

7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CONTROL DE CALIDAD DE PLANTAS PARA USO MEDICINAL: *Mimosa tenuiflora* (TEPEZCOHUIITE)

295396

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

SALOMON JAIME ARMENTA MARROQUIN



MEXICO, D.F.

EXAMENES Y OBTENCION DEL TITULO DE QUIMICO

2001



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 **OFELIA ESPEJO GONZALEZ**
Vocal **ROSA LORENIA MORA-TOVAR Y CHAVEZ**
Secretario **LINO JOEL REYES TREJO**
1er sup. **JUAN MANUEL RODRÍGUEZ**
2do sup. **JAVIER ALFREDO CARBALLO PEREA**

Este tema se desarrolló en el laboratorio 121, Conjunto E, Facultad de Química.


Asesora del tema **DRA. OFELIA ESPEJO GONZALEZ**


Sustentante **SALOMON JAIME ARMENTA MARROQUIN**

INDICE GENERAL

1. OBJETIVO.....	1
2. INTRODUCCION.....	2
3. PARTE TEORICA	
3.1 ANTECEDENTES	
3.1.1 CARACTERISTICAS BOTANICAS DE LAS CORTEZAS.....	3-4
3.1.2 TEPEZCOHUIE	
3.1.2.1 GENERALIDADES.....	5-7
3.1.2.2 CARACTERISTICAS QUIMICAS.....	8-12
3.1.2.3 ACTIVIDAD BIOLOGICA.....	13-14
3.1.2.4 PROPIEDADES ATRIBUIDAS POPULARMENTE.....	15
4. PARTE EXPERIMENTAL	
4.1 MATERIAL Y METODOS	
4.1.1 MATERIAL VEGETAL.....	16
4.1.2 MUESTREO.....	17
4.1.3 DESCRIPCION	
4.1.3.1 DESCRIPCION MACROSCOPICA.....	18
4.1.3.2 DESCRIPCION MICROSCOPICA	
4.1.3.2.1 DISOCIADOS.....	19
4.1.3.2.2 PREPARACIONES SEMIPERMANENTES.....	20-22
4.1.4 ENSAYOS DE IDENTIDAD	
4.1.4.1 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA	
4.1.4.1.1 PROCEDIMIENTO 1.....	23
4.1.4.1.2 PROCEDIMIENTO 2.....	24
4.1.4.2 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE	
4.1.4.2.1 PROCEDIMIENTO 1.....	25
4.1.4.2.2 PROCEDIMIENTO 2.....	26
4.1.5 ENSAYOS	
4.1.5.1 PERDIDA AL SECADO.....	27
4.1.5.2 CENIZAS TOTALES.....	28
4.1.5.3 CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO.....	29
4.1.6 VALORACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS	
4.1.6.1 CUANTIFICACION DE TANINOS	
4.1.6.1.1 CURVA PATRON.....	30
4.1.6.1.2 APLICACION DE LA TECNICA EN EL MATERIAL VEGETAL.....	31
4.1.7 EXTRACCION Y SEPARACION DE COMPONENTES QUIMICOS	
4.1.7.1 EXTRACCION.....	32
4.1.7.2 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO.....	32-33
4.1.7.3 SEPARACION DE LOS CONSTITUYENTES.....	33
4.1.7.4 PURIFICACION.....	34

4.1.8 ANALISIS MICROBIOLOGICO	
4.1.8.1 PREPARACION DE LA MUESTRA.....	35
4.1.8.2 ENTEROBACTERIAS Y ALGUNAS OTRAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.....	36
4.1.8.3 ESCHERICHIA COLI.....	37
4.1.8.4 PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	37
4.1.8.5 MESOFILOS AEROBIOS.....	37
4.1.8.6 HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS.....	38
5. RESULTADOS	
5.1 DESCRIPCION	
5.1.1 DESCRIPCION MACROSCOPICA.....	39
5.1.2 DESCRIPCION MICROSCOPICA.....	40
5.2 ENSAYOS DE IDENTIDAD	
5.2.1 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.....	44
5.2.2 ESPECTROSCOPIA EN ULTRAVIOLETA.....	44
5.3 ENSAYOS	
5.3.1 PERDIDA AL SECADO.....	44
5.3.2 CENIZAS TOTALES.....	44
5.3.3 CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO.....	45
5.4 VALORACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS	
5.4.1 CUANTIFICACION DE TANINOS.....	45
5.5 EXTRACCION Y SEPARACION DE COMPONENTES QUIMICOS.....	45-46
5.6 ANALISIS MICROBIOLOGICO	
5.6.1 ENTEROBACTERIAS Y ALGUNAS OTRAS BACTERIAS GRAM- NEGATIVAS.....	46
5.6.2 ESCHERICHIA COLI.....	46
5.6.3 PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	46
5.6.4 MESOFILOS AEROBIOS.....	47
5.6.5 HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS.....	47
6 ANALISIS DE RESULTADOS	
6.1 DESCRIPCION.....	48
6.2 ENSAYOS DE IDENTIDAD.....	48
6.3 ENSAYOS Y VALORACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS.....	49
6.4 AISLAMIENTO DE COMPONENTES QUIMICOS DE <i>MIMOSA</i> <i>TENUIFLORA</i>	49
6.5 ANALISIS MICROBIOLOGICO.....	50
7 CONCLUSIONES.....	51-53
8 BIBLIOGRAFIA.....	54-55
9 APENDICE 1.....	56-89

Doy las gracias a las siguientes personas que de una u otra forma me apoyaron durante el desarrollo de este trabajo:

A mi directora de tesis: Ofelia Espejo González

A los demás miembros del jurado que revisaron este trabajo, por sus valiosos comentarios y sugerencias:

Rosa Lorenia Mora-Tovar y Chávez

Lino Joel Reyes Trejo

Al director de los Laboratorios MIXIM por su gran apoyo:

Jorge Ebrard Maure

A la responsable del Laboratorio de Apoyo a la Investigación, Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM; por compartirme sus conocimientos y sobre todo por su paciencia:

Esthela Sandoval Zapotitla

A la encargada en ese momento del Laboratorio de Control de Calidad de los Laboratorios MIXIM por su apoyo técnico:

Magdalena Martínez Del Valle

Al profesor:

Alfonso Lira Rocha

A todos mis amigos:

Adriana López Mendoza; Ale; María Dolores Soriano Muñoz; Karla Mónica; Fabiola; Evelyn Rivera; Vanesa F.; Nancy Verónica Galván Reyes; Virginia; Adriana; Mireya; Araceli De León Jam; Edith; Araceli Pelcastre; Jenny; Miriam; Diana Cortés; Diana X.; Amalia Salgado; Alejandra Cano Rodríguez; Leticia Monteleón; Isabel Perez-Amador; Claudia Suárez Olvera; Bibiana; Andrea; Mónica Hernández Vázquez; Carla Cervantes Camacho; Yéssica; Pilar(pilo); Magdalena Sánchez; Alejandra Rico Matus; Jennifer Estrada E.; Rosa Elena Flores; Lillian I. Castro Pérez; Mónica Pereda; María Luisa; Laura Olguín; Mónica Hernández Bautista; Yolanda; Marcela; Regina; Roxana; Analí; Sra. Berta; Penélope; Patricia Pérez Barrón.

Luis Mendoza Romero; Jorge Sandín Gómez; José Luis Camacho; Abraham Ayala Bautista; Anselmo Solís; Rivelino; Miguel; Rodrigo; Luis Rodrigo; Eduardo; Hector Viramontes; René Santos Rubio; Juan Orozco T.; Aldo; Alejandro Aguilar Valdés; Humberto California González; Hugo César Espinoza; Osvaldo; Enrique; Arturo López Gómez; Moisés; Roberto; Luis Enrique; Juan Paredes; José Luis; Luis Enrique; Salvador; Jesús Jefté; Victor Hugo ; José Luis Segura; Juan Carlos Acosta; Jesús Vivanco; Armando Castro; Mario Avilés.

Y a todos aquellos que a mi memoria en este momento escapan:

"Gracias por el regalo de su amistad"

1. OBJETIVO

El presente trabajo tiene como objetivo, la revisión de los antecedentes químicos y biológicos de una planta que es muy utilizada en la actualidad: **tepezcohuite** (*Mimosa tenuiflora*), para identificar su validez farmacológica y establecer un método analítico para el control de calidad. Como resultado del estudio bibliográfico y experimental de esta planta se propondrá una monografía farmacopeica.

2. INTRODUCCION

En la terapéutica actual se presenta un fenómeno peculiar, que consiste en que un buen número de personas han decidido retomar la medicina tradicional, lo que se refleja en el desarrollo del mercado de las plantas medicinales.

La explicación del por qué se busca a la medicina tradicional, está sustentada en la premisa popularmente aceptada de que los tratamientos basados en productos de origen natural, presentan pocos efectos secundarios y que éstos son muy acentuados en la medicina ortodoxa.

Las plantas medicinales en forma de fitomedicinas, constituyen un elevado porcentaje de las ventas mundiales de medicinas, que sólo en Europa representa un valor aproximado de seis mil millones de dólares¹. Esto coloca a los países europeos como los poseedores del mayor desarrollo de fitomedicinas, como consecuencia de que estos países han desarrollado tecnologías modernas en torno a estas plantas, basadas en un amplio conocimiento tradicional y científico. Una de las principales finalidades de los estudios tecnológicos, es el establecimiento de criterios para el control de calidad de su producción.

Esta situación no tiene paralelo con la que se presenta en México y en otros países de Latinoamérica (y en general en países con menor desarrollo), en los que a pesar del amplio uso popular de las plantas medicinales, no existen bases farmacológicas y farmacéuticas adecuadas para apoyar su uso formal en el mercado de los medicamentos.

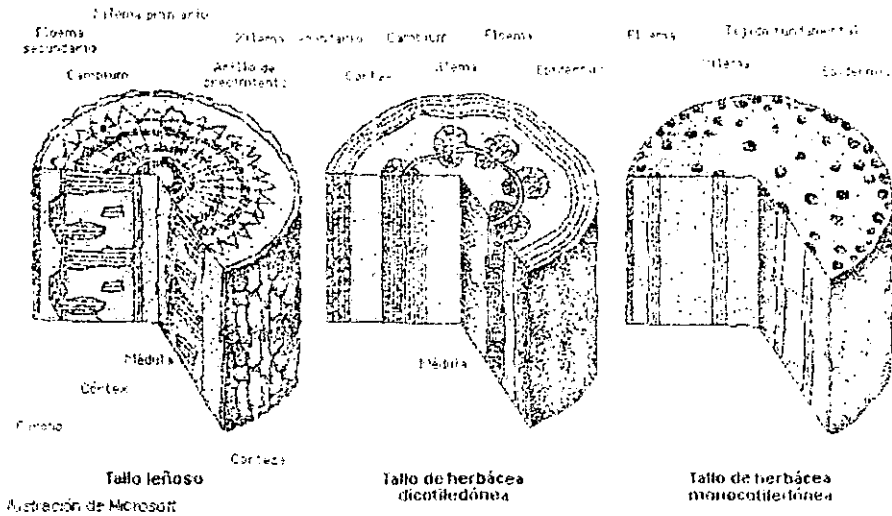
Dentro de los requisitos con que deben cumplir las plantas medicinales de origen mexicano para poder ser industrializadas en condiciones óptimas, está el contar con instrumentos oficiales que funjan como referencia de su eficacia y seguridad, además de aquellos que permitan un control analítico de la calidad de producción, generalmente descritos en las farmacopeas.

3. PARTE TEORICA

3.1 ANTECEDENTES

3.1.1 CARACTERISTICAS BOTANICAS DE LAS CORTEZAS

En lo general, la corteza es la estructura que realiza la función de tejido protector, que además tiene funciones tan definidas como la de impedir la pérdida de agua, el intercambio de gases y forma la barrera que previene daños mecánicos, así como ataques de insectos y de hongos.



La corteza es el término de uso común en árboles para denominar a todos los tejidos del tronco situados desde el área cambial hacia fuera, por lo tanto, se pueden encontrar diferentes tejidos integrando las diversas capas de una corteza. Son cuatro los componentes principales: floema secundario, tejido de expansión, tejido de proliferación y peridermis.

Se considera floema secundario al tejido completo originado por el cámbium vascular e integrado por un sistema vertical y uno horizontal; el sistema vertical posee tubos cribosos, células anexas, células parenquimales y fibras; el sistema horizontal posee células parenquimáticas organizadas en radios uni o poliseriados.

El tejido de expansión está integrado por los radios, situados en la parte media del floema secundario y conservan su propiedad de producir más tejido y así compensar la tensión producida en los tejidos exteriores por el crecimiento del cilindro xilema secundario.

El tejido de proliferación se desarrolla por la proliferación de las células de parénquima del floema conductor.

La peridermis es el tejido protector secundario que reemplaza a la epidermis y al córtex de los tallos herbáceos; puede originarse de la epidermis o de los tejidos subepidérmicos, como el parénquima o el colénquima; está normalmente constituido por tres tipos de tejidos: felógeno, felema y felodermis.

Se conoce como lenticela a un poro redondeado o elíptico, de ordinario saliente, de la corteza de los árboles.

Existe una variación importante en cuanto a la apariencia externa de la corteza entre las diferentes especies de árboles, lo cual es atribuible al crecimiento y naturaleza de la peridermis y la estructura del súber, principalmente.

3.1.2 TEPEZCOHUIITE

3.1.2.1 Generalidades

Este trabajo se ocupa del **tepezcohuite**, del náhuatl tepetl, cerro y cahuitl, árbol (*Mimosa tenuiflora* (Will) Poirét) de la familia Leguminosae. Arbusto espinoso que llega a medir alrededor de 8 metros, que presenta hojas alternas compuestas de 5 a 10 pares de pinas; presenta flores blancas en espigas que miden de 5 a 8 centímetros, así como vainas oblongas.

El tepezcohuite florece y fructifica por un período de ocho meses, a partir de noviembre, es una especie caducifolia, debido a que no presenta follaje durante los meses secos del año, es decir de diciembre a febrero.

La germinación de esta especie se da al segundo día de que se siembran las semillas, a una temperatura de entre 10° y 30°C.

Los frutos que presenta esta planta son ligeros y de textura papirácea, por la acción humana se ha dispersado ya sea por la diseminación intencional o accidental de frutos y semillas.

Esta especie se regenera con facilidad a partir de tocones o raíces; además de propagarse por el desarrollo de brotes a partir de ramas y de raíces expuestas y aún parcialmente quemadas. Se afirma el carácter oportunista y típicamente secundario de esta especie, por lo que podría ser aprovechada ecológicamente para la reforestación y regeneración de áreas perturbadas en zonas cálidas y muy cálidas, húmedas y subhúmedas, con un rango altitudinal no mayor de 1110 m.

Esta especie es un recurso natural y económico importante para la región del sureste de México, además tiene una gran importancia a nivel biológico, ya que es una especie que puede utilizarse en la recuperación de vegetación y suelo.



El tepescohuite se distribuye en México, Guatemala, Venezuela, Brasil, Colombia, El Salvador, Panamá y Honduras. En México se localiza principalmente en los estados de Oaxaca y Chiapas, desde el nivel del mar hasta los 1110 m de altitud. En Oaxaca se encuentra en la región del Istmo de Tehuantepec, y en Chiapas en la parte central y suroeste del estado.

Se desarrolla principalmente en climas cálidos y muy cálidos húmedos o subhúmedos con lluvias en verano, no obstante, puede presentarse en clima templado subhúmedo con lluvias en verano; crece en suelos diversos.

Se establece en selvas bajas caducifolias y subcaducifolias, bosques perturbados de pinos y de encinos, matorrales altos y medianos espinosos y subinermes, en ocasiones llega a formar matorrales casi puros. Se encuentra a la orilla de caminos, en terrenos de cultivos de descanso y en terrenos abandonados, así como en potreros. En los terrenos de cultivo y en los matorrales, su distribución es uniforme y en los potreros, bosques de pino, pino encino y selvas bajas, su distribución es agregada.

Muchas especies del género, entre ellas la *tenuiflora*, son favorecidas por las características adversas, es así que crecen a la orilla de los caminos y veredas, de igual manera que en las áreas taladas o quemadas.

Según Jacques Dupoy⁶, la corteza de *Mimosa tenuiflora*, conocida como Tepescohuite, ha sido utilizada desde el México prehispánico, por los mayas de sureste del país, también hace referencia a que Francisco Hernández en su libro titulado: Historia

de las plantas de la Nueva España, hace mención de esta planta durante el siglo XVII, en este libro aparece bajo el nombre de Tetlatiliztli en lengua Nahuatl (con las reservas de que se trate de la misma especie), fue muy conocida en el valle de México por los aztecas. Los nativos del valle de Cintalapa, Chiapas y de otras regiones, utilizaron la corteza de los árboles adultos molida y asada sobre las quemaduras. Actualmente se emplea la corteza de tepescohuite de esa misma manera rudimentaria, ya que ésto permite una adecuada aplicación de las propiedades de esta planta.

