751	.011214
68	.400400	.430386	-.029986	.26062	-1.59962	.001769	.067922	-.030255	.011597
69	.423600	.430386	-.006786	.26062	-.36200	.001769	.067922	-.006847	.000594
70	.442600	.430386	.012214	.26062	.65158	.001769	.067922	.012324	.001924
71	.445200	.430386	.014814	.26062	.79028	.001769	.067922	.014947	.002831
72	.416800	.430386	-.013586	.26062	-.72475	.001769	.067922	-.013708	.002381
73	.451600	.430386	.021214	.26062	1.13169	.001769	.067922	.021405	.005805
74	.415800	.430386	-.014586	.26062	-.77809	.001769	.067922	-.014717	.002744
75	.429800	.430386	-.000586	.26062	-.03125	.001769	.067922	-.000591	.000004
76	.407900	.430386	-.022486	.26062	-1.19953	.001769	.067922	-.022688	.006522
77	.422500	.430386	-.007886	.26062	-.42068	.001769	.067922	-.007957	.000802
78	.440600	.430386	.010214	.26062	.54489	.001769	.067922	.010306	.001346
79	.444100	.430386	.013714	.26062	.73160	.001769	.067922	.013837	.002426
80	.442400	.430386	.012014	.26062	.64091	.001769	.067922	.012122	.001862
81	.571300	.577132	-.005832	.88611	-.31110	.002291	.785183	-.005920	.000745
82	.559600	.577132	-.017532	.88611	-.93525	.002291	.785183	-.017798	.006730
83	.517900	.577132	-.059232	.88611	-3.15978	.002291	.785183	-.060130	.076816
84	.577800	.577132	.000668	.88611	.03564	.002291	.785183	.000678	.000010
85	.575900	.577132	-.001232	.88611	-.06571	.002291	.785183	-.001250	.000033
86	.577000	.577132	-.000132	.88611	-.00703	.002291	.785183	-.000134	.000000
87	.563900	.577132	-.013232	.88611	-.70586	.002291	.785183	-.013432	.003833
88	.510100	.577132	-.067032	.88611	-3.57588	.002291	.785183	-.068048	.098380
89	.600100	.577132	.022968	.88611	1.22526	.002291	.785183	.023316	.011550
90	.571500	.577132	-.005632	.88611	-.30043	.002291	.785183	-.005717	.000694
91	.591100	.577132	.013968	.88611	.74515	.002291	.785183	.014180	.004272
92	.577100	.577132	-.000032	.88611	-.00170	.002291	.785183	-.000032	.000000
93	.600800	.577132	.023668	.88611	1.26260	.002291	.785183	.024027	.012265



STAT. MULTIPLE REGRESS.	Predicted & Residual Values								
	Dependent variable: Densidad óptica (Continuación)								
Case No.	Observed Value	Predictd Value	Residual	Standard Pred. v.	Standard Residual	Std.Err. Pred. Val	Mahalns. Distance	Deleted Residual	Cook's Distance
94	.550100	.577132	-.027032	.88611	-1.44204	.002291	.785183	-.027442	.015999
95	.600000	.577132	.022868	.88611	1.21993	.002291	.785183	.023215	.011450
96	.572800	.577132	-.004332	.88611	-.23109	.002291	.785183	-.004397	.000411
97	.603100	.577132	.025968	.88611	1.38530	.002291	.785183	.026362	.014765
98	.603100	.577132	.025968	.88611	1.38530	.002291	.785183	.026362	.014765
99	.600200	.577132	.023068	.88611	1.23059	.002291	.785183	.023418	.011651
100	.600100	.577132	.022968	.88611	1.22526	.002291	.785183	.023316	.011550
101	.701700	.723878	-.022178	1.51159	-1.18310	.003111	2.284909	-.022806	.020377
102	.702200	.723878	-.021678	1.51159	-1.15642	.003111	2.284909	-.022292	.019468
103	.700900	.723878	-.022978	1.51159	-1.22577	.003111	2.284909	-.023628	.021873
104	.721400	.723878	-.002478	1.51159	-.13218	.003111	2.284909	-.002548	.000254
105	.713200	.723878	-.010678	1.51159	-.56962	.003111	2.284909	-.010980	.004723
106	.702700	.723878	-.021178	1.51159	-1.12975	.003111	2.284909	-.021777	.018581
107	.788100	.723878	.064222	1.51159	3.42600	.003111	2.284909	.066041	.170871
108	.729400	.723878	.005522	1.51159	.29459	.003111	2.284909	.005679	.001263
109	.754800	.723878	.030922	1.51159	1.64958	.003111	2.284909	.031798	.039613
110	.734600	.723878	.010722	1.51159	.57199	.003111	2.284909	.011026	.004763
111	.741800	.723878	.017922	1.51159	.95608	.003111	2.284909	.018430	.013307
112	.747500	.723878	.023622	1.51159	1.26015	.003111	2.284909	.024291	.023117
113	.735400	.723878	.011522	1.51159	.61466	.003111	2.284909	.011848	.005500
114	.721000	.723878	-.002878	1.51159	-.15352	.003111	2.284909	-.002959	.000343
115	.739100	.723878	.015222	1.51159	.81204	.003111	2.284909	.015653	.009600
116	.703700	.723878	-.020178	1.51159	-1.07640	.003111	2.284909	-.020749	.016867
117	.739800	.723878	.015922	1.51159	.84938	.003111	2.284909	.016373	.010503
118	.743200	.723878	.019322	1.51159	1.03076	.003111	2.284909	.019869	.015467
119	.747600	.723878	.023722	1.51159	1.26549	.003111	2.284909	.024394	.023314
120	.712600	.723878	-.011278	1.51159	-.60162	.003111	2.284909	-.011597	.005269
Minimum	.060900	.063521	-.067032	-1.30310	-3.57588	.001769	.067922	-.068048	.000000
Maximum	.788100	.723878	.064222	1.51159	3.42600	.003111	2.284909	.066041	.170871
Mean	.369242	.369242	-.000000	.000000	-.000000	.002371	.991667	.000026	.008383
Median	.357250	.357013	-.000359	-.05212	-.01914	.002352	.882991	-.000362	.002825