Esta planta fue descrita por primera vez en 1806, por Willdenow, como *Acacia tenuiflora* de Venezuela; posteriormente Poirer hizo la transferencia de esta especie al género *Mimosa* en 1810. En la actualidad una de sus denominaciones comunes es "árbol de la piel", refiriéndose a las propiedades medicinales que se le atribuyen, tales como la curación de heridas y quemaduras en la piel. El nombre actualmente aceptado es *Mimosa tenuiflora* (Will) Poirer.

La corteza de esta planta fue usada para aliviar a personas que sufrieron quemaduras en la explosión de gas natural en San Juan Ixhuatepec en 1984 y en el sismo de la ciudad de México en 1985. Según R. Anton², los resultados de estos tratamientos fueron observados por un gran número de periodistas y científicos a lo largo del mundo y consisten en un efecto analgésico que se presenta en un período de 2 a 3 horas y una completa reconstitución de la epidermis en unas pocas semanas. Según el mismo autor, la proporción de muertes provocadas por quemaduras severas fue significativamente reducida por el uso de corteza pulverizada de este árbol.

Yulin Jiang⁸ en una publicación, hace mención de que la corteza pulverizada de tepescohuite es clínicamente recomendada en tejidos quemados por las propiedades mostradas para la regeneración y cicatrización de la piel.

Esta especie es un recurso natural importante a nivel regional en México, por su uso medicinal; por otro lado, es utilizado también para la recuperación de suelos y de vegetación. Es también una fuente de madera para construcción y combustible.²⁰

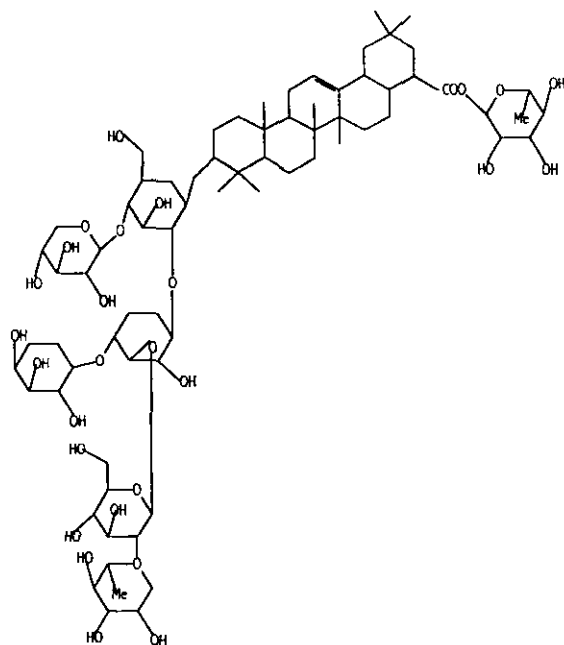
3.1.2.2 Características químicas

El uso de la corteza de esta planta ha atraído la atención de un número importante de científicos para su estudio químico, por lo que se han desarrollado una serie de investigaciones, para determinar cuáles son los compuestos químicos a los que se les pueden atribuir las propiedades medicinales de esta planta.

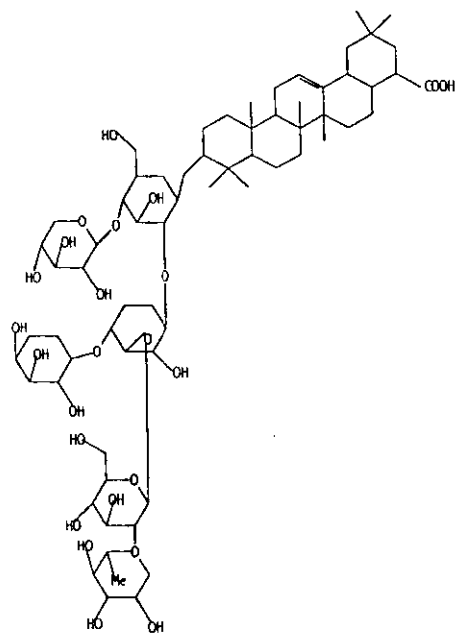
Dichas investigaciones muestran que la corteza del tepezcohuite contiene tres saponinas triterpénicas, tres saponinas esteroidales, dos metoxichalconas, una indolalquilamina, así como taninos.

a) SAPONINAS TRITERPÉNICAS

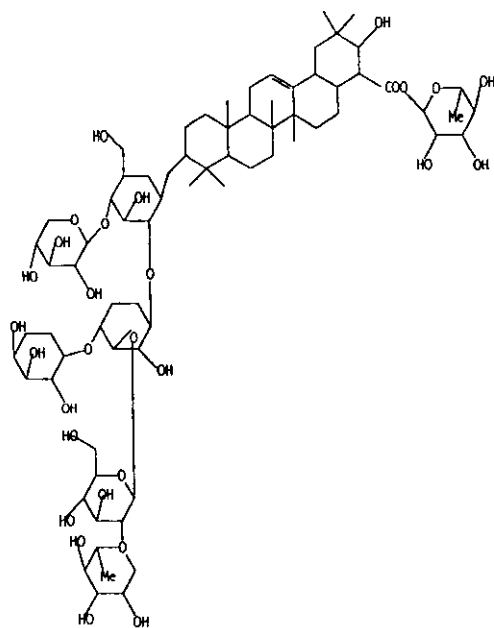
Son tres las saponinas triterpénicas que han sido identificadas en la corteza del tepezcohuite: mimósidos A, B y C; estos compuestos fueron extraídos de la corteza seca y pulverizada de *Mimosa tenuiflora*, mediante una extracción metanólica. Al extracto metanólico se le realizó una partición entre n-butanol y agua conteniendo 1% de hidróxido de sodio. El extracto butanólico fue cromatografiado en Sefadex LH20, "Lichroprep RP-8" y columnas de gel de sílice, respectivamente para obtener los mimósidos A, B y C.



1) Mimósido A



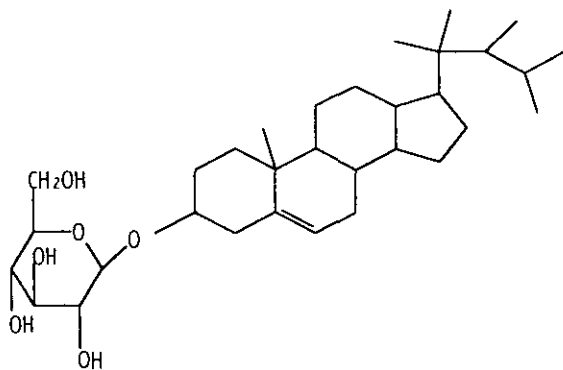
2) Mimósido B



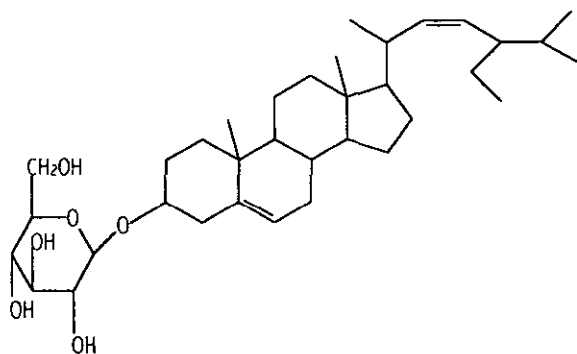
3) Mimósido C

b) SAPONINAS ESTEROIDALES

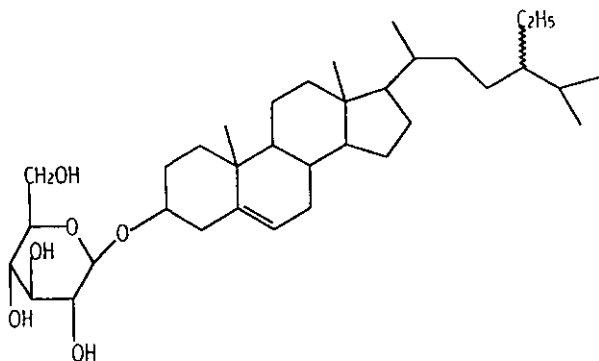
Son tres las saponinas esteroidales que han sido identificadas en la corteza del tepezcohuite, estos compuestos fueron extraídos de la corteza seca y pulverizada de *Mimosa tenuiflora*, mediante una extracción con acetato de etilo. El extracto de acetato de etilo fue sujeto a una columna de poliamida y la fracción que contenía las saponinas, fue separada mediante una columna de gel de sílice obteniendo la mezcla de 3-O- β -D-glucopiranosil campesterol, 3-O- β -D-glucopiranosil estigmasterol y 3-O- β -D-glucopiranosil β -sitosterol. La elucidación de las estructuras químicas fue hecha mediante métodos químicos, tales como hidrólisis ácida, hidrólisis básica; y técnicas espectroscópicas, tales como espectroscopia de masas, resonancia magnética nuclear protónica y de carbono 13 ; el peso molecular de las saponinas fue establecido mediante espectroscopia de masas.²



1) 3-O- β -D-glucopiranosil campesterol



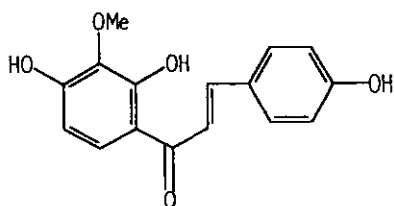
2) 3-O- β -D-glucopiranosil estigmasterol



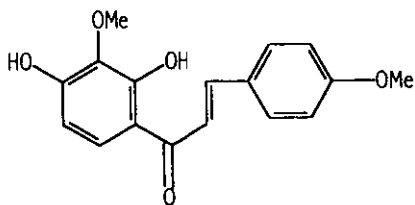
1) 3-O- β -D-glucopiranosil β -sitosterol

c) METOXICALCONAS

Dos metoxichalconas, Kukulcanina A (2',4'-dihidroxi-3',4-dimetoxichalcona) y Kukulcanina B (2',4',4-trihidroxi-3'-metoxichalcona), fueron aislados empleando técnicas cromatográficas, a partir de extractos de pequeñas ramas secas y molidas de *Mimosa tenuiflora*.



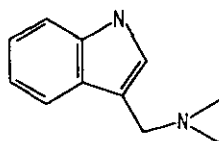
1) Kukulcanina A (2',4'-dihidroxi-3',4-dimetoxichalcona)



2) Kukulcanina B (2',4',4-trihidroxi-3'-metoxichalcona)

d) INDOLALQUILAMINAS

A partir de la corteza seca y pulverizada fueron obtenidas cinco indolalquilaminas, empleando diferentes técnicas de cromatografía en concentraciones aproximadas de 0.03% de NN-dimetiltriptamina, 0.001% de bufotenina y trazas de 5-metoxitriptamina, N-metiltriptamina y 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina. En el género *Mimosa* han sido identificados, la triptamina y N-metiltriptamina en los tallos de *Mimosa somnians*, y N,N-dimetiltriptamina en las raíces de *Mimosa hostilis* y en la corteza de *Mimosa verrucosa*.¹⁵



N,N-dimetiltriptamina

e) TANINOS

En la corteza del tepezcohuite han sido identificados taninos, compuestos complejos que, usualmente se encuentran como mezclas de polifenoles, las cuales son muy difíciles de separar y cristalizar. Estos compuestos se oxidan fácilmente y se polimerizan en solución, y si esto pasa, es mucho mayor su efecto astringente y aumenta su valor terapéutico.⁵

f) OTROS COMPUESTOS

Jacques Dupoy,⁶ a quien se debe el aislamiento del presunto principio activo de la corteza del tepezcohuite; obtuvo un polvo inodoro de color café rojizo, de sabor amargo. El proceso de extracción se inicia con la pulverización de la corteza que después se extrae con cloroformo, manteniendo una temperatura entre 50° y 70° C con el propósito de eliminar los alcaloides y otros compuestos, posteriormente se realiza una extracción sucesiva ahora con etanol, manteniendo una temperatura entre 60° y 80° C; el extracto etanólico se concentra hasta eliminar por completo el disolvente, después se coloca a reflujo en agua, a una temperatura entre 50° y 100° C, de esta manera se precipita el compuesto activo y es posible separarlo del disolvente. Para la identificación de este compuesto se realizó espectroscopía ultravioleta, infrarroja y resonancia magnética nuclear protónica y de carbono 13; sin embargo, no se propone ninguna estructura química, sólo se da el análisis estructural el cual mostró un contenido en carbono de 54-57%, en hidrógeno de 4.5-5.4% y en oxígeno de 37.5%.

3.1.2.3 Actividad biológica

Estudios farmacológicos de los extractos acuosos y etanólicos preparados con la corteza seca y pulverizada, mostraron *in vitro* una inhibición en el crecimiento de ciertos microorganismos gram-positivos, gram-negativos, levaduras y dermatofitos.¹⁴

Una evaluación experimental *in vitro* con el extracto de acetato de etilo, cuyo contenido en taninos y flavonoides es elevado, mostró actividad antimicrobiana. El extracto butanólico, rico en alcaloides, mostró una modificación importante en la excitabilidad de musculatura lisa. Los extractos butanólicos y metanólicos, cuyo contenido en saponinas es importante tienen actividad hemolítica.¹³

Una evaluación experimental *in vitro* con el extracto de acetato de etilo y con el extracto butanólico, produjo una inhibición en el crecimiento celular, que fue dependiente de la línea celular en estudio.¹¹

La valoración de la actividad biológica de una fracción rica en alcaloides, dió como resultado una inhibición del reflejo peristáltico, al ser aplicada directamente en la cámara de incubación. La intensidad del efecto, fue dependiente de la dosis, observándose el abatimiento de la respuesta a una concentración en la cámara de 40 µg/ml. El mismo efecto inhibitorio del peristaltismo, se observó al profundir intraluminalmente este producto durante periodos de 15 minutos, en disoluciones que contenían entre 100 y 300 µg/ml.¹⁵

Las saponinas triterpénicas, mimósidos A, B y C, no exhibieron ninguna actividad citotóxica, ni de proliferación sobre células de linfoma; sin embargo, presentan un efecto mitogénico sobre linfocitos normales de murino, además muestran propiedades citotrópicas sobre fibroblastos de ratón (LMTK) y sobre fibroblastos humanos.²

Es posible considerar al tepescohuite como un moderado mutagénico en ala de *Drosófila*, mediante la prueba de mancha.¹⁸

Se realizó una evaluación de los efectos cicatrizante y antimicrobiano del polvo estéril de la corteza de tepescohuite, comparándolo con el ungüento de mucopirocín al 2%, empleando como blanco solución salina al 0.9%. Este ensayo fue realizado en conejos que presentaban quemaduras químicas inducidas, con control clínico, histopatológico bacteriológico y micológico. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los efectos cicatrizante, antibacteriano y antimicótico, en los dos tratamientos.

Los taninos son sustancias capaces de convertir la piel de animal en cuero, mediante el ligamiento de proteínas para formar sustancias insolubles en agua, las cuales resisten a la acción proteolítica de enzimas. El proceso, en donde se aplica el darle vida al tejido, se conoce como acción astringente y es la razón por la cual se aplican los taninos en la terapéutica.⁵

En la corteza del tepezcohuite fue localizado un compuesto que estimula el sistema nervioso central, N,N-dimetiltriptamina.¹⁵

La corteza de *Mimosa tenuiflora* contiene un compuesto que, según Jacques Dupoy, posee propiedades regenerativas, por lo que según este autor, esta corteza es adecuada para el tratamiento de quemaduras, heridas, rozaduras, úlceras, venas varicosas, raspaduras y llagas; sin embargo, como ya se mencionó no se propone ninguna estructura química como responsable de estos procesos⁶.

3.1.2.4 Propiedades atribuidas popularmente

Actualmente se le adjudican al tepezcohuite una serie de propiedades medicinales, en padecimientos tales como: quemaduras, heridas, furúnculos, espinillas, manchas, caspa, caída de cabello, yagas y úlceras en la piel. A continuación se hace mención de algunas de las indicaciones que pueden encontrarse en productos del mercado informal. Debe hacerse notar que este tipo de indicaciones no están legalmente permitidas ya que no se refieren a síntomas sino a enfermedades definidas y no tienen ningún estudio científico que las avale:

- Las cápsulas de tepezcohuite fortalecen y protegen la mucosa gástrica, por lo que se recomiendan en úlceras gástricas, colitis y gastritis.
- El shampoo de tepezcohuite elimina todo tipo de infecciones, regenerando y fortaleciendo el cuero cabelludo; evita la caída del cabello y estimula su crecimiento, evitando la sequedad. El uso diario de este producto previene la aparición de caspa y seborrea, además de dar al cabello una apariencia brillante, sedosa, con vitalidad y muy manejable.
- El polvo de tepezcohuite es un regenerador celular natural, la sustancia activa de esta corteza regenera la epidermis, restableciendo los tejidos dañados, estimula las células acelerando el proceso de curación espontánea; tiene acción analgésica inmediata y cicatrizante a mediano plazo. Este producto es un eficaz antibiótico natural que no permite el desarrollo de microorganismos en la piel. Útil en el tratamiento de quemaduras de primero y segundo grado, cortadas, raspaduras, úlceras varicosas, infecciones, llagas y furúnculos.
- La crema de tepezcohuite con colágeno es excelente para solucionar problemas de arrugas prematuras, líneas de expresión, cutis marchito, deshidratación extrema y sobre todo para cutis áspero y agrietado. Activa la regeneración de nuevas células, rejuveneciendo la piel maltratada, eliminando las arrugas. Hidrata, suaviza y embellece el cutis, proporcionándole elasticidad y lozanía. El tepezcohuite combinado con el colágeno protege a la piel de la contaminación, rayos solares y de acciones climáticas.
- La pomada de tepezcohuite está recomendada para el tratamiento de quemaduras y heridas leves, ulceraciones, hemorroides, granos, llagas y hongos en la piel. Útil en el tratamiento de estrías y celulitis. Es efectivo en rozaduras e infecciones en la piel de los niños. Disminuye las líneas de las cicatrices. Quita las manchas y quemaduras provocadas por el sol. Auxiliar efectivo en el caso de acné, salpullido y rozaduras en bebés.
- El Jabón de tepezcohuite es útil en el tratamiento de la piel, por lo que puede usarse como jabón de tocador y para desinfectar heridas, quemaduras leves, barros, espinillas, infecciones de la piel y evita la caída del cabello, caspa y seborrea.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL Y METODOS

4.1.1 MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron cuatro muestras identificadas como 1, 2 3 y 4, proporcionadas por *Laboratorios Mixim*, las cuales fueron recolectadas en el estado de Chiapas. Las tres primeras corresponden a muestras obtenidas por los productores de Chiapas y el número corresponde al orden en que fueron recibidas, mientras que la cuarta fue obtenida de un productor independiente (sr. RR). Se trabajó con una quinta muestra, la cual fue proporcionada e identificada por el Dr. Robert Bye (Director del Instituto de Biología, UNAM), dicha muestra tiene su origen en Jiquipilas , estado de Chiapas, y pertenece al herbario de *Laboratorios Mixim*. Debido a que esta última muestra fue muy pequeña, sólo se empleó como referencia para las observaciones macroscópicas, y para la descripción de las características microscópicas.

4.1.2 MUESTREO⁷

A partir del material vegetal a analizar, se toma una muestra representativa, considerando la siguiente tabla:

TAMAÑO DEL LOTE	MUESTRA
2 a 8 unidades	3 unidades
9 a 15 unidades	5 unidades
16 a 35 unidades	8 unidades
26 a 50 unidades	13 unidades
51 a 90 unidades	20 unidades
91 a 150 unidades	32 unidades
151 a 280 unidades	50 unidades
281 a 500 unidades	80 unidades
501 a 1200 unidades	125 unidades

La primera muestra se reduce de tamaño, moliéndola.

Posteriormente se hace una reducción de volumen por cuarteo, colocando toda la muestra sobre una superficie lisa y limpia, formando un rectángulo.

Se realiza una división en cuatro partes iguales, tomando dos de las partes que se encuentran opuestas y mezclándolas entre sí, se eliminan las dos partes restantes; se repite la operación tantas veces como sea necesario hasta obtener una cantidad adecuada para los análisis correspondientes.

4.1.3 DESCRIPCION

4.1.3.1 Descripción macroscópica

La descripción macroscópica toma en consideración básicamente el tamaño, color, características superficiales y olor.

En cuanto al tamaño de esta corteza sólo se considera el espesor de la misma, y éste se determina con ayuda de una regla graduada en milímetros.

La descripción del color se hace sin ningún tratamiento de la muestra, únicamente se realiza la observación bajo la luz del día.

De las características superficiales, se consideran la fractura y textura, para lo cual se examina la muestra sin ningún tratamiento, se determina su dureza, y se dobla y se rompe para observar cómo es la apariencia de su fractura, en cuanto a la textura hay que determinar si es fibrosa, lisa, rugosa, granular, etc.

El olor se determina directamente en la corteza y se define si es aromático, frutal, herbáceo, dulce, rancio o si tiene una nota a humedad, por mencionar algunos ejemplos. Sin embargo, también es posible relacionarlo con olores de sustancias bien definidas como el mentol o el eugenol.

4.1.3.2 Descripción microscópica

4.1.3.2.1 DISOCIADOS

La técnica de disociación permite observar los elementos celulares de manera aislada.

Material:

- a) portaobjetos
- b) cubreobjetos
- c) gotero
- d) agujas de disección
- e) lámpara
- f) caja Petri
- g) microscopio óptico

Reactivos:

- a) solución Jeffrey (mezcla 1:1 de ácido crómico al 10% y ácido nítrico al 10%)
- b) gelatina glicerizada

Procedimiento:

Preparar una muestra de corteza de aproximadamente 1.5cm X 0.5cm.

Se sumerge la muestra en solución de Jeffrey por un período de 8 días, al cabo de este tiempo, se cambia la solución, y se mantiene la muestra en la solución por dos días más.

Retirar la muestra de la solución Jeffrey y enjuagar con agua destilada.

Colocar la muestra en una caja Petri que contiene agua destilada, y ayudándose con las agujas de disección disgregar la muestra hasta obtener fracciones adecuadamente pequeñas.

Colocar una gota de gelatina glicerizada sobre un portaobjetos, inmediatamente después, poner las fracciones de la muestra obtenidas en el paso anterior y cubrirlas con el cubreobjetos.

Permitir que las muestras se sequen completamente, dejándolas a temperatura ambiente durante 8 días.

Una vez que las preparaciones se encuentran completamente secas, colocar sobre el contorno del cubre objetos una capa de barniz, dejar secar a temperatura ambiente durante 2 horas y observar al microscopio.

4.1.3.2.2 PREPARACIONES SEMIPERMANENTES

Material:

- a) caja Petri
- b) estufa
- c) mechero
- d) pinzas de disección
- e) agujas de disección
- f) moldes de madera
- g) parrilla

Reactivos:

- a) parafina sólida
- b) solución GAA (glicerol/agua/alcohol 1:1:1)
- c) agua destilada
- d) solución TBA (terbutanol/alcohol) al 10, 30, 50, 60, 70, 85, 95 y 100%
- e) xilol – etanol (1:1)
- f) etanol absoluto
- g) etanol 95°
- h) etanol 70°
- i) etanol 30°
- j) agua destilada
- k) safranina
- l) verde rápido
- m) aceite de clavo

Procedimiento:

Preparar una muestra adecuada de la corteza de aproximadamente 1.5cm X 0.5cm.

- **Ablandamiento:**

La muestra se deja sumergida en una solución GAA durante un periodo de 10 días, con la finalidad de obtener el tejido ablandado e íntegro.

- **Deshidratación:**

Una vez que se tiene la muestra ablandada, se lava con agua y se coloca en soluciones de TBA al 10, 30, 50, 60, 70, 85, 95 y 100% durante un periodo de 48 horas en cada una, en esta última solución se coloca por dos periodos más de 48 horas cada uno.

- Inclusión de la muestra en parafina:

Una vez que la muestra se encuentra en la solución TBA al 100% (último cambio), adicionar una pequeña cantidad de parafina sólida, después colocar la muestra en la estufa a una temperatura de 68°-70°C; cada hora, hacer una nueva adición, hasta completar un volumen total de parafina sólida igual al volumen inicial que se tenía con la solución de TBA al 100%.

Realizar un cambio de la mezcla de TBA-parafina a parafina líquida (a una temperatura de 68°-70 °C). Mantener la muestra en parafina por un periodo de 24 h, a la temperatura ya mencionada.

Sobre una parrilla, colocar un recipiente conteniendo parafina líquida, en la misma parrilla colocar el frasco que, contiene la muestra sumergida en parafina, procurando mantener la temperatura de 68°-70°C.

Sobre los moldes de madera verter parafina líquida y adicionar las muestras.

Etiquetar y mantener a temperatura ambiente por un periodo de 15 minutos .

Colocar en refrigeración a una temperatura entre 0 y -5°C, durante 30 minutos.

Retirar el molde del bloque de parafina y dejar el bloque en refrigeración por 24 h.

Eliminar el exceso de parafina y adherir el bloque de parafina a una base de madera.

Dejar el bloque adherido a la madera por dos horas en refrigeración.

- Corte en microtomo:

Sujetar la muestra incluida en parafina por la parte de la base de madera, empleando la navaja del número 7 proceder a realizar los cortes en forma transversal.

- Fijación de las muestras:

Una vez que se tienen los cortes, se colocan en un recipiente con agua a una temperatura aproximada de 60°C, la cual contiene una pequeña cantidad de grenetina.

Sacar los cortes del agua, colocarlos sobre un portaobjetos, y dejar secar a temperatura ambiente durante 24 h.

- Rehidratación:

Colocar las muestras durante 15 minutos en la estufa (56°-60°C).

Sumergir durante 5 minutos en xilol, posteriormente realizar un cambio de xilol, y dejar por otros 5 minutos la muestra en este reactivo.

Pasar las muestras por la siguiente serie de mezclas de disolventes, dejándolas sumergidas durante 10 minutos en cada una:

- a) xilol – etanol (1:1)
- b) etanol absoluto
- c) etanol 95°
- d) etanol 70°
- e) etanol 30°
- f) agua destilada

- Tinción:

Las muestras se tiñen con safranina durante un período de 15 minutos.

Se lava el exceso de colorante con agua destilada.

Las muestras se deshidratan con alcoholes de 30°, 50°, 70°, 95° y absoluto. Se realiza con cada uno un solo cambio de 1 minuto.

Se tiñen las muestras con verde rápido durante un período de 15 minutos.

El exceso de colorante se lava con alcohol absoluto.

Con aceite de clavo y por un período de 5 minutos se aclaran las muestras.

Se realizan tres cambios de xilol en periodos de 1 minuto cada uno.

Las muestras se dejan secar durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se limpian y se rotulan.

4.1.4 ENSAYOS DE IDENTIDAD

4.1.4.1 Cromatografía en capa fina

4.1.4.1.1 PROCEDIMIENTO I

Material:

- a) matraz de bola de 250 ml
- b) refrigerante recto
- c) agitador magnético
- d) parrilla eléctrica con agitación
- e) soporte universal
- f) pinza de tres dedos con nuez
- g) baño María
- h) rotovaporador
- i) placa para cromatografía en capa fina, gel de sílice 60, 5cm x 2cm
- j) cámara de elución
- k) aspesor
- l) microjeringa
- m) papel filtro (para filtración rápida)
- n) embudo tallo largo
- o) espátula metálica

Reactivos:

- a) 25 ml cloroformo R.A.
- b) medio de elución A: (CHCl₃ / MeOH 9:1)
- c) agente revelador A: (ácido sulfúrico al 5% en etanol)

Material biológico:

- a) 1 g de la corteza seca y pulverizada

Procedimiento:

Colocar 1 gramo del material vegetal en un matraz de bola, adicionar 20 ml de cloroformo y colocarlo a reflujo con agitación, controlando el calentamiento por medio del baño María, durante un período de 30 minutos.

Inmediatamente después, filtrar la mezcla y concentrar hasta obtener un volumen de 5 ml. Del concentrado tomar 5 µL y aplicar en banda sobre la placa cromatográfica; eluir la placa cromatográfica con el medio de elución A, permitir que se evapore por completo el medio de elución; revelar por aspersión del agente revelador A. Posteriormente realizar un calentamiento sobre la parrilla, iniciar con una baja temperatura e ir aumentando gradualmente hasta obtener las bandas en la placa.

4.1.4.1.2 PROCEDIENDO 2

Material:

- a) matraz de bola de 250 ml
- b) refrigerante recto
- c) agitador magnético
- d) parrilla eléctrica con agitación
- e) soporte universal
- f) pinzas de tres dedos con nuez
- g) baño María
- h) rotaevaporador
- i) placa para cromatografía en capa fina, gel de sílice 60, 5 cm x 2 cm
- j) cámara de elución
- k) aspersor
- l) microjeringa
- m) papel filtro (filtración rápida)
- n) embudo tallo largo
- o) embudo de separación
- p) espátula metálica

Reactivos:

- a) EtOH al 90%
- b) medio elución B: (n-butanol/ac acético/agua 50:10:40)
- c) agente revelador B: (anisaldehido/ac acético/metanol/ac sulfúrico 0.5:10:85:5)
- d) butanol R.A.
- e) agua destilada

Material biológico:

2 g de la corteza seca y pulverizada

Procedimiento:

Colocar 2 g del material vegetal en el matraz de bola, adicionar 20 ml de etanol sometiendo la mezcla a reflujo con agitación constante, controlando el calentamiento por medio del baño María, durante un periodo de 30 minutos. Filtrar la mezcla a través del papel filtro. Evaporar el filtrado hasta obtener un volumen de 5ml, aplicar 5 µl de esta disolución en la placa cromatográfica, eluir la placa cromatográfica con el medio de elución B, permitir que se evapore por completo el medio de elución y revelarla por aspersión del agente revelador B. Posteriormente realizar un calentamiento sobre la parrilla, iniciar con una baja temperatura e ir aumentando gradualmente hasta obtener las bandas en la placa.

4.1.4.2 Espectroscopía en ultravioleta-visible

4.1.4.2.1 PROCEDIMIENTO 1

Material:

- a) balanza
- b) matraz de bola
- c) probeta
- d) refrigerante
- e) agitador magnético
- f) parrilla con agitación
- g) embudo de tallo largo
- h) matraz erlenmeyer
- i) papel filtro Whatman del no. 4
- j) espectrofotómetro uv-vis
- k) celdas de cuarzo
- l) baño María

Material biológico:

1 gramo de la corteza seca y pulveriza

Reactivos:

etanol al 96%

Procedimiento:

Colocar 1 gramo del material vegetal en un matraz de bola, adicionar 20 ml de etanol y colocarlo a reflujo con agitación, controlando el calentamiento por medio del baño María, durante un periodo de 30 minutos. Filtrar la mezcla y concentrar hasta obtener un volumen de 10 ml; determinar la espectroscopía uv-vis (190nm-800nm), usando etanol como blanco de referencia.

4.1.4.2.2 PROCEDIMIENTO 2

Material:

- a) balanza
- b) matraz de bola
- c) probeta
- d) refrigerante
- e) agitador magnético
- f) parrilla con agitación
- g) embudo de tallo largo
- h) matraz erlenmeyer
- i) papel filtro Whatman del no. 4
- j) espectrofotómetro uv-vis
- k) celdas de cuarzo
- l) baño María

Reactivos:

cloroformo R.A.

Material biológico:

1 gramo de la corteza seca y pulveriza

Procedimiento:

Colocar 1 gramo del material vegetal en un matraz de bola, adicionar 20 ml de cloroformo y colocarlo a reflujo con agitación, controlando el calentamiento por medio del baño María, durante un periodo de 30 minutos. . Filtrar la mezcla y concentrar hasta obtener un volumen de 10 ml; determinar la espectroscopia uv-vis (190nm-800nm), usando cloroformo como blanco de referencia.

4.1.5 ENSAYOS

7

4.1.5.1 Pérdida al secado

Material:

- a) cápsula de vidrio
- b) estufa
- c) balanza analítica
- d) desecador
- e) espátula metálica

Material biológico:

1 gramo de material vegetal (pulverizado)

Procedimiento:

Colocar la cápsula vacía en la estufa por un período aproximado de 2 horas a 105°C ($\pm 5^\circ\text{C}$) y posteriormente introducir en el desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente. Pesar la cápsula vacía con exactitud.

Pesar con exactitud una muestra de aproximadamente 1 gramo en la cápsula.

Colocar la cápsula en la estufa por un período de 3 horas a una temperatura de 105°C ($\pm 5^\circ\text{C}$).

Enfriar la muestra en el desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente, y registrar el peso final.

La determinación se realizó por quintuplicado para cada muestra.

Cálculos:

$$[(C_2 - C_3) / (C_2 - C_1)] \times 100 = \% \text{ Pérdida al secado}$$

En donde C_1 = peso de la cápsula vacía, C_2 = peso de la cápsula con muestra y C_3 = peso final de la cápsula con la muestra, después del secado.

4.1.5.2 Cenizas totales⁷

Material:

- a) crisol
- b) desecador
- c) balanza analítica
- d) mufla
- e) parrilla eléctrica
- f) agitador de vidrio
- g) espátula metálica

Material biológico:

1 gramo de material vegetal pulverizado y seco.