b) Linearidad del método (Cuantificación de fenoles totales)

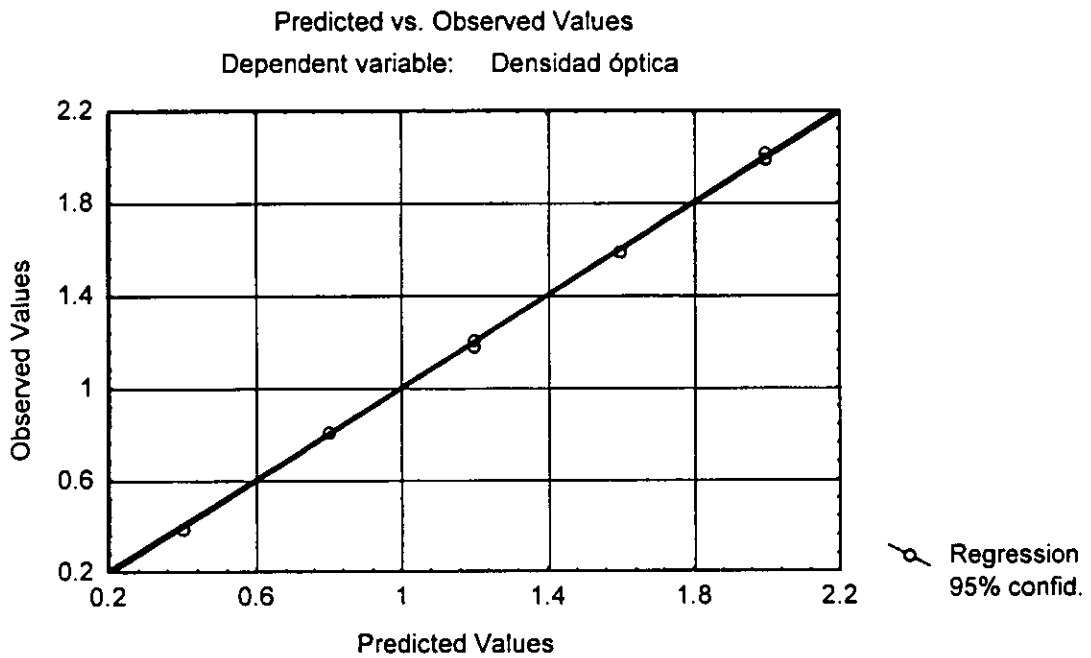
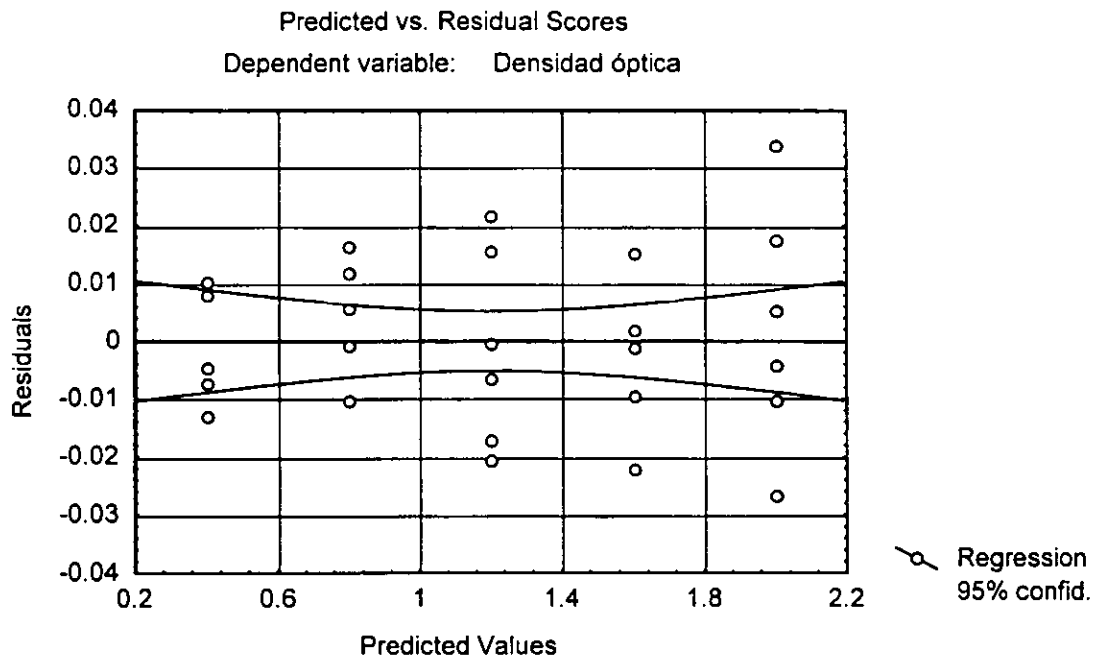
STAT. MULTIPLE REGRESS.	Regression Summary for Dependent Variable: VAR2 R= .99970170 R <sup>2</sup> = .99940348 Adjusted R <sup>2</sup> = .99938218 F(1,28)=46911. p<0.0000 Std.Error of estimate: .01428					
N=30	BETA	St. Err. of BETA	B	St. Err. of B	t(28)	p-level
Intercpt VAR1	.999702	004616	.000607 .998283	.006115 .004609	.0992 216.5898	.921674 0.000000