Procedimiento:

Colocar un crisol colocándolo en la mufla a $600^{\circ}\text{C}(\pm 5^{\circ}\text{C})$ durante 30 minutos, posteriormente dejarlo enfriar en desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente. Pesar el crisol.

Pesar con exactitud una cantidad de aproximadamente 1 gramo de la muestra seca y pulverizada.

En campana extractora, con ayuda de la parrilla eléctrica preincinerar la muestra (tener mucho cuidado de no perder material a lo largo del proceso).

Proceder a realizar la incineración de la muestra a una temperatura de $600^{\circ}\text{C}(\pm 5^{\circ}\text{C})$, considerando como punto final, cuando el residuo se encuentre libre de carbón, es decir hasta obtener cenizas blancas o casi blancas.

Transferir el crisol a un desecador, hasta alcanzar la temperatura ambiente. Obtener el peso de las cenizas.

La determinación se realizó por quintuplicado para cada muestra.

Cálculos:

$$[(C_3 - C_1) / (C_2 - C_1)] \times 100 = \% \text{ cenizas totales}$$

En donde C_1 = peso del crisol vacío, C_2 = peso del crisol con la muestra y C_3 = peso del crisol después del tratamiento de la muestra.

4.1.5.3 Cenizas insolubles en ácido⁷

Material:

- a) crisol
- b) vidrio de reloj
- c) parrilla eléctrica
- d) papel filtro libre de cenizas
- e) papel pH
- f) mufla
- g) embudo de tallo largo

Reactivos:

- a) 25 mL HCl 3N
- b) agua destilada

Material biológico:

Residuos de la prueba de cenizas totales

Procedimiento:

Partir del residuo obtenido en la prueba de cenizas totales.

Adicionar 25 mL de HCl 3N al residuo obtenido en la prueba de cenizas totales contenido en el crisol, cubrirlo con un vidrio de reloj y realizar un calentamiento a ebullición suave durante 5 minutos.

Realizar la filtración a través de un papel filtro libre de cenizas.

Se efectúan varios lavados al residuo hasta conseguir que el filtrado sea neutro al papel pH.

Colocar el papel filtro que contiene el residuo en el crisol.

En campana extractora, incinerar el papel filtro con ayuda de la parrilla cuidando de que no se inflame, posteriormente introducir el crisol a la mufla a una temperatura de 600°C(±5°C) por aproximadamente 2 horas, hasta conseguir peso constante. Por último determinar el peso final.

La determinación se realizó por quintuplicado para cada muestra.

Cálculos:

$$[(C_3 - C_1) / (C_2 - C_1)] \times 100 = \% \text{ Cenizas insolubles en ácido}$$

En donde C_1 = peso del crisol vacío, C_2 = peso crisol con muestra y C_3 = peso del crisol después del tratamiento

Nota: En el caso de emplear papel filtro que contenga cenizas realizar la corrección correspondiente.

4.1.6 VALORACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS

4.1.6.1 Cuantificación de taninos²²

4.1.6.1.1 CURVA PATRON

Material:

- a) matraces aforados de 100 ml.
- b) bureta de 25 ml
- c) pipeta de 5 ml
- d) pipeta de 10 ml
- e) espectrofotómetro
- f) celdas de cuarzo

Reactivos:

a) reactivo de Folin-Denis: A 750 ml de agua destilada, adicionar 100 g de tungstato de sodio dihidratado, 20 g de ácido fosfomolibdico y 50 ml de ácido fosfórico, colocar en un sistema de reflujo por un período de 2 horas, enfriar y aforar a 1000 ml.

b) solución saturada de carbonato de sodio: Solución al 35% (m/v) de carbonato de sodio anhidro; esta solución debe permanecer protegida de la luz, en caso de que se precipite, filtrar.

c) solución estándar de ácido tánico: Disolver 100 mg de ácido tánico en 1000 ml de agua destilada, se deberá preparar el mismo día que va a ser utilizada.

Procedimiento:

Transferir con ayuda de una bureta, alícuotas de 0 ml, 1.0 ml, 2.0 ml, 3.0 ml, 4.0 ml, 5.0 ml, 6.0 ml, 7.0 ml, 9.0 ml y 10.0 ml de la solución estándar de ácido tánico a matraces volumétricos de 100 ml, que contengan 75 ml de agua destilada. Añadir 5 ml del reactivo de Folin-Denis, después 10 ml de la solución saturada de carbonato de sodio, diluir a 100 ml con agua. Mezclar y determinar la absorbancia a 760 nm después de 30 minutos, (durante el período de 30 minutos protéjase la reacción de la luz).

Trazar la gráfica y calcular r y r^2 .

4.1.5.1.2 APLICACION DE LA TECNICA EN EL MATERIAL VEGETAL

Material:

- a) matraz aforado de 100 ml
- b) matraz aforado de 250 ml
- c) pipeta volumétrica de 1ml
- d) pipeta de 5ml
- e) pipeta de 10ml
- f) parrilla eléctrica
- g) agitador magnético
- h) balanza analítica
- i) espectrofotómetro
- j) celdas de 1 cm de cuarzo

Reactivos:

- a) solución saturada de carbonato de sodio
- b) reactivo de de Folin-Denis
- c) agua destilada

Material biológico:

0.75 g de material vegetal molido

Procedimiento:

Colocar aproximadamente 0.75 g del material vegetal molido pesado con exactitud en el matraz de bola, adicionar 150 ml de agua destilada, calentar a reflujo por 30 minutos.

Decantar la mezcla anterior, recuperar el líquido, transfiriéndolo a un matraz volumétrico de 250 ml, lavar el residuo con agua destilada, reuniendo los lavados en el matraz volumétrico. Aforar a 250 ml con agua. Filtrar el líquido obtenido, eliminando los primeros 50 ml.

Del filtrado obtenido, transferir 1.0 ml a un matraz volumétrico de 100 ml, que contenga 75 ml de agua destilada, añadir 5 ml del reactivo de Folin-Denis, después 10 ml de la solución saturada de carbonato de sodio y aforar con agua. Mezclar y determinar la absorbancia después de 30 minutos a 760 nm (durante el período de 30 minutos proteger la reacción de la luz).

Cálculos:

$$\% \text{ Taninos} = \frac{(x) (250\text{mL}) (1\text{g}) (100) [100/(100-h)]}{(1\text{mL}) (1000\text{mg}) (z)}$$

x = concentración extrapolada de la curva patrón mg/ml; z = peso de la muestra expresado en g ; h = pérdida por secado

4.1.7 EXTRACCION Y SEPARACION DE COMPONENTES QUÍMICOS

Material

- a) equipo Soxhlet
- b) papel filtro
- c) embudo de tallo largo
- d) columna cromatográfica
- e) placas para cromatografía en capa fina de gel de sílice
- f) placas cromatográfica preparativa, gel de sílice

Reactivos

- a) cloroformo R.A.
- b) metanol R.A.
- c) agua destilada
- d) gel de sílice

4.1.7.1 Extracción

Se colocaron 20.0 g de la corteza molida en un equipo Soxhlet durante un periodo de cuatro horas, empleando como disolvente 150 ml de cloroformo.

Transcurrido este lapso de tiempo, se separó el material extraído del disolvente, por filtración, el material vegetal se secó, hasta eliminar completamente el disolvente.

El material seco se extrajo de nuevo en el equipo Soxhlet en forma exhaustiva con 300 ml de metanol. Con este disolvente, se observó una mayor extracción. La extracción con metanol se prolongó por dieciseis horas. Tanto el extracto clorofórmico como el extracto metanólico se concentraron hasta eliminar por completo el disolvente, recuperando ambos disolventes. Se continuó trabajando sólo con el extracto metanólico.

4.1.7.2 Fraccionamiento del extracto

El extracto metanólico se sometió a un reflujo con 125 mL de agua, durante un periodo de ocho horas, posteriormente se efectuó una separación del extracto metanólico que es soluble en agua del que no lo es, por filtración.

Se corrió una columna cromatográfica con el extracto metanólico insoluble en agua, colocando 2.4697 g del extracto metanólico y 20 g de gel de sílice; obteniéndose las siguientes fracciones con los correspondientes medios de elución:

FRACCIONES	ELUYENTE
1-4	Cloroformo/ Acetona 7:3
5	Cloroformo/ Acetona 6:4
6	Cloroformo/ Acetona 4:6
7-28	Cloroformo/ Acetona 2:8
29	Acetona
30-36	Acetona/ Etanol 8:2
37-38	Acetona/ Etanol 7:3

Se les dió seguimiento a todas las fracciones mediante cromatografía en capa fina.

4.1.7.3 Separación de constituyentes

Las fracciones 22 a 38 reunidas (1.0523 g) del procedimiento anterior se cromatografiaron en 20 g de gel de sílice, obteniéndose las siguientes fracciones con los correspondientes medios de elución:

FRACCIONES	ELUYENTES
1-14	Cloroformo
15-25	Cloroformo / Acetona 8:2
26-27	Cloroformo / Acetona 7:3
28-38	Cloroformo / Acetona 6:4
39-48	Cloroformo / Acetona 5:5
49-60	Cloroformo / Acetona 4:6

Se les dió seguimiento a todas las fracciones mediante cromatografía en capa fina.

4.1.7.4 Purificación

Las fracciones 10-15 y 54 de la tabla anterior fueron seleccionadas para purificarse, debido a que al cromatografiarlas en capa fina, presentaban perfiles adecuados para ello; para ambos casos, la fase móvil en donde se resolvían mejor fue cloroformo/acetona/metanol/agua 3:2:3:0.1, obteniéndose Rfs de 0.84 y 0.63 respectivamente, además, al realizar espectroscopias en uv-vis de estas fracciones, se encontraron máximos similares, por esta razón se realizó la purificación de estas dos fracciones.

Ambas fracciones se purificaron mediante una placa cromatográfica preparativa, colocando 100 miligramos de muestra en la placa cromatográfica y utilizando un sistema de elución cloroformo/acetona/metanol/agua 3:2:3:0.1.

4.1.8 ANALISIS MICROBIOLÓGICO

Material

- a) autoclave
- b) estufa
- c) campana de flujo laminar
- d) asa microbiológica
- e) pipetas de 10 ml
- f) cajas petri
- g) balanza
- h) matraces erlenmeyer
- i) probetas de 100 ml

Reactivos

- a) caldo lactosado
- b) caldo Mossel
- c) agar bilis rojo violeta con glucosa y lactosa
- d) agar Levine azul de metileno
- e) agar Mac Conkey
- f) agar cetrimida
- g) agar pseudomonas P
- h) agar pseudomonas F
- i) caldo soya tripticaseína
- j) agar dextrosa Sabouraud

Material biológico

Corteza seca y pulverizada

4.1.8.1 Preparación de la muestra

- a) A 10 g de la corteza, agregar caldo lactosado, hasta obtener un volumen de 100 ml.
- b) Homogenizar la suspensión mecánicamente.

4.1.8.2 Enterobacterias y algunas otras bacterias gram-negativas

DETECCION

- a) Homogenizar la muestra preparada en 4.1.8.1 e incubar a una temperatura de 30°-37°C, por un periodo de 2-5 h.
- b) Inocular el material homogenizado, en placa que contenga el medio de agar bilis rojo violeta con glucosa y lactosa, incubar a 35°-37°C, por 18-48 h.

EVALUACION CUANTITATIVA

- a) Inocular una cantidad adecuada de caldo-Mossel enriquecido para Enterobacteriaceae con cantidaes del material homogenizado preparado como se describe en el párrafo anterior, realizar las diluciones adecuadas para que contengan 1.0 g, 0.1 g, 10 mg , 1.0 mg y 0.1 mg del material que está siendo examinadio, incubar a 35°-37°C, por 24-48 horas.
- b) Realizar un subcultivo en un medio de agar bilis rojo violeta con glucosa y lactosa, incubar a 35°-37°C, por 18-24 horas.

Determinar según la siguiente tabla el número más probable de bacterias.

Resultado para cada cantidad					Numero más probable de bacterias por gramo
1.0 g	0.1 g	10 mg	1.0 mg	0.1 mg	
+	+	+	+	+	Más de 10^4
+	+	+	+	-	Más de 10^3 y menos de 10^4
+	+	+	-	-	Más de 10^2 y menos de 10^3
+	+	-	-	-	Más de 10 y menos de 10^2
+	-	-	-	-	Más de 1 y menos de 10
-	-	-	-	-	Menos de 1

4.1.8.3 Escherichia coli

- a) Homogenizar la muestra preparada en 4.1.8.1 e incubar a una temperatura de 30°-37°C, por un periodo de 2-5 h.
- b) Aislar resembrando por estria cruzada el medio agar Levine azul de metileno o agar Mac Conkey , incubar a 43°-45 °C por 18 –24 h.

4.1.8.4 Pseudomonas aeruginosa

- a) Homogenizar la muestra preparada en 4.1.8.1 e incubar a una temperatura de 30°-37°C, por un periodo de 24-48 h.
- b) Tomar una asada del cultivo anterior y sembrar por estria cruzada en medio agar cetrimida a 35°-37°C por 24-48 h.
- c) En caso de que en el medio agar cetrimida de positiva la prueba, inocular en los medios agar Pseudomonas F y agar Pseudomonas P, incubar a 35° ± 2°C durante 72 h.

4.1.8.5 Mesófilos aerobios

- a) Colocar 12 tubos conteniendo 9 ml del medio caldo soya tripticaseína, en 4 hileras de tres tubos cada una.
- b) Inocular 1 ml de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} en cada una de las tres primeras hileras de tubos.
- c) La cuarta hilera es testigo
- d) Agitar los tubos e incubar a 35°C(± 2°C) durante 48 h.
- e) Una vez transcurrido el período de incubación, registrar el número de tubos de cada dilución con turbiedad debida al crecimiento microbiano. Reportar el número más probable de organismos por gramo del producto, utilizando la tabla 23 (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, sexta edición, pag. 194).

4.1.8.6 Hongos filamentosos y levaduras

- a) Homogenizar la muestra preparada en 4.1.8.1 e incubar a una temperatura de 30°-37°C, por un periodo de 24-48 h.
- a) A partir de la muestra incubada en el paso anterior, realizar dos diluciones consecutivas: tomar 1 ml y llevarlo a 10 ml con caldo lactosado, a partir de esta última, tomar 1 ml y llevarlo a 10 ml con caldo lactosado.
- b) Inocular por duplicado 1 ml de cada una de las tres diluciones efectuadas en cajas de petri, las cuales contienen 20 ml del medio agar dextrosa Sabouraud, esterilizado y mantenido en baño de agua a una temperatura aproximada entre 45° – 48°C. Realizar movimientos suaves rotatorios, mezclando la alicuota de la muestra en el medio de cultivo, sin derramar el líquido; después permitir que el medio de cultivo solidifique.
- c) Incubar las placas en posición invertida a 22.5° C(± 2.5° C), durante 5 a 7 días.

5. RESULTADOS

5.1 Descripción (4.1.3)

5.1.1 Descripción macroscópica (4.1.3.1)

La corteza es de apariencia escamosa (su aspecto es el de un mosaico o retículo integrado por escamas o piezas que se separan con facilidad de la superficie) por la presencia de abundantes lenticelas grandes y alargadas hasta de 5 mm de largo agrupadas en líneas transversales, presenta un color de café rojizo a grisáceo, con amplias fisuras longitudinales y superficiales de textura fibrosa. Sabor resinoso y astringente, de olor resinoso y dulce; se considera una corteza de delgada a mediana, mostrando un grosor de entre 3.2 y 10 mm.



Fig 1. Corteza de *Mimosa tenuiflora*

5.1.2 Descripción microscópica (4.1.3.2)

La corteza de *Mimosa tenuiflora* está integrada por peridermis, córtex, floema, radios floemáticos, además de contenidos celulares.

PERIDERMIS O CORTEZA EXTERNA

La peridermis esta compuesta de felema o súber, felógeno y felodermis.

- a) Felema o súber: Está integrado por dos tipos de células, macrosclereidas y células suberizadas.
 - Las macrosclereidas son de forma rectangular, con paredes engrosadas fuertemente lignificadas, algunas con amplio y otras con reducido lumen celular, con su eje longitudinal paralelo a la superficie del tallo y en dirección tangencial. Organizadas en paquetes independientes de 10 a 20 células cada paquete.
 - La mayor parte del súber lo componen varios estratos de células de paredes ligeramente engrosadas y suberizadas, estas células tienen forma rectangular y una orientación tangencial.
- b) Felógeno: El felógeno se encuentra de manera evidente, con activa división celular y con nueve estratos celulares, las células son rectangulares de paredes delgadas con rebordes angulares (y núcleos evidentes) organizadas en hileras perpendiculares a la superficie.
- c) Felodermis: Con dos estratos celulares, poco evidentes.

CORTEZ

El córtex es inconspicuo, sólo se presentan restos de grupos de macrosclereidas con paredes fuertemente lignificadas, se trata de un córtex obliterado.

FLOEMA

El floema es un tejido complejo de tipo acumulativo, organizado en forma de cúpula.

- a) Floema primario: El floema primario se encuentra presente en la cúspide de las cúpulas, constituido por bandas de tejido blando y por bandas de tejido duro.

- El tejido blando contiene de dos a tres estratos de grandes células parenquimáticas, además de células cribosas y acompañantes obliteradas.
- Las bandas de tejidos duro están formadas por paquetes de pequeñas fibras libriformes septadas de paredes engrosadas de celulosa, y lumen celular reducido.

b) Floema secundario: El floema secundario se encuentra próximo al cambium vascular, en él, la proporción del tejido blando es varias veces mayor a la del tejido duro; no contiene elementos obliterados, es decir son visibles las células cribosas y las células acompañantes como elementos de conducción., además de grandes células parenquimáticas. Como parte del tejido duro, se observan el mismo tipo de paquetes de fibras que se observan en el floema primario.

RADIOS FLOEMATICOS

Los radios floemáticos se encuentran ubicados entre las cúpulas del tejido floemático. Hacia el cambium vascular los radios son muy estrechos, mientras que cerca de la peridermis éstos son muy anchos; las células de los radios son de forma rectangular a cuadrada con su eje longitudinal en dirección tangencial, de paredes delgadas y abundantes contenidos celulares. En esta zona de los radios se observan algunas células de esclerénquima.

CONTENIDOS CELULARES

Se observa abundante contenido de almidón, tanto en las células parenquimáticas de los radios como en las células parenquimáticas del floema.

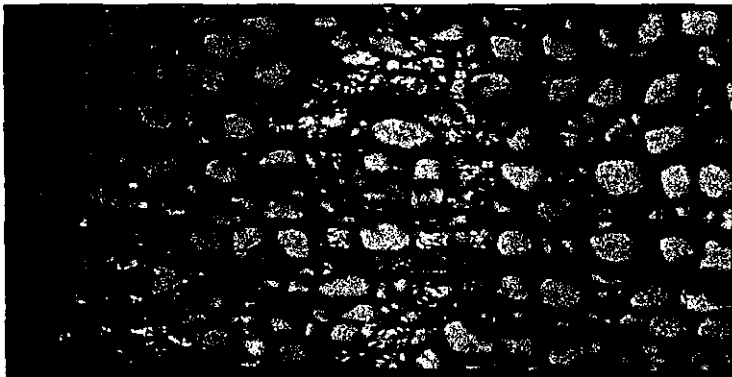


Fig 2. Corte transversal de la corteza de Mimosa tenuiflora

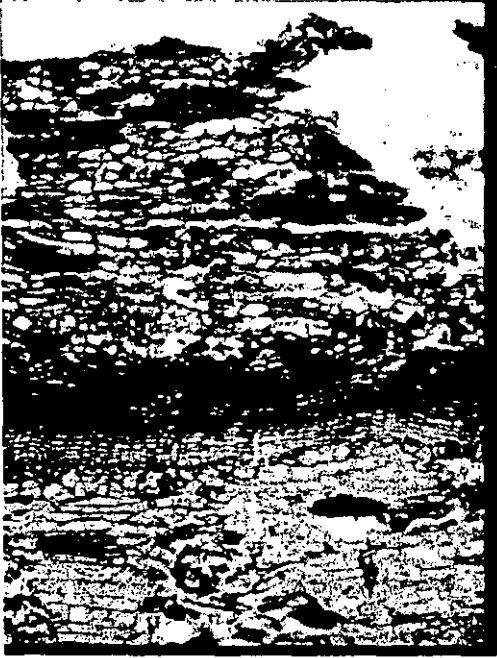


Fig. 3. Corte transversal de la corteza de *Mimosa tenuiflora*

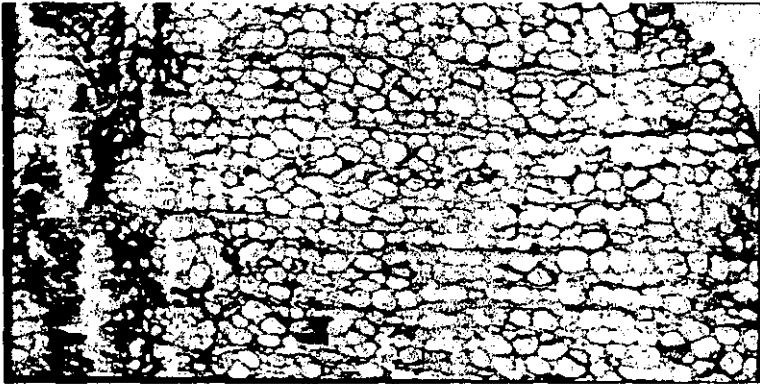


Fig 4. Corte transversal de la corteza de *Mimosa tenuiflora*

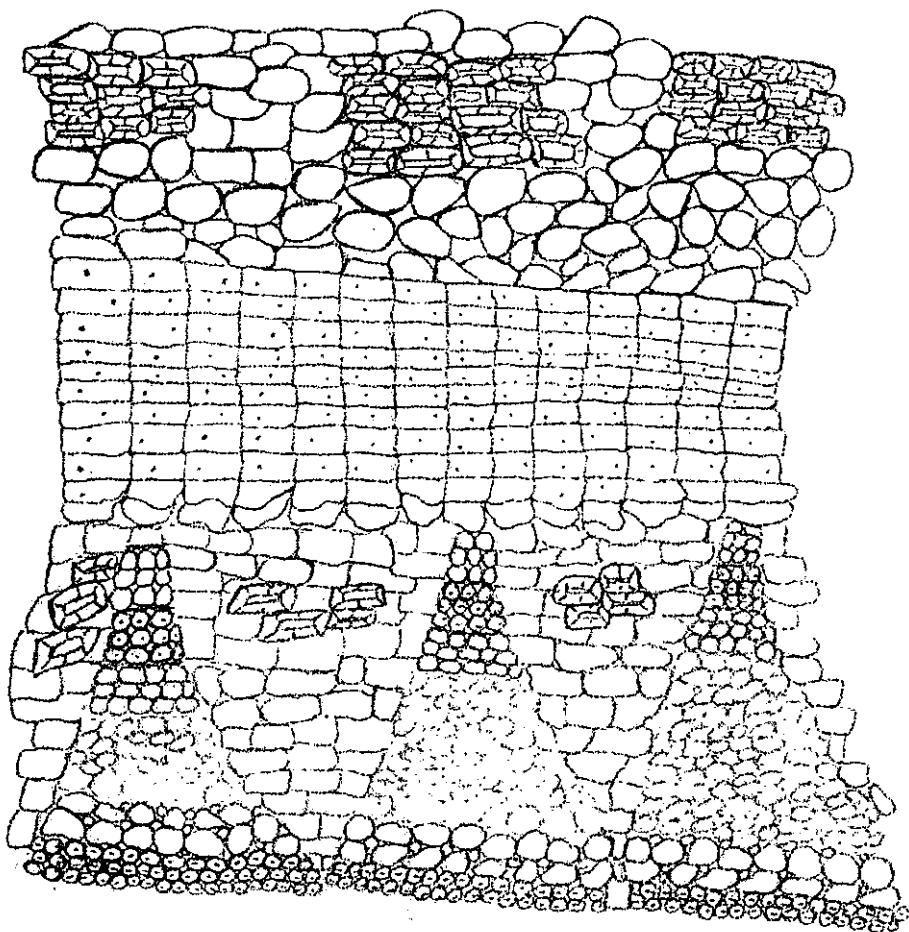


Fig 5. Esquema de la corteza de *Mimosa tenuiflora*

5.2 Ensayos de identidad (4.1.4)

5.2.1 Cromatografía en capa fina (4.1.4.1)

En las placas cromatográficas del procedimiento 1, las cuatro muestras analizadas exhiben dos bandas cuyos Rf's son de aproximadamente 0.45 y 0.87. Estos valores se muestran en la tabla no. 1.

En las placas cromatográficas del procedimiento 2 con las cuatro muestras analizadas exhiben tres bandas cuyos Rf's son de aproximadamente 0.11, 0.32 y 0.53. Estos valores se muestran en la tabla no. 2.

5.2.2 Espectroscopía en ultravioleta-visible (4.1.4.2)

Las espectroscopías uv-vis del procedimiento 1 con las cuatro muestras analizadas, exhiben dos máximos: a 221 nm y a 282 nm, como se puede observar en las figuras 6,7,8 y 9.

Las espectroscopías uv-vis del procedimiento 2, con las cuatro muestras analizadas exhiben tres máximos: a 246 nm, a 274 nm y a 320 nm, como se puede observar en las figuras 10, 11, 12 y 13.

5.3 Ensayos (4.1.5)

5.3.1 Pérdida al secado (4.1.5.1)

En los resultados de la pérdida al secado de las cuatro muestras analizadas encontramos valores desde 7.5% hasta 10.4% con un promedio de 9.1%, esto se puede observar en las tablas 3 a la 7 y en las figuras 14 a la 18.

5.3.2 Cenizas totales (4.1.5.2)

Los valores para cenizas totales en las cuatro muestras analizadas varían desde 1.4% hasta 5.6% con un promedio de 2.6%, como se muestra en las tablas 8 a la 12 y en las figuras 19 a la 23.

5.3.3 Cenizas insolubles en ácido (4.1.5.3)

Los valores para cenizas insolubles en ácido en las cuatro muestras analizadas van desde 0.2% hasta 0.4%, con un promedio de 0.3%, esto se puede observar en las tablas 13 a la 17 y en las figuras de la 24 a la 28.

5.4 Valoración de principios activos (4.1.6)

5.4.1 Cuantificación de taninos (4.1.6.1)

En la cuantificación de taninos (muestra base seca), se encuentran valores que van desde 4.9% hasta 18.0% con un promedio de 13.0%, lo cual se puede observar en las tablas 18 a la 23 y en las figuras 29 a la 34.

5.5 Extracción y separación de componentes químicos (4.1.7)

Se intentó obtener componentes químicos en forma aislada a través de la metodología ya descrita, sin embargo, en los primeros intentos se obtuvieron mezclas, probablemente de glucósidos esterólicos y terpénicos que tienen las siguientes constantes físicas.

De la fracción 10-15 se obtuvo un polvo rojo, que no funde a 300°C. El espectro en UV-Vis (figura 35) exhibe dos máximos, uno en 221 nm y el otro en 282 nm. El espectro en IR (figura 37) exhibe bandas en: 2992, 2851 y en 1457 correspondientes a enlaces C-H, pero al no aparecer la banda doble en 1380 indica que sólo se trata de grupos metileno. La banda en 1454 sugiere la presencia de ciclohexano; la ausencia de señales entre 3000 y 3100 indica que no hay aromáticos. La banda en 3373 indica la presencia de grupos OH, en estructuras poliméricas, la banda de 1115 indica que los alcoholes presentes son de tipo secundario. En el espectro de RMN¹H (figura 39), se observan bandas en la región de metilos y metilenos, además no aparecen señales en la zona de aromáticos, lo que confirma de que se trata de estructuras alifáticas y/o alicíclicas. Por la forma en que aparecen las señales entre 7 y 5 ppm, es posible decir que se trata de una mezcla de compuestos. El aspecto del espectro de RMN¹³C (figura 41) confirma que se trata de una mezcla de compuestos.

De la fracción 54 se obtuvo un polvo rojo, cuyo punto de fusión es de 223°-225°C. El espectro en UV-Vis (figura 36), exhibe dos máximos, uno en 221 nm y otro en 282 nm. El espectro en IR (figura 38) exhibe bandas en: 2922 y 2852 y en 1454 correspondientes a enlaces C-H, pero al no aparecer la banda doble en 1380 indica que sólo se trata de grupos metileno. La banda en 1454 sugiere la presencia de ciclohexano; la

ausencia de señales entre 3000 y 3100, indica que no hay aromáticos; la banda de 3345 indica la presencia de grupos OH, en estructuras poliméricas y la banda en 1114 indica que los alcoholes presentes son de tipo secundario. En el espectro de RMN¹H (figura 40) se observan bandas en la región de metilos y metilenos. No se encuentran señales en la zona aromáticos, lo que confirma que se trata de estructuras alifáticas y/o alicíclicas, al igual que en el caso anterior, de la forma en que aparecen las señales entre 8 y 5 ppm es posible decir que se trata de una mezcla de compuestos. El aspecto del espectro de RMN¹³C (figura 42) confirma que se trata de una mezcla de compuestos.

5.6 Análisis microbiológico (4.1.8)

5.6.1 Enterobacterias y algunas otras bacterias gram-negativas (4.1.8.2)

Para las enterobacterias y algunas otras bacterias gram-negativas el crecimiento en placas con agar bilis rojo violeta con glucosa y lactosa, de colonias, generalmente rojas, constituye un resultado positivo; de ser así, lo que procede es realizar la cuantificación correspondiente. En las cuatro muestras no se observó desarrollo alguno en el medio ya mencionado, lo que indica ausencia de enterobacterias y algunas otras bacterias gram-negativas.

5.6.2 Escherichia coli (4.1.8.3)

En la detección de *Escherichia coli*, un desarrollo que no corresponda a colonias grandes rosas-rojas rodeadas de una zona de precipitación en medio Mac Conkey o colonias pequeñas azul-negro con brillo metálico de color verde en agar Levine-eosina-azul de metileno, indica que la muestra cumple el requisito de ausencia de *E. Coli*. La presencia de *E. Coli* puede confirmarse utilizando pruebas bioquímicas adicionales. En las cuatro muestras no se observó desarrollo tanto en el medio agar Levine-eosina-azul de metileno como en el Mac Conkey, por lo que se concluye ausencia de *E. Coli* para las cuatro muestras. Tabla 25.

5.6.3 Pseudomonas aeruginosa (4.1.8.4)

Para *Pseudomonas aeruginosa* en caso de que en agar cetrimida no se desarrollen colonias verdes azulosas, y con luz ultravioleta se observen de color verdoso fluorescentes, se concluye que la muestra cumple con la ausencia de *P. aeruginosa*. Si las características son similares, se continúa. Si en el medio agar *Pseudomonas F* se desarrollan colonias incoloras o amarillentas, y con luz ultravioleta se observan de color amarillento fluorescente; o en el medio agar *Pseudomonas P* se desarrollan colonias verde azulosas, y con luz ultravioleta se observan de color azul fluorescente, se realiza la

prueba de oxidasa, para confirmar la presencia de este microorganismo, además se pueden emplear pruebas bioquímicas adicionales. En las cuatro muestras resultó un desarrollo negativo en el medio agar cetrimida, por lo tanto, se concluye ausencia de *P. Aeruginosa* para las cuatro muestras. Tabla 26.

5.6.4 Mesófilos aerobios (4.1.8.5)

En la cuantificación de mesófilos aerobios encontramos que para las tres primeras muestra el resultado es de 1100 NMP/g, y sólo la muestra no. 4 da como resultado > 1100 NMP/g. Tabla 27.

5.6.5 Hongos filamentosos y levaduras (4.1.8.6)

Los hongos filamentosos se observan como desarrollo de colonias superficiales, mientras que las levaduras se observan como colonias desarrolladas al interior del medio. En los hongos filamentosos encontramos valores desde 65 hasta 210 UFC/g, con un promedio de 116 UFC/g, como se muestra en la tabla 28. Y para las levaduras se encuentran valores entre 1250 y 4500 UFC/g con un promedio de 3125 UFC/g, como se muestra en la tabla 29.

6. ANALISIS DE RESULTADOS

6.1 DESCRIPCION (5.1)

La descripción macroscópica sólo toma en cuenta el análisis a simple vista de la parte de la planta utilizada. A pesar de su simpleza, esta prueba tiene una gran importancia al inicio del análisis, ya que define si se debe continuar con el análisis o si se debe suspender, dependiendo de que corresponda o no a la referencia.

Si la descripción macroscópica corresponde con la referencia, se deberá continuar con la descripción microscópica, que es una prueba más específica, que da una información más acertada de la identificación de la planta en cuestión; sin embargo, la prueba propuesta en este trabajo presenta el inconveniente de ser muy extensa, por lo que se propondrá como una prueba tentativa

6.2 ENSAYOS DE IDENTIDAD (5.2)

Los dos procedimientos desarrollados en lo que se refiere a la técnica de cromatografía en capa fina dan resultados que nos permiten establecer de manera tentativa valores de R_fs de referencia para el tepezcohuite.

Por otra parte, las espectroscopias UV-Vis, los espectros en el ultravioleta permiten establecer valores tentativos de máximos como referencia, tanto de un extracto etanólico como de un extracto clorofórmico. Los máximos obtenidos para el extracto etanólico corresponden a los máximos reportados en la patente: US no. 5,122,374.