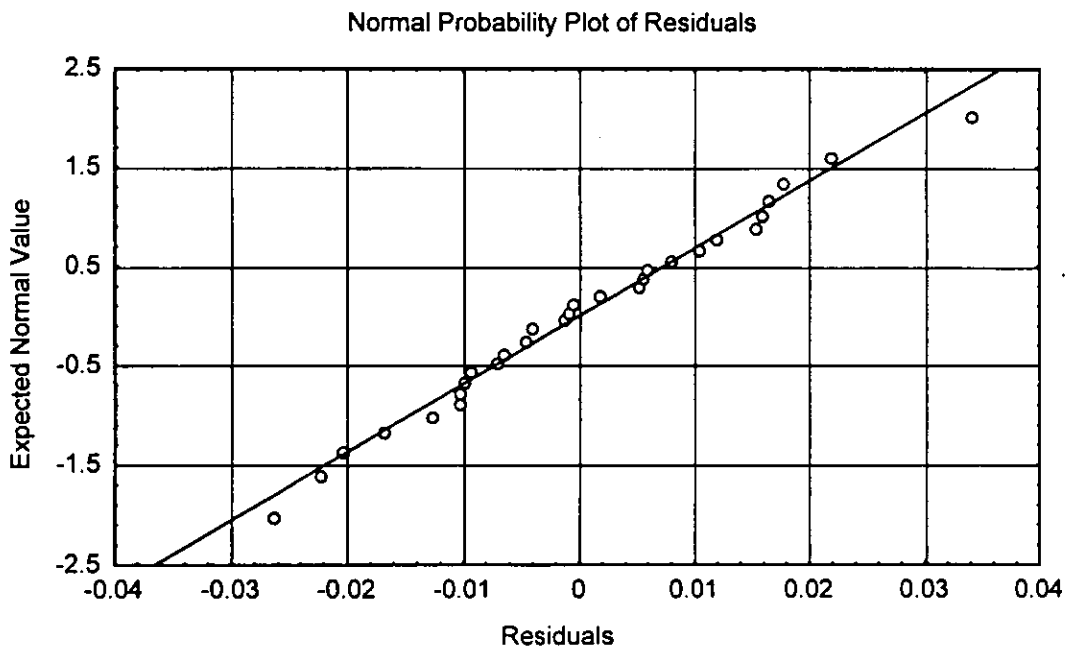
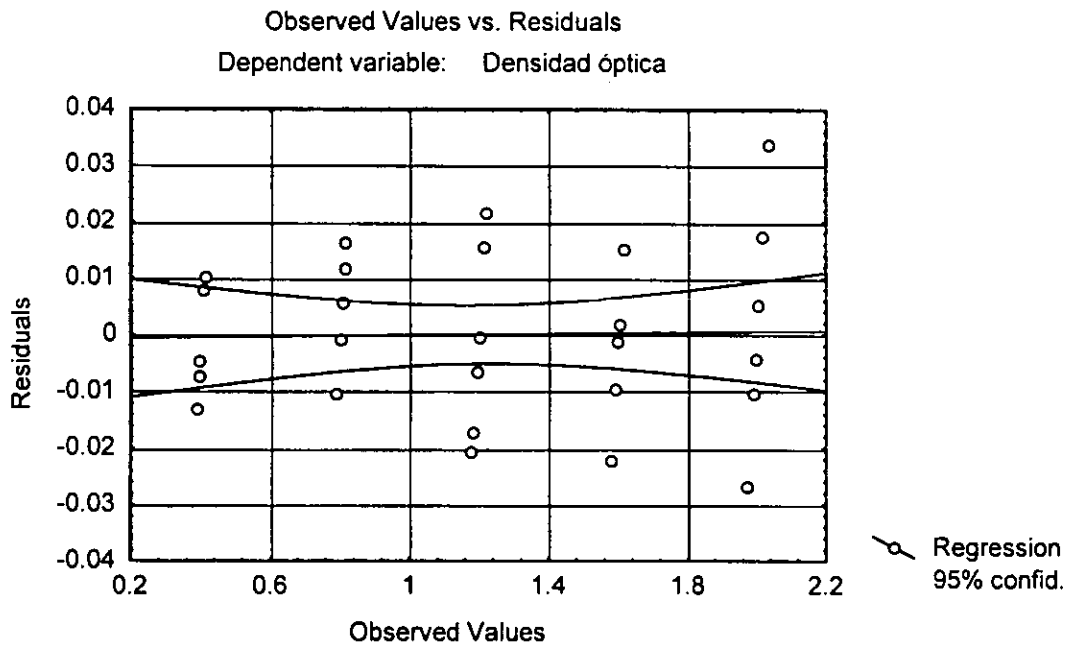
STAT. MULTIPLE REGRESS.	Analysis of Variance				
Effect	Sums of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Regress. Residual Total	9.567068 .005710 9.572779	1 28	9.567068 .000204	46911.16	0.00