- Cromatografía en capa fina. Procedimiento 1: Exhibe dos bandas cuyos R_fs son de aproximadamente 0.45 y 0.89.
- Cromatografía en capa fina. Procedimiento 2: Exhibe tres bandas cuyos R_fs son de aproximadamente 0.11, 0.32 y 0.50.
- Espectroscopía en UV-Vis. Procedimiento 1: Exhibe dos máximos: a 220 nm y otro a 280 nm.
- Espectroscopía en Uv-vis. Procedimiento 2: Exhibe tres máximos: a 246 nm, 274 nm y a 320 nm.

6.3 ENSAYOS Y VALORACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS (5.3 y 5.4)

De los ensayos aquí realizados para la determinación de algunas de las propiedades de la corteza del tepezcohuite, tales como pérdida por secado, cenizas totales, cenizas insolubles en ácido clorhídrico, así como contenido de taninos, pueden establecerse de manera tentativa los límites para dichas determinaciones, que se podrán tomar como punto de partida para futuros trabajos. Los límites tentativos son:

- Pérdida por secado: No > de 11.0%.
- Cenizas totales: No > de 6.0%.
- Cenizas insolubles en ácido clorhídrico: No > de 1.0%.
- Contenido de taninos (en base seca): No < de 13.0%.

6.4 AISLAMIENTO DE COMPONENTES QUIMICOS DE *MIMOSA TENUIFLORA* (5.5)

Inicialmente se aplicó la técnica de la patente: US Pharmaceutical product having epidermal regenerative activity based on the active ingredient of *Mimosa tenuiflora* and process for its obtention⁶, donde se describe como se obtiene de manera aislada el supuesto principio activo de la corteza de *Mimosa tenuiflora*.

La técnica que corresponde a la patente ya mencionada, concluye en la parte del "fraccionamiento del extracto", en donde el extracto metanólico se somete a un reflujo con agua, y el precipitado que se forma es considerado como el principio activo; en la práctica este precipitado está formado por una mezcla de compuestos, lo cual se detectó mediante el uso de cromatografía en capa fina.

El procedimiento descrito en la patente se complementó, con la finalidad de obtener en forma pura el compuesto considerado como principio activo, por lo que se continuó con el fraccionamiento del extracto, separación de constituyentes, y por último con una purificación y análisis espectroscópico del producto obtenido.

Se consiguió aislar dos componentes químicos identificados como F10-15 y F54, de acuerdo con las espectroscopías UV-Vis, ambos componentes podrían corresponder al reportado en la patente⁶, donde se informan dos máximos en el UV, 222nm y 281 nm, los dos componentes aislados presentan máximos de 221 nm y en 282 nm; sin embargo, al comparar los espectros en infrarrojo y resonancia magnética nuclear, tanto protónica como de carbono¹³, se puede observar que se trata de compuestos diferentes al que se reporta como único componente activo. De acuerdo con las características espectroscópicas de los componentes identificados como F10-15 y F54 descritas en los resultados, son mezclas de compuestos y podrían tratarse de mezclas de mimósidos y/o saponinas esteroideas, descritos en los antecedentes.

6.6 ANALISIS MICROBIOLOGICO (5.6)

De acuerdo a los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos realizados, se cumple con los requisitos establecidos por la Organización Mundial de Salud²:

Escherichia coli: Máximo 10^4 UFC/ por gramo

Levaduras: Máximo 10^5 UFC / por gramo

Un duplicado de este análisis microbiológico utilizando las mismas muestras se realizó en el Centro de Control Total de Calidades S.A. de C.V. (tablas de 30 a 36). En términos generales, los resultados obtenidos en los dos laboratorios son consistentes. En el caso de la detección de enterobacterias y algunas bacterias gram-negativas en ambos casos resultó negativo; en cuanto a la cuantificación de mesófilos aerobios, en el Centro de Control para las cuatro muestras se obtuvo el resultado de 1100 (NMP/g), y en nuestro laboratorio en las tres primeras muestras se obtuvo este mismo resultado, pero para la muestra no. 4 se obtuvo un resultado de >1100 (NMP/g); en ambos lugares se obtuvieron resultados negativos para las cuatro muestras tanto para P. Aeruginosa como para E. Coli; para la cuenta de levaduras en el Centro de Control en promedio se obtuvo 19591 UFC/g, en contraste con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio se obtuvo en promedio 3075 UFC/g; en la cuantificación de hongos en el Centro de Control se obtuvo en promedio 140 UFC/g y en nuestro laboratorio se obtuvo en promedio 116 UFC/g

En ambos casos cumplen los requisitos establecidos por la Organización Mundial de Salud, ya mencionados.

CONCLUSIONES

Con las características microscópicas, macroscópicas, fisicoquímicas, microbiológicas, de valoración e identificación, se da de forma tentativa una propuesta de una monografía de tipo farmacopeica:

TEPEZCOHUIE, CORTEZA

Mimosa tenuiflora (Will) Poiret.

DEFINICION. Consiste en la corteza desecada de *Mimosa tenuiflora (Will) Poiret.*, familia leguminosae y subfamilia mimosoideae, Contiene no menos de 13.0% de taninos calculados como ácido tánico.

DESCRIPCION MACROSCOPICA. La corteza es de apariencia escamosa por la presencia de abundantes lenticelas grandes y alargadas hasta de 5 mm de largo, agrupadas en líneas transversales, presenta un color de café rojizo a grisáceo, con amplias fisuras longitudinales y superficiales de textura fibrosa. Sabor resinoso y astringente, de olor resinoso y dulce. Se considera una corteza de delgada a mediana, mostrando un grosor de entre 3.2 y 10 mm.

DESCRIPCION MICROSCOPICA. La corteza de *Mimosa Tenuiflora* está integrada por peridermis, córtex, floema, radios floemáticos, además de contenidos celulares.

Peridermis o corteza externa. Se trata de una peridermis compuesta. Felema o súber; está integrado por dos tipos de células: macrosclereidas y células suberizadas, con su eje longitudinal paralelo a la superficie del tallo y en dirección tangencial, organizadas en paquetes de 10 a 20 células cada paquete. El felógeno presenta activa división celular con nueve estratos celulares; mientras que la felodermis sólo presenta dos estratos celulares.

Córtex. Presenta restos de grupos de macrosclereidas con paredes fuertemente lignificadas, se trata de un córtex obliterado.

Floema. Es un tejido complejo de tipo acumulativo, organizado en forma de cúpula.

Radios floemáticos. Los radios floemáticos se encuentran ubicados entre las cúpulas del tejido floemático. Estas células son de forma rectangular a cuadrada con su eje longitudinal en dirección tangencial, de paredes delgadas y abundantes contenidos celulares.

Contenidos celulares. Se observa abundante contenido de almidón, tanto en las células parenquimáticas de los radios como en las células parenquimáticas del floema.

IDENTIFICACION. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Reactivos:

2 g de material vegetal molido

20 mL de EtOH (90%)

Medio elución B: (n-butanol/ac acético/agua 50:10:40)

Agente revelador B: (anisaldehido)

Soporte: gel de sílice 60.

Método: Colocar 2 gramos del material vegetal en un matraz bola, adicionar 20 ml de etanol y colocarlo a reflujo con agitación controlando el calentamiento por medio del baño María, durante un periodo de 30 minutos. Posteriormente filtrar la mezcla y concentrar hasta obtener un volumen de 5 mL; del concentrado aplicar 5 µL. en banda sobre la placa cromatográfica; eluir la placa cromatográfica con el medio de elución,

y revelarla por aspersión del agente revelador. Calentar sobre una parrilla eléctrica, controlando el ascenso de la temperatura hasta obtener tres bandas cuyos Rf's son de aproximadamente 0.11, 0.32 y 0.50.

IDENTIFICACION. ESPECTROSCOPIA EN ULTRAVIOLETA-VISIBLE.

Colocar 1 gramo del material vegetal en un matraz bola, adicionar 20 ml de etanol al 96% y colocarlo a reflujo con agitación, controlando el calentamiento por medio del baño María, durante un periodo de 30 minutos. Posteriormente filtrar la mezcla y concentrar hasta obtener un volumen de 10 ml. Determinar la espectroscopia (190 nm – 800 nm) con una alícuota de este extracto. Se exhiben dos máximos, uno en 221 nm y otro en 283 nm.

PERDIDA AL SECADO. MGA 0301¹⁷

Colocar aproximadamente 1 g de muestra molida pesada con exactitud en una cápsula (previamente colocada en la estufa por un periodo de 2 h a 105°C(±5°C), enfiada en desecador), y mantenerla a 105°C (± 5°C) durante 3 h.
No más de 11,0%.

CENIZAS TOTALES. MGA 301¹⁷

Transferir aproximadamente 1 g de muestra molida pesada con exactitud a un crisol (previamente colocado en la mufla a 600°C(±5°C), durante 30 minutos, enfiado en desecador), colocar en una campana extractora, con ayuda de una parrilla eléctrica preincinerar la muestra. Posteriormente introducirla a una mufla a 600°C(±5°C) hasta obtener cenizas blancas y peso constante.
No más de 6,0%.

CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO. MGA 301¹⁷

Adicionar 25 ml de HCl 3N al residuo obtenido en la prueba de cenizas totales contenido en el crisol, ebullición durante 5 minutos, cubriendo el crisol con un vidrio de reloj, filtrar y lavar hasta conseguir que el filtrado sea neutro. Incinerar el papel filtro dentro del crisol, hasta conseguir peso constante.
No más de 1.0 (m/m).

VALORACION. CONTENIDO DE TANINOS. M 26.1.37. AOAC.²²

Reactivos.

Reactivo Folin –Denis: A 750 mL de agua (destilada), adicionar 100 g de tungstato de sodio dihidratado, 20 g de ácido fosfomolibdico y 50 ml de ácido fosfórico, colocar en un sistema de reflujo por un periodo de 2 horas, enfriar y aforar a 1000 ml.

Solución saturada de carbonato de sodio: Preparar una solución al 35% (m/v) de carbonato de sodio anhidro; esta solución debe permanecer protegida de la luz, en caso de que se precipite, filtrar.

Solución estándar de ácido tánico: Disolver 100 mg de ácido tánico en 1000 ml de agua destilada, se deberá preparar el mismo día que va a ser utilizada.

Curva patrón. Transferir con ayuda de una bureta alícuotas de 0 a 10 ml, a intervalos de 1 ml de la solución estándar de ácido tánico a matraces volumétricos de 100 ml, que contengan 75 ml de agua destilada. Añadir 5 ml del reactivo de Folin-Denis, después 10 ml de la solución saturada de carbonato de sodio, diluir a 100ml con agua. Mezclar y determinar la absorbancia a 760 nm después de 30 minutos (proteger de la luz durante los 30 minutos).

Preparación de la solución problema. Colocar aproximadamente 0.75 g del material vegetal molido pesado con exactitud en un matraz bola, adicionar 150 ml de agua, calentar a reflujo por un periodo de 30

minutos. Decantar, transferir el líquido a un matraz volumétrico de 250 ml, lavar el residuo con agua destilada, reuniendo los lavados en el mismo matraz. Aforar a 250 ml con agua, filtrar, transferir 1.0 mL a un matraz volumétrico de 100 ml, que contenga 75 ml de agua, añadir 5 ml del reactivo de Folin-Denis, después 10 ml de la solución saturada de carbonato de sodio y aforar con agua. Mezclar y determinar la absorbancia a 760 nm después de 30 minutos (proteger de la luz durante los 30 minutos) a 760 nm.

Cálculos:

$$\% \text{ Taninos} = \frac{(x) (250\text{ml}) (1\text{g}) (100) [100/(100-h)]}{(1\text{ml}) (1000\text{mg}) (z)}$$

x = concentración extrapolada en la curva patrón (mg/ml)

h = pérdida por secado

z = peso de la muestra expresado en g

El contenido de taninos no deberá de ser menor de 12% (m/m).

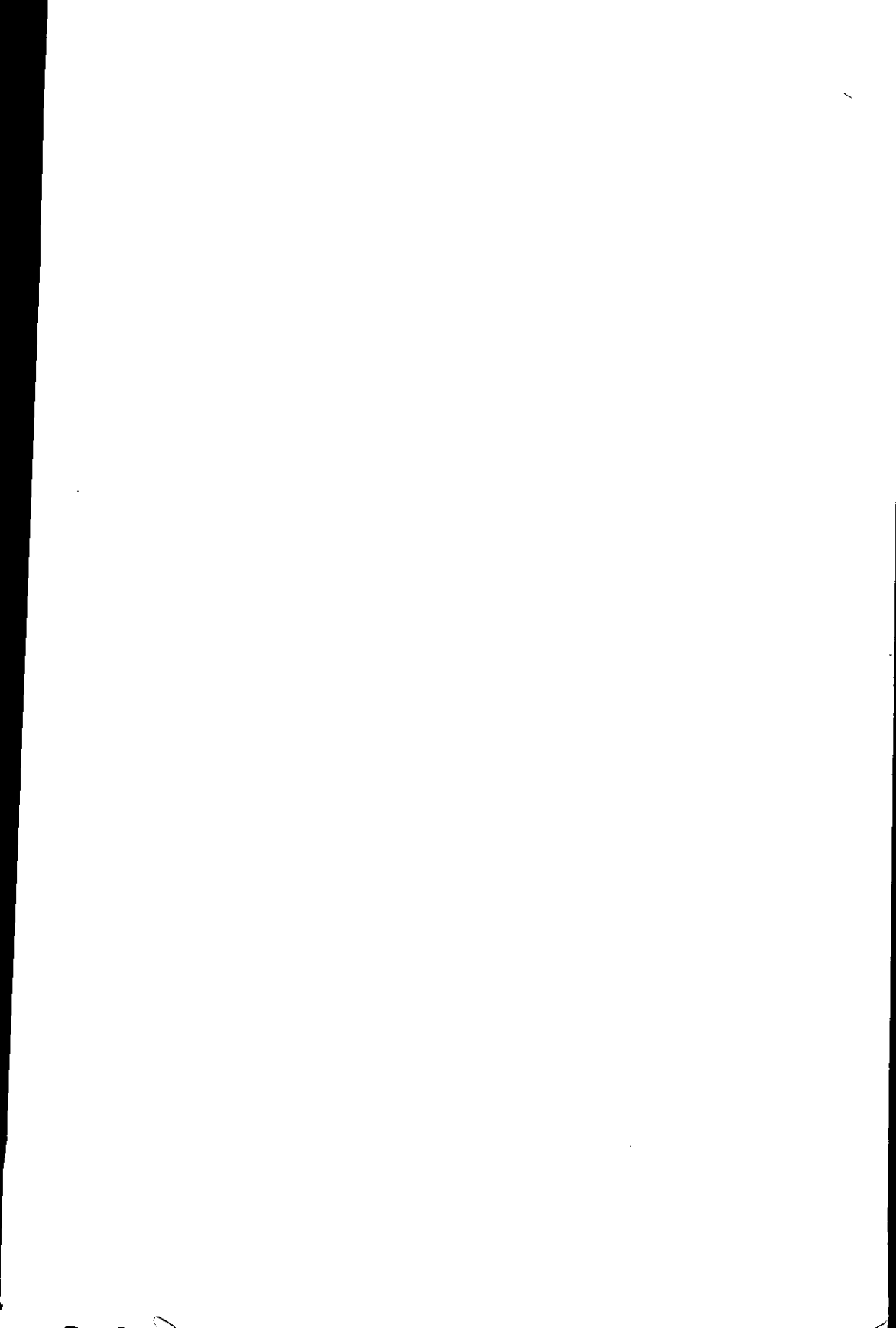
LIMITES MICROBIANOS. MGA 0571^{17, 5}. Escherichia coli menor o igual a 10⁴ UFC por gramo.
Levaduras menor o igual a 10⁵ UFC por gramo

CONSERVACION. La corteza de tepezcohuite se deberá conservar en un lugar seco y fresco.