STAT. MULTIPLE REGRESS.	Current Status of Sweep Matrix	
Effect	VAR1	VAR2
VAR1 VAR2	-1.00000 .99970	.999702 .000597

STAT. MULTIPLE REGRESS.	Variables currently in the Equation						
	Beta in	Partial Cor.	Semipart Cor.	Tolerance	R-square	t(29)	p-level
VAR1	.999702	.999702	.999702	1.000000	0.00	216.5898	0.00

STAT. MULTIPLE REGRESS.	Predicted & Residual Values								
	Dependent variable: Densidad óptica								
Case No.	Observed Value	Predictd Value	Residual	Standard Pred. v.	Standard Residual	Std.Err. Pred.Val	Mahalns. Distance	Deleted Residual	Cook's Distance
1	.392800	.399920	-.007120	-1.39044	-.49857	.004516	1.933333	-.007911	.015344
2	.410300	.399920	.010380	-1.39044	.72685	.004516	1.933333	.011533	.032612
3	.387100	.399920	-.012820	-1.39044	-.89771	.004516	1.933333	-.014244	.049746
4	.407800	.399920	.007880	-1.39044	.55179	.004516	1.933333	.008756	.018795
5	.395300	.399920	-.004620	-1.39044	-.32351	.004516	1.933333	-.005133	.006460
6	.395300	.399920	-.004620	-1.39044	-.32351	.004516	1.933333	-.005133	.006460
7	.805100	.799233	.005867	-.69522	.41081	.003193	.483333	.006175	.004675
8	.789000	.799233	-.010233	-.69522	-.71658	.003193	.483333	-.010772	.014224
9	.798300	.799233	-.000933	-.69522	-.06535	.003193	.483333	-.000982	.000118
10	.811100	.799233	.011867	-.69522	.83096	.003193	.483333	.012491	.019127
11	.815500	.799233	.016267	-.69522	1.13906	.003193	.483333	.017123	.035941
12	.804300	.799233	.005067	-.69522	.35479	.003193	.483333	.005333	.003487
13	1.181600	1.198547	-.016947	-.00000	-1.18668	.002607	.000000	-.017531	.025117
14	1.192000	1.198547	-.006547	-.00000	-.45842	.002607	.000000	-.006772	.003748
15	1.198000	1.198547	-.000547	-.00000	-.03828	.002607	.000000	-.000566	.000026
16	1.178100	1.198547	-.020447	-.00000	-1.43176	.002607	.000000	-.021152	.036563
17	1.214300	1.198547	.015753	-.00000	1.10312	.002607	.000000	.016297	.021704
18	1.220300	1.198547	.021753	-.00000	1.52326	.002607	.000000	.022503	.041385
19	1.588400	1.597860	-.009460	.69522	-.66243	.003193	.483333	-.009958	.012155
20	1.599600	1.597860	.001740	.69522	.12184	.003193	.483333	.001832	.000411
21	1.587900	1.597860	-.009960	.69522	-.69744	.003193	.483333	-.010484	.013474
22	1.596600	1.597860	-.001260	.69522	-.08823	.003193	.483333	-.001326	.000216
23	1.575600	1.597860	-.022260	.69522	-1.55874	.003193	.483333	-.023432	.067304
24	1.613000	1.597860	.015140	.69522	1.06017	.003193	.483333	.015937	.031135
25	2.014800	1.997173	.017627	1.39044	1.23430	.004516	1.933333	.019585	.094043
26	1.993000	1.997173	-.004173	1.39044	-.29223	.004516	1.933333	-.004637	.005272
27	2.031200	1.997173	.034027	1.39044	2.38269	.004516	1.933333	.037807	.350445
28	2.002600	1.997173	.005427	1.39044	.38000	.004516	1.933333	.006030	.008913
29	1.986800	1.997173	-.010373	1.39044	-.72639	.004516	1.933333	-.011526	.032570
30	1.970700	1.997173	-.026473	1.39044	-1.85377	.004516	1.933333	-.029415	.212128
Minimum	.387100	.399920	-.026473	-1.39044	-1.85377	.002607	.000000	-.029415	.000026
Maximum	2.031200	1.997173	.034027	1.39044	2.38269	.004516	1.933333	.037807	.350445
Mean	1.198547	1.198547	.000000	-.00000	.00000	.003605	.966667	.000014	.038787
Median	1.195000	1.198547	-.001097	-.00000	-.07679	.003193	.483333	-.001154	.017069





c) Linearidad del sistema (cuantificación de catequina).