BIBLIOGRAFIA

1. Bauer, Rudolf. Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug standards be achieved?. 1998. Drug Information Journal. 32, 101.
2. Anton, R. Et al. 1993. Pharmacognosy of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Pioret. Journal of Ethnopharmacology. 38,(213),153.
3. Meckes-Lozoya, Mariana et al. 1990. n,n-Dimethyltryptamine alkaloid in *mimosa tenuiflora* bark (tepescohuite). Arch. Invest. Med. Mex. 21, 175.
4. Dominguez, X. A. et al. 1998. Kukulkanins A and B, new chalcones from *Mimosa tenuiflora*. Journal of Natural Products. 52(4), 864.
5. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. WHO/PHARM/92.559/rev.1.
6. US. Date of patent: Jun. 16, 1992. Patent Number: 5,122,374. Dupoy, Jacques. Pharmaceutical product having epidermal regenerative activity based on the active in gradient of *Mimosa tenuiflora* and process for its obtention.
7. Métodos Generales de Análisis. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Sexta Edición. 1994.
8. Jiang, Yulin et al. 1991. Triterpenoid glycosides from the bark of *Mimosa tenuiflora*. Phytochemistry. 30(7): 2357.
9. Barajas, Josefina et al. 1990. Manual de identificación de árboles de selva baja mediante cortezas. Instituto de Biología, UNAM.
10. Lara, Francisco et al. 1996. Plantas medicinales de México, composición, usos y actividad biológica. Instituto de Química, UNAM. 99-101 pp.
11. Villarreal, M. Luisa et al. 1991. Effects of *Mimosa tenuiflora* bark extracts on WI38 and KB human cells in culture. Arch. Invest. Méd. (Méx). 22(2),163.
12. Jiang, Yulin et al. 1991. Structure of a new saponin from the bark of *Mimosa tenuiflora*. Journal of Natural Products, 54(5), 1247.
13. Meckes-Lozoya, Mariana, Lozoya, Javier et al. 1990. Propiedades farmacológicas in vitro de algunos extractos de *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite). Arch. Invest. Med. (Mex.). 21, 163.
14. Lozoya, Xavier et al. 1989. Experimental evaluation of *mimosa tenuiflora* (Will.) Poir. (Tepescohuite) I.- screening of the antimicrobial properties of bark extracts. Arch. Invest. Med. Mex. 20(1), 163.
15. Meckes-Lozoya, Mariana et al. 1990. The effect produced by the alkaloidal fraction of *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite) upon the peristaltic reflex in guinea pig's ilium. Arch. Invest. Med. Mex. 21, 171.
16. Gruenwald, Joerg. 1998. The emerging role of herbal medicine in health care in Europe. Drug Information Journal. 32, 151.
17. US. Date of patent: Nov. 28, 1989. Patent Number: 4,883,663. Leon, Roque. Therapeutic powder and process of manufacturing.
18. Pimentel, A. Emilio et al. 1991. Evaluation of the mutagenic potential of tepezcohuite in the *Drosophila* wing spot test. Mutation Research 264, 115-116.
19. Palacios, Carolina et al. 1991. Efectos cicatrizante, antibacteriano y antimicótico del tepescohuite en animales de experimentación. Rev. Invest. Clin. 43, 205-210.

20. Camargo, Sara L.; Grether, Rosaura. Aspectos de la Biología del "tepescohuite", *Mimosa tenuiflora* (Leguminosae), en México. Tesis. Facultad de Ciencias. UNAM.
21. Método 26.1.37. 1995. AOAC Internacional. Volumen 1. 16 edición.



TESIS EN 7 HORAS

HERRERA CASA MATRIZ

Odontología # 65-1

Esq. Paseo de las Facultades

Copilco Universidad

Tel. 58-58-95-54

40 AÑOS

DE EXPERIENCIA

APENDICE 1

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA. PROCEDIMIENTO 1		
Muestra	Rf1	Rf2
1	0.46	0.86
2	0.43	0.86
3	0.46	0.90
4	0.45	0.86
Promedio	0.45	0.87
Desviación estándar	0.0122	0.0173

Tabla 1.

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA. PROCEDIMIENTO 2			
Muestra	Rf1	Rf2	Rf3
1	0.12	0.35	0.55
2	0.10	0.32	0.52
3	0.10	0.32	0.52
4	0.11	0.29	0.53
Promedio	0.11	0.32	0.53
Desviación estándar	0.0082	0.0212	.0122

Tabla 2.

ESPECTRO UV-VIS. PROCEDIMIENTO 1. *Muestra 1*

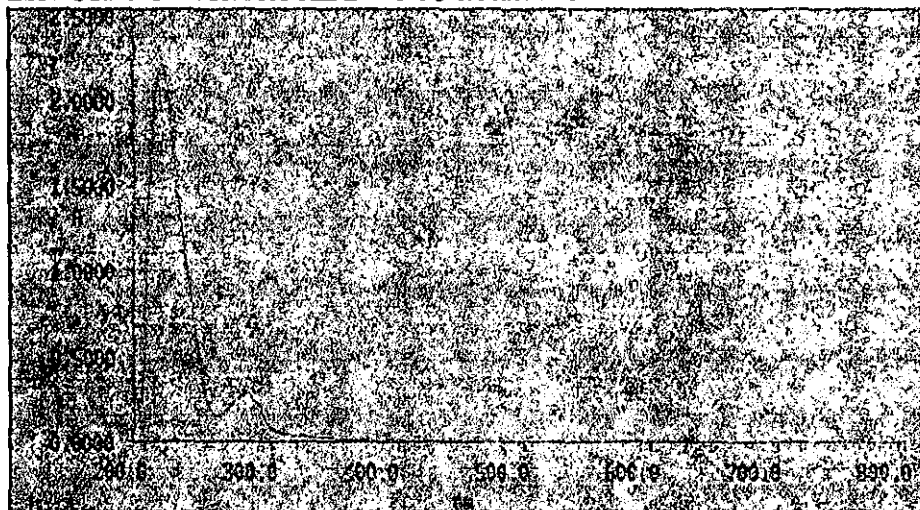


FIGURA 6.

ESPECTRO UV-VIS. PROCEDIMIENTO 1. Muestra 2.

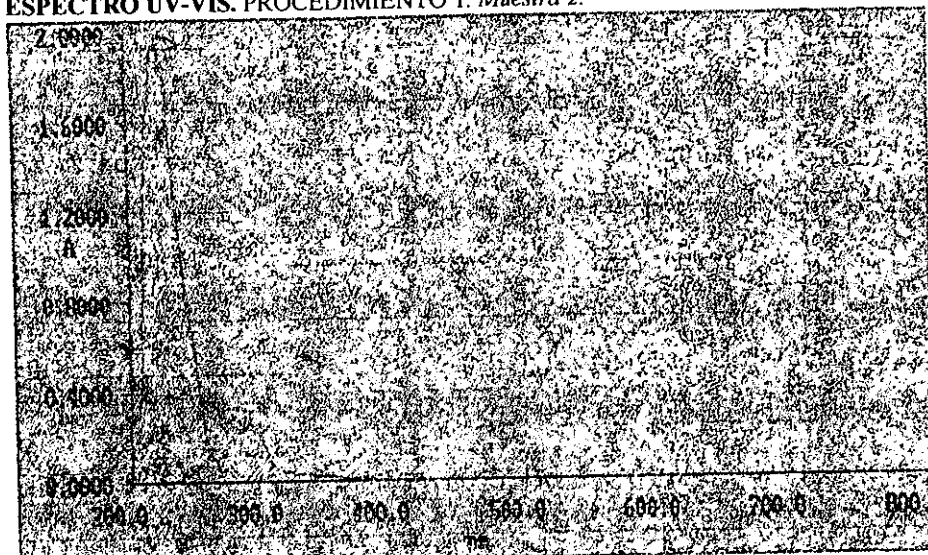


Figura 7.

ESPECTRO UV-VIS. PROCEDIMIENTO 1. Muestra 3

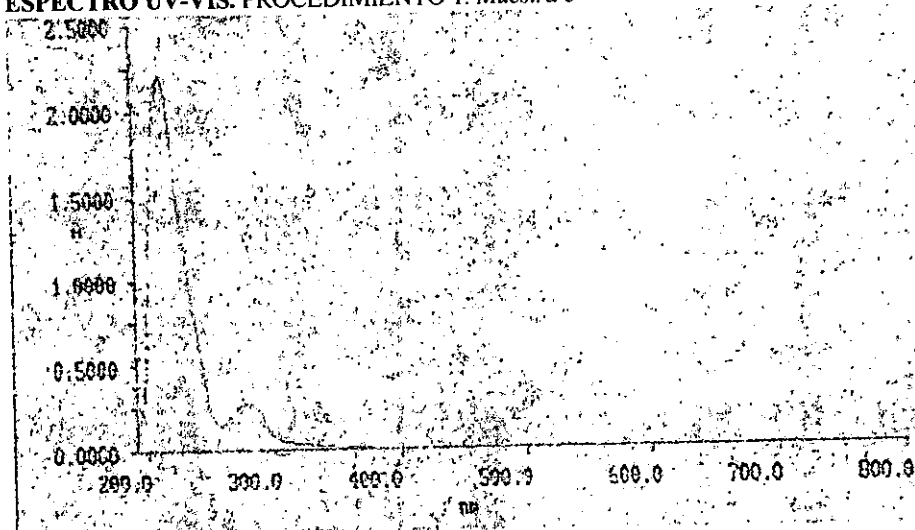


Figura 8.

ESPECTRO UV-VIS. PROCEDIMIENTO 1. *Muestra 4*

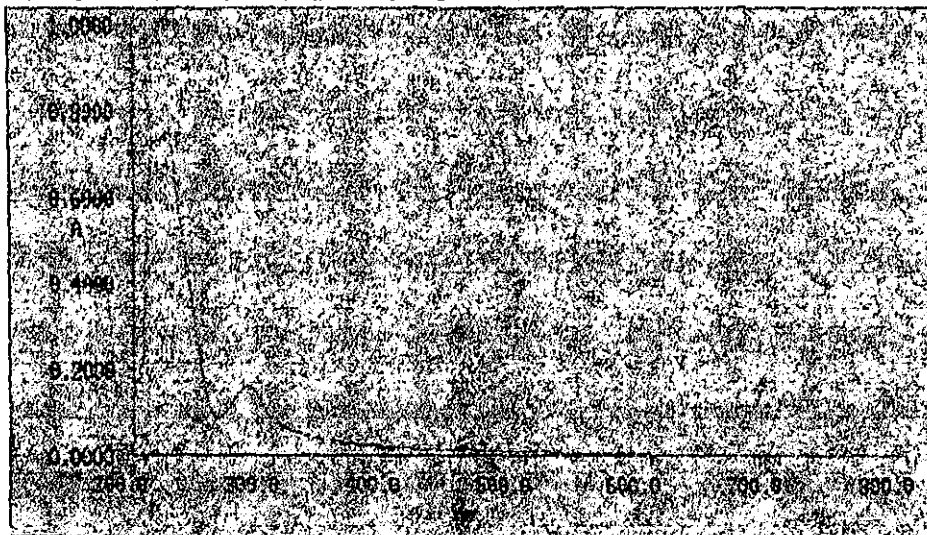


Figura 9.

ESPECTRO UV-VIS. PROCEDIMIENTO 2. *Muestra 1*

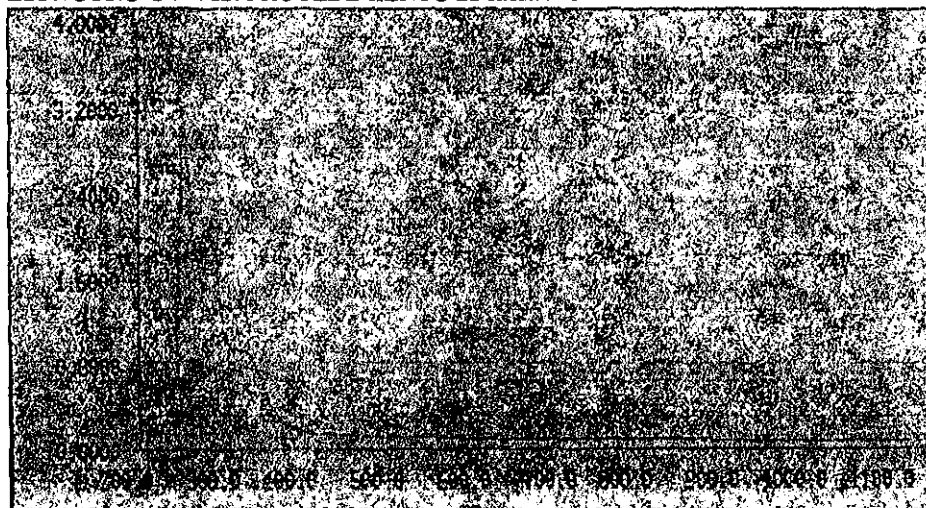


Figura 10.

ESPECTRO UV-VIS. PROCEDIMIENTO 2. *Muestra 2*

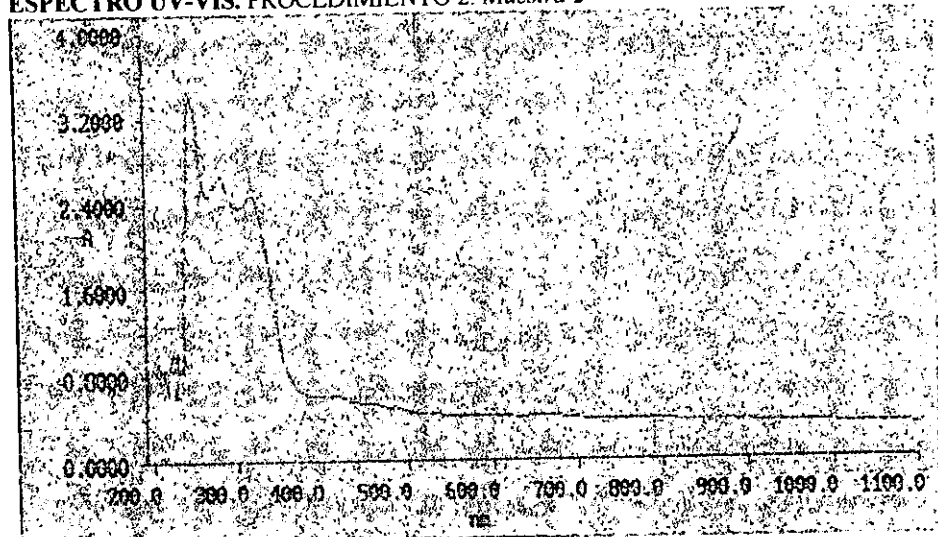


Figura 11.

ESPECTRO UV-VIS. PROCEDIMIENTO 2. *Muestra 3*

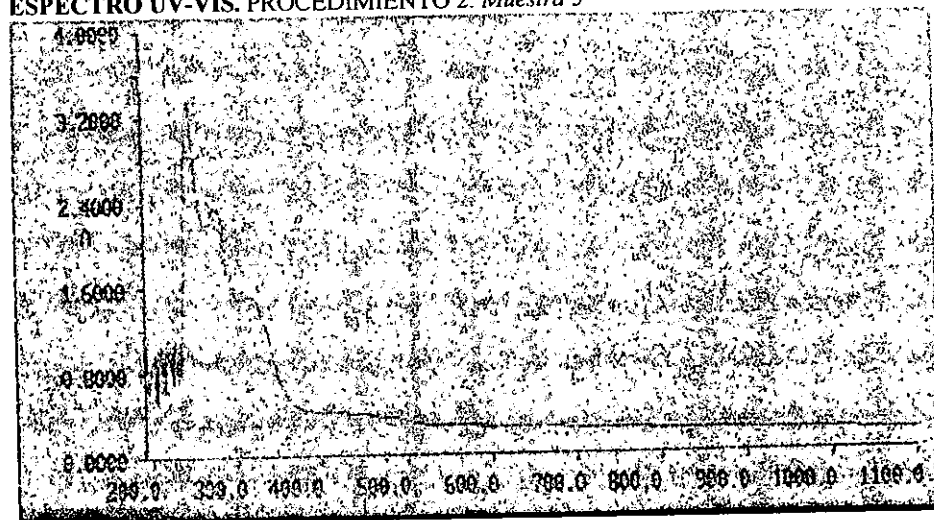


Figura 12.

ESPECTRO UV-VIS. PROCEDIMIENTO 2. *Muestra 4*

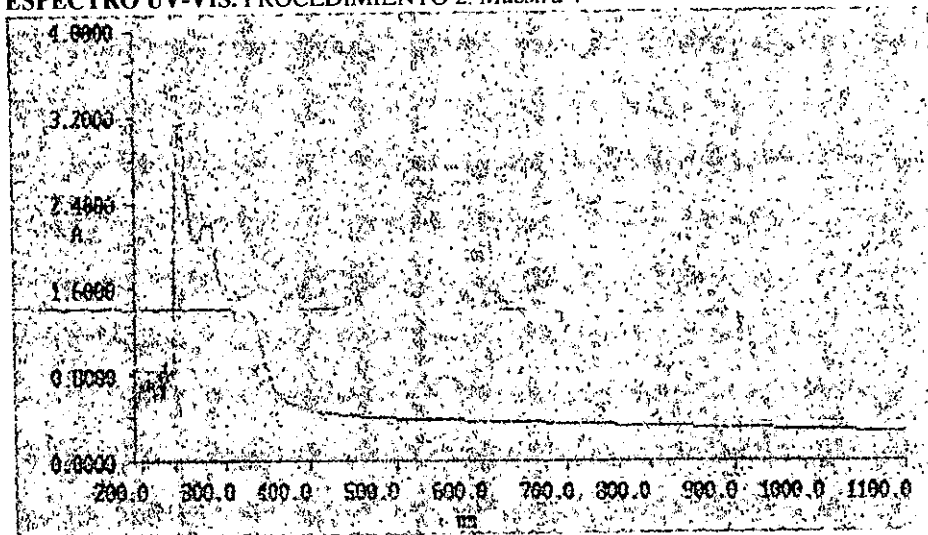


Figura 13.