STAT. MULTIPLE REGRESS.	Regression Summary for Dependent Variable: VAR2 R= .99754084 R <sup>2</sup> = .99508773 Adjusted R <sup>2</sup> = .99494325 F(1,34)=6887.4 p<.00000 Std.Error of estimate: .01544					
N=36	BETA	St. Err. of BETA	B	St. Err. of B	t(34)	p-level
Intercpt			-.020076	.004905	-4.09322	.000248
VAR1	.997541	.012020	.223565	.002694	82.99063	.000000

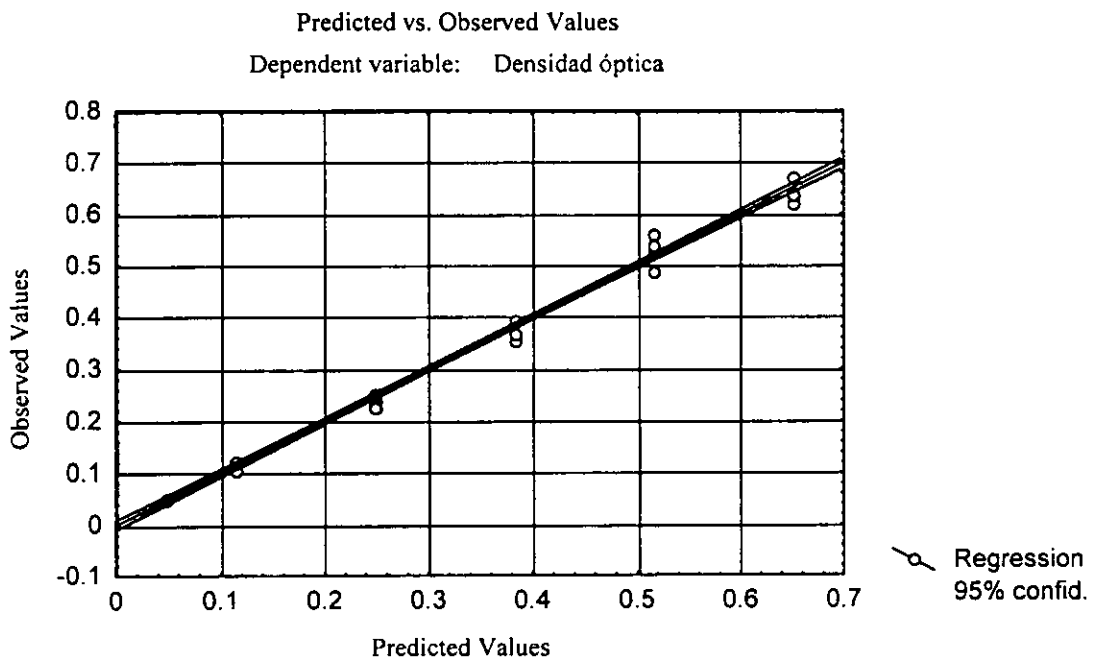
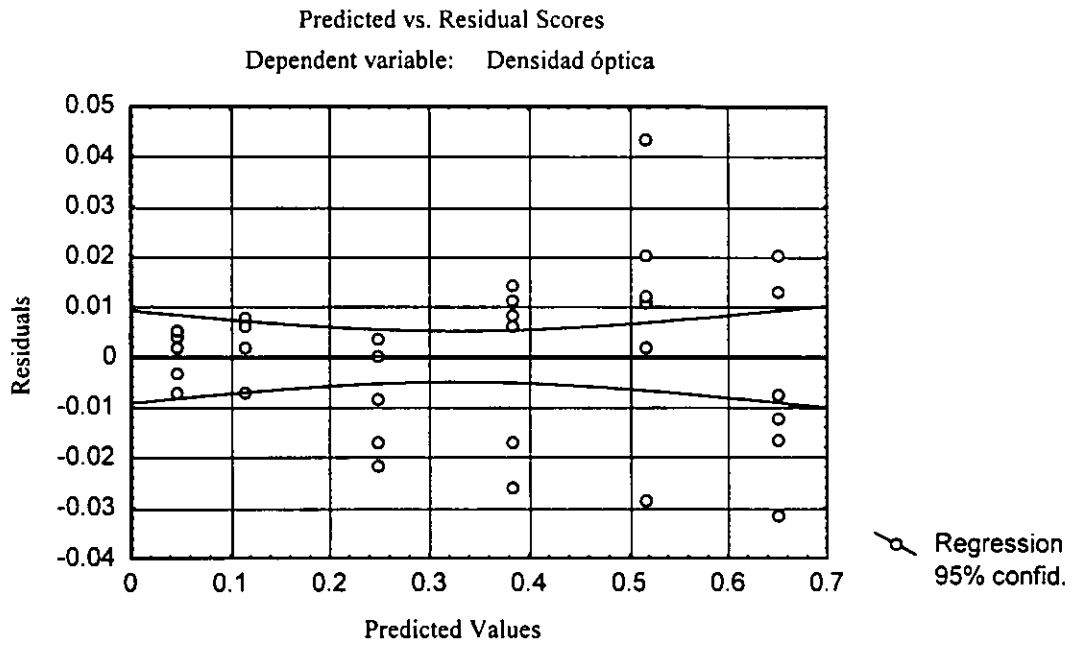
STAT. MULTIPLE REGRESS.	Analysis of Variance				
Effect	Sums of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Regress.	1.641890	1	1.641890	6887.445	.000000
Residual	.008105	34	.000238		
Total	1.649996				

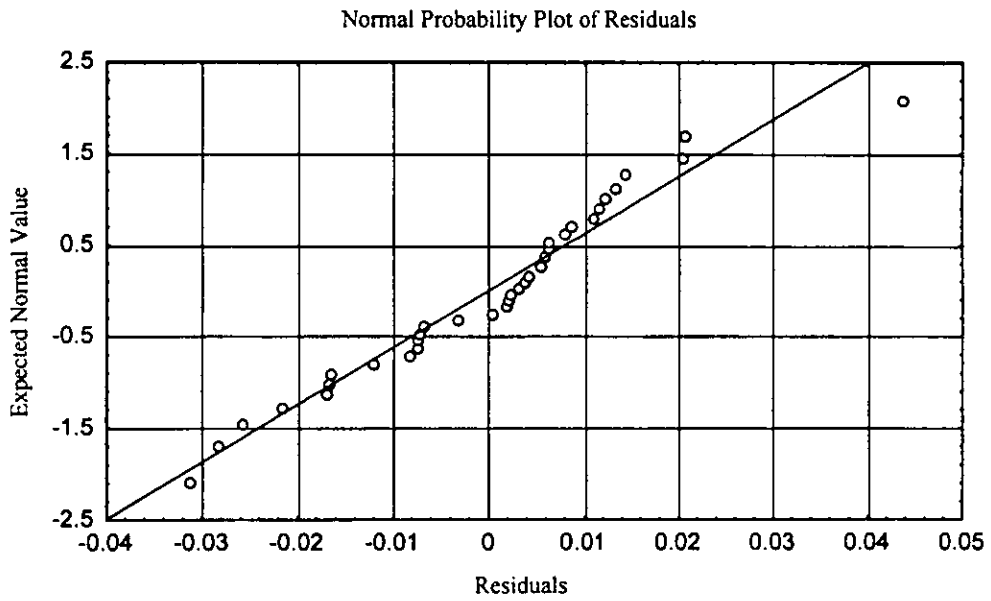
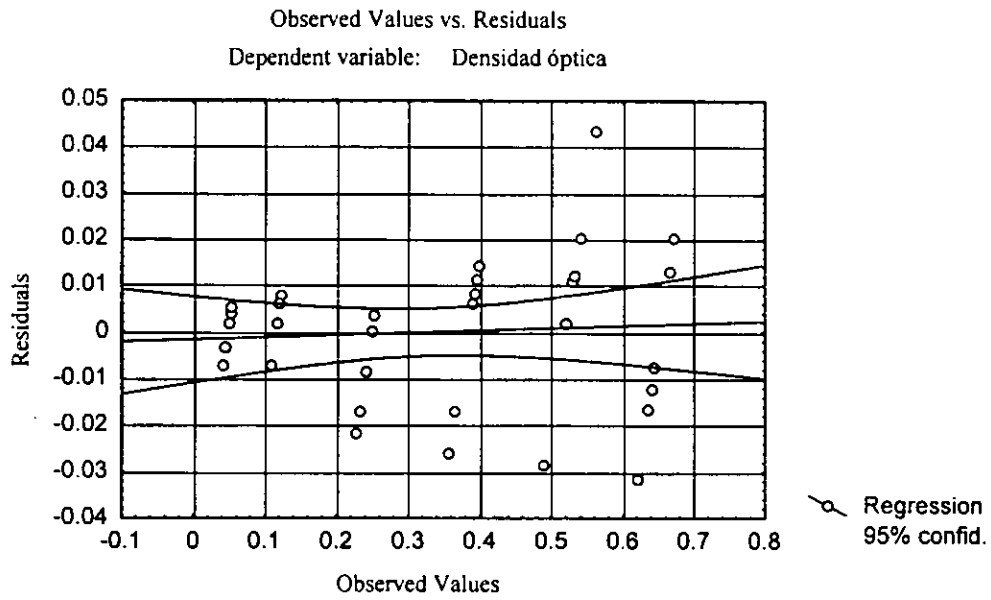
STAT. MULTIPLE REGRESS.	Current Status of Sweep Matrix	
Variable	VAR1	VAR2
VAR1	-1.00000	.997541
VAR2	.99754	.004912

STAT. MULTIPLE REGRESS.	Variables currently in the Equation						
	Beta in	Partial Cor.	Semipart Cor.	Tolerance	R-square	t(35)	p-level
VAR1	.997541	.997541	.997541	1.000000	0.00	82.99063	0.000000



STAT. MULTIPLE REGRESS.	Predicted & Residual Values								
	Dependent variable: Densidad óptica								
Case No.	Observed Value	Predictd Value	Residual	Standard Pred. v.	Standard Residual	Std.Err. Pred.Val	Mahalns. Distance	Deleted Residual	Cook's Distance
1	.049200	.046993	.002207	-1.29026	.14292	.004238	1.664764	.002386	.000900
2	.051100	.046993	.004107	-1.29026	.26598	.004238	1.664764	.004441	.003117
3	.040100	.046993	-.006893	-1.29026	-.44647	.004238	1.664764	-.007455	.008783
4	.052500	.046993	.005507	-1.29026	.35665	.004238	1.664764	.005955	.005604
5	.043700	.046993	-.003293	-1.29026	-.21330	.004238	1.664764	-.003562	.002005
6	.052500	.046993	.005507	-1.29026	.35665	.004238	1.664764	.005955	.005604
7	.106900	.114063	-.007163	-.98060	-.46393	.003629	.961568	-.007582	.006662
8	.116000	.114063	.001937	-.98060	.12546	.003629	.961568	.002050	.000487
9	.122100	.114063	.008037	-.98060	.52054	.003629	.961568	.008507	.008387
10	.120300	.114063	.006237	-.98060	.40396	.003629	.961568	.006602	.005051
11	.119900	.114063	.005837	-.98060	.37805	.003629	.961568	.006178	.004424
12	.106700	.114063	-.007363	-.98060	-.47688	.003629	.961568	-.007794	.007039
13	.239800	.248202	-.008402	-.36127	-.54419	.002741	.130517	-.008675	.004974
14	.252000	.248202	.003798	-.36127	.24598	.002741	.130517	.003921	.001016
15	.226500	.248202	-.021702	-.36127	-1.40559	.002741	.130517	-.022408	.033182
16	.248600	.248202	.000398	-.36127	.02577	.002741	.130517	.000411	.000011
17	.251300	.248202	.003098	-.36127	.20064	.002741	.130517	.003199	.000676
18	.231500	.248202	-.016702	-.36127	-1.08176	.002741	.130517	-.017245	.019654
19	.393800	.382341	.011459	.25805	.74215	.002660	.066591	.011809	.008681
20	.390900	.382341	.008559	.25805	.55432	.002660	.066591	.008820	.004843
21	.356400	.382341	-.025941	.25805	-1.68015	.002660	.066591	-.026735	.044495
22	.396700	.382341	.014359	.25805	.92997	.002660	.066591	.014798	.013632
23	.388600	.382341	.006259	.25805	.40536	.002660	.066591	.006450	.002590
24	.365300	.382341	-.017041	.25805	-1.10372	.002660	.066591	-.017563	.019201
25	.527400	.516481	.010920	.87738	.70723	.003445	.769787	.011491	.013785
26	.488100	.516481	-.028381	.87738	-1.83813	.003445	.769787	-.029867	.093122
27	.560100	.516481	.043620	.87738	2.82513	.003445	.769787	.045904	.219974
28	.518500	.516481	.002019	.87738	.13080	.003445	.769787	.002125	.000472
29	.537100	.516481	.020620	.87738	1.33547	.003445	.769787	.021700	.049155
30	.528700	.516481	.012219	.87738	.79143	.003445	.769787	.012860	.017263
31	.671000	.650620	.020380	1.49670	1.31998	.004678	2.240107	.022440	.096934
32	.619200	.650620	-.031420	1.49670	-2.03497	.004678	2.240107	-.034595	.230387
33	.663900	.650620	.013280	1.49670	.86013	.004678	2.240107	.014622	.041160
34	.638500	.650620	-.012120	1.49670	-.78496	.004678	2.240107	-.013344	.034280
35	.643200	.650620	-.007420	1.49670	-.48056	.004678	2.240107	-.008170	.012848
36	.634100	.650620	-.016520	1.49670	-1.06994	.004678	2.240107	-.018189	.063688
Minimum	.040100	.046993	-.031420	-1.29026	-2.03497	.002660	.066591	-.034595	.000011
Maximum	.671000	.650620	.043620	1.49670	2.82513	.004678	2.240107	.045904	.230387
Mean	.326450	.326450	-.000000	.00000	-.00000	.003565	.972222	-.000015	.030113
Median	.304200	.315272	.002652	-.05161	.17178	.003537	.865677	.002793	.008534





c) Linearidad del sistema (cuantificación de catequina)

STAT. MULTIPLE REGRESS.	Regression Summary for Dependent Variable: VAR 2 R= .99962427 R <sup>2</sup> = .99924868 Adjusted R <sup>2</sup> = .99922184 F(1,28)=37240. p<.00000 Std.Error of estimate: .02393					
N=30	BETA	St. Err. of BETA	B	St. Err. of B	t(28)	p-level
Intercept VAR1	.999624	.005180	.015910 .993422	.010244 .005148	1.5531 192.9755	.131638 .000000

STAT. MULTIPLE REGRESS.	Analysis of Variance				
Effect	Sums of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Regress.	21.31677	1	21.31677	37239.53	.000000
Residual	.01603	28	.00057		
Total	21.33280				

STAT. MULTIPLE REGRESS.	Current Status of Sweep Matrix	
Variable	VAR1	VAR2
VAR1	-1.00000	.999624
VAR2	.99962	.000751

STAT. MULTIPLE REGRESS.	Variables currently in the Equation (linsisca.sta)						
	Beta in	Partial Cor.	Semipart Cor.	Tolerance	R-square	t(29)	p-level
VAR1	.999624	.999624	.999624	1.000000	0.00	192.9755	.000000

STAT. MULTIPLE REGRESS.	Predicted & Residual Values								
	Dependent variable: Densidad óptica								
Case No.	Observed Value	Predictd Value	Residual	Standard Pred. v.	Standard Residual	Std.Err. Pred.Val	Mahalns. Distance	Deleted Residual	Cook's Distance
1	.627000	.611963	.015037	-1.39044	.62848	.007566	1.933333	.016707	.024382
2	.603700	.611963	-.008263	-1.39044	-.34538	.007566	1.933333	-.009181	.007363
3	.612700	.611963	.000737	-1.39044	.03079	.007566	1.933333	.000819	.000059
4	.607800	.611963	-.004163	-1.39044	-.17401	.007566	1.933333	-.004626	.001869
5	.590800	.611963	-.021163	-1.39044	-.88456	.007566	1.933333	-.023515	.048299
6	.609500	.611963	-.002463	-1.39044	-.10296	.007566	1.933333	-.002737	.000654
7	1.208900	1.208017	.000883	-.69522	.03692	.005350	.483333	.000930	.000038
8	1.216100	1.208017	.008083	-.69522	.33786	.005350	.483333	.008509	.003162
9	1.196000	1.208017	-.012017	-.69522	-.50226	.005350	.483333	-.012649	.006988
10	1.176300	1.208017	-.031717	-.69522	-1.32565	.005350	.483333	-.033386	.048680
11	1.217900	1.208017	.009883	-.69522	.41309	.005350	.483333	.010404	.004727
12	1.228500	1.208017	.020483	-.69522	.85614	.005350	.483333	.021561	.020304
13	1.813200	1.804070	.009130	-.00000	.38160	.004368	.000000	.009445	.002597
14	1.793500	1.804070	-.010570	-.00000	-.44179	.004368	.000000	-.010935	.003481
15	1.784200	1.804070	-.019870	-.00000	-.83050	.004368	.000000	-.020555	.012302
16	1.835600	1.804070	.031530	-.00000	1.31785	.004368	.000000	.032617	.030976
17	1.828400	1.804070	.024330	-.00000	1.01691	.004368	.000000	.025169	.018444
18	1.771200	1.804070	-.032870	-.00000	-1.37386	.004368	.000000	-.034004	.033665
19	2.411300	2.400123	.011177	.69522	.46714	.005350	.483333	.011765	.006045
20	2.421500	2.400123	.021377	.69522	.89347	.005350	.483333	.022502	.022113
21	2.434100	2.400123	.033977	.69522	1.42011	.005350	.483333	.035765	.055864
22	2.452000	2.400123	.051877	.69522	2.16827	.005350	.483333	.054607	.130232
23	2.366500	2.400123	-.033623	.69522	-1.40535	.005350	.483333	-.035393	.054709
24	2.406300	2.400123	.006177	.69522	.25817	.005350	.483333	.006502	.001846
25	2.988300	2.996177	-.007877	1.39044	-.32922	.007566	1.933333	-.008752	.006690
26	2.974400	2.996177	-.021777	1.39044	-.91019	.007566	1.933333	-.024196	.051139
27	2.946700	2.996177	-.049477	1.39044	-2.06796	.007566	1.933333	-.054974	.263978
28	2.966800	2.996177	-.029377	1.39044	-1.22785	.007566	1.933333	-.032641	.093063
29	3.014700	2.996177	.018523	1.39044	.77421	.007566	1.933333	.020581	.037000
30	3.018200	2.996177	.022023	1.39044	.92050	.007566	1.933333	.024470	.052303
Minimum	.590800	.611963	-.049477	-1.39044	-2.06796	.004368	.000000	-.054974	.000038
Maximum	3.018200	2.996177	.051877	1.39044	2.16827	.007566	1.933333	.054607	.263978
Mean	1.804070	1.804070	-.000000	-.00000	-.00000	.006040	.966667	-.000173	.034766
Median	1.803350	1.804070	.000810	-.00000	.03386	.005350	.483333	.000874	.019374