PERDIDA AL SECADO MUESTRA 1

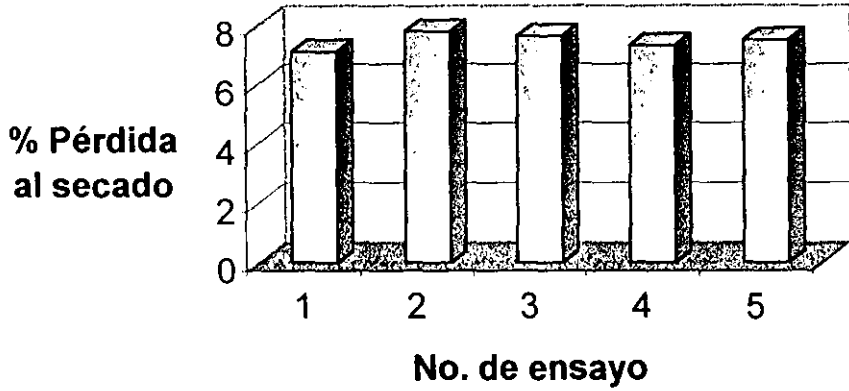


Figura 14

PERDIDA AL SECADO. Muestra 1	
No. de ensayo	%Pérdida al secado
1	7.1
2	7.8
3	7.6
4	7.3
5	7.5

PROMEDIO: 7.5%
DESVIACIO ESTANDAR: 0.2702

Tabla 3.

PERDIDA AL SECADO MUESTRA 2

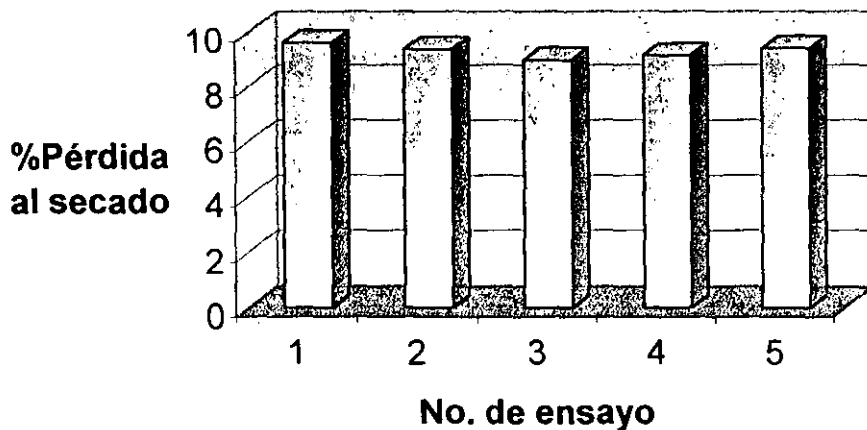


Figura 15.

PERDIDA AL SECADO. Muestra 2	
No. ensayo	%Pérdida al secado
1	9.6
2	9.4
3	9.0
4	9.2
5	9.4

PROMEDIO: 9.3%
DESVIACION ESTANDAR: 0.2280

Tabla 4.

PERDIDA AL SECADO MUESTRA 3

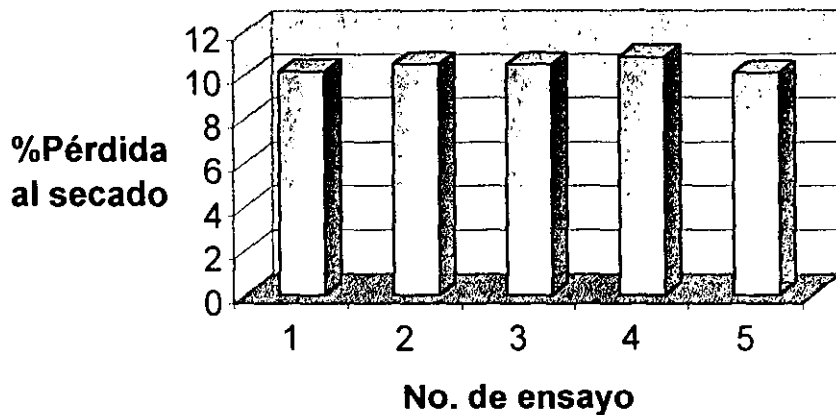


Figura 16.

PERDIDA AL SECADO. Muestra 3	
No. de ensayo	%Pérdida al secado
1	10.2
2	10.5
3	10.5
4	10.8
5	10.1

PROMEDIO: 10.4%

DESVIACION ESTANDAR: 0.2775

Tabla 5.

PERDIDA AL SECADO MUESTRA 4

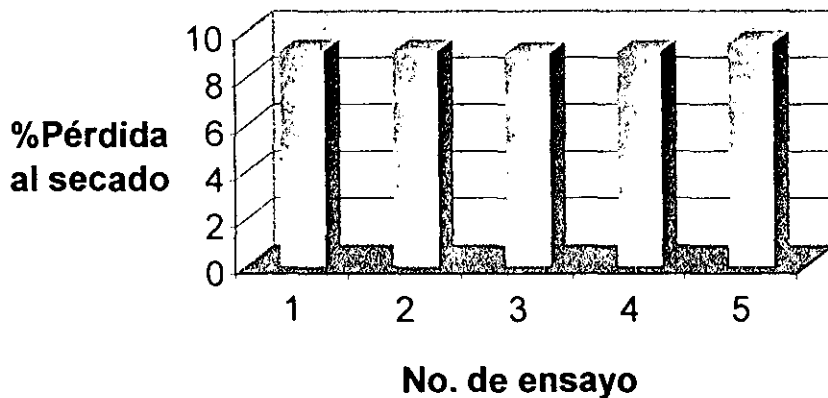


Figura 17.

PERDIDA AL SECADO. Muestra 4	
No. de ensayo	%Pérdida al secado
1	9.2
2	9.1
3	9.0
4	9.1
5	9.5
PROMEDIO: 9.2%	
DESVIACIO ESTANDAR: 0.1923	

Tabla 6.

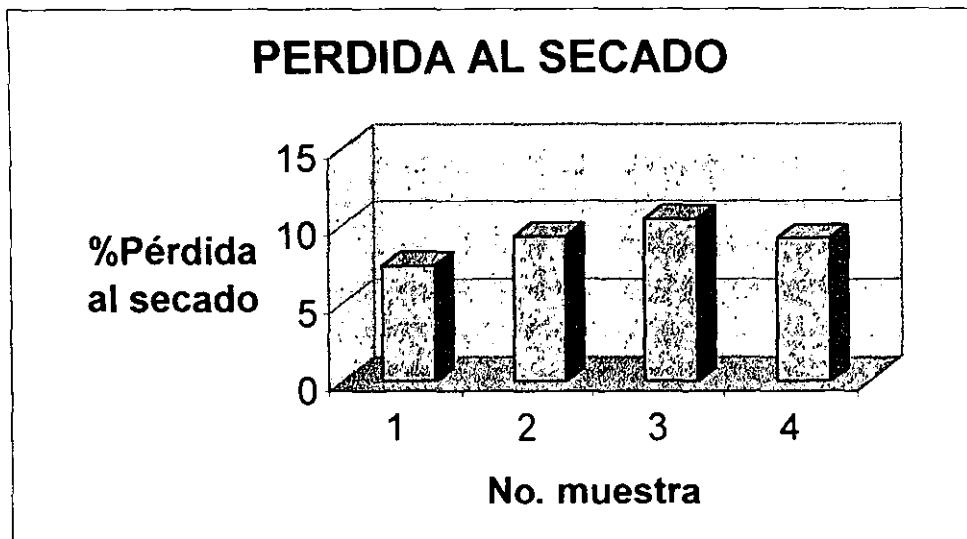


Figura 18.

PERDIDA AL SECADO	
Muestra	%Pérdida al secado
1	7.4
2	9.3
3	10.4
4	9.2

Tabla 7.

CENIZAS TOTALES MUESTRA 1

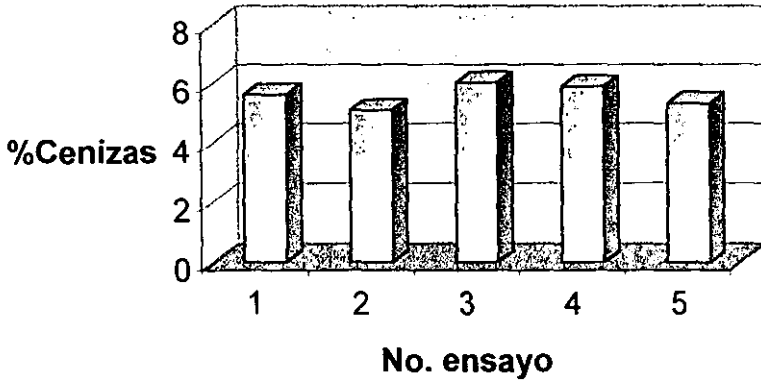


Figura 19.

CENIZAS TOTALES. Muestra 1

No. de ensayo	%Cenizas
1	5.6
2	5.1
3	6.0
4	5.9
5	5.3

PROMEDIO: 5.6%

DESVIACIO ESTANDAR: 0.3834

Tabla 8.

CENIZAS TOTALES MUESTRA 2

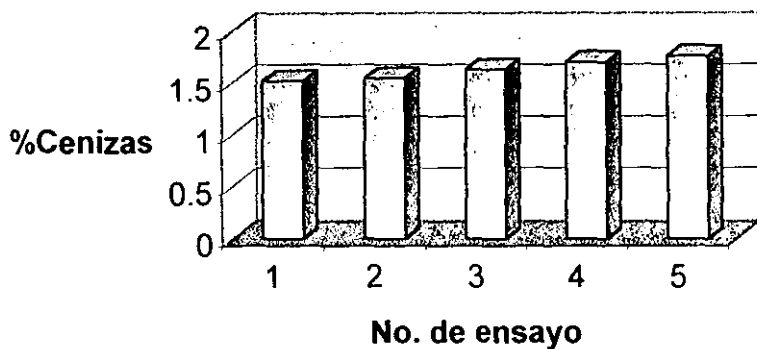


Figura 20.

CENIZAS TOTALES. Muestra 2	
No. de ensayo	%Cenizas
1	1.5
2	1.6
3	1.6
4	1.7
5	1.8

PROMEDIO: 1.6%
DESVIACIO ESTANDAR: 0.1140

Tabla 9.

CENIZAS TOTALES MUESTRA 3

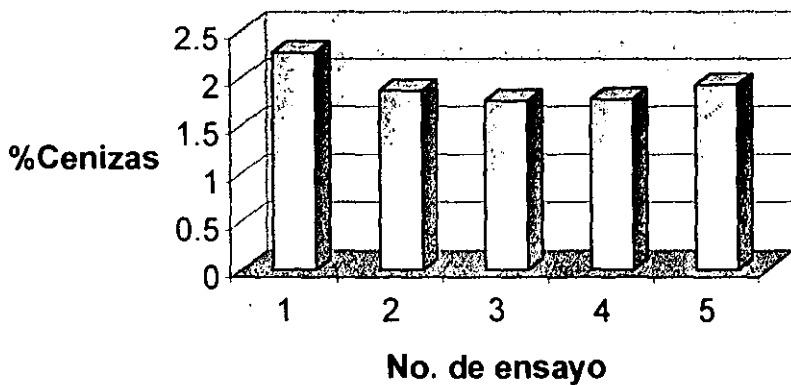


Figura 21.

CENIZAS TOTALES. Muestra 3	
No. de ensayo	%Cenizas
1	2.3
2	1.9
3	1.8
4	1.8
5	1.9
PROMEDIO: 1.9%	
DESVIACIO ESTANDAR: 0.2073	

Tabla 10.

CENIZAS TOTALES MUESTRA 4

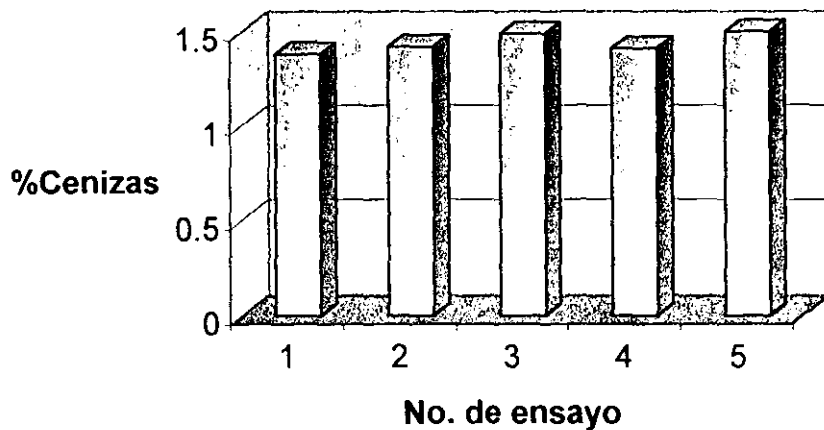


Figura 22.

CENIZAS TOTALES. Muestra 4	
No. de ensayo	%Cenizas
1	1.4
2	1.4
3	1.5
4	1.4
5	1.5

PROMEDIO: 1.4%
DESVIACIO ESTANDAR: 0.0548

Tabla 11.

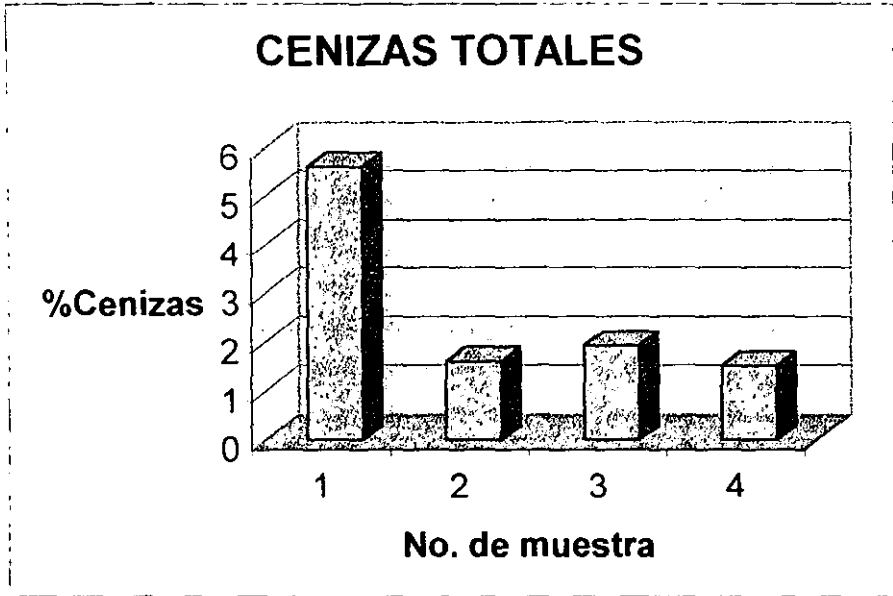


Figura 23.

CENIZAS TOTALES	
Muestra	%Cenizas
1	5.6
2	1.6
3	1.9
4	1.4

Tabla 12.

CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO MUESTRA 1

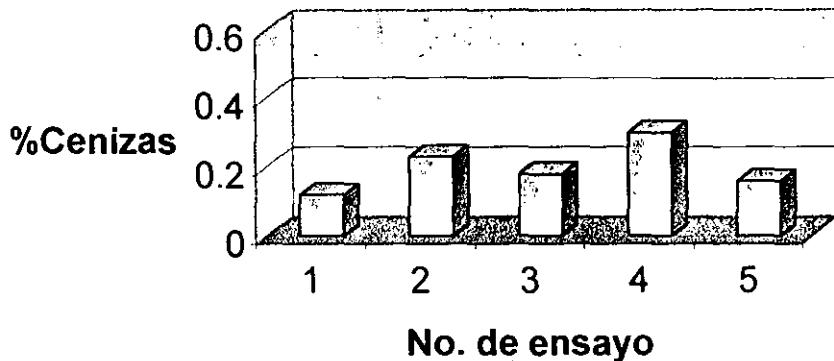


Figura 24.

CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO. Muestra 1

No. de ensayo	%Cenizas
1	0.1
2	0.2
3	0.2
4	0.3
5	0.2

PROMEDIO: 0.2%

DESVIACIO ESTANDAR: 0.0707

Tabla 13.

CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO MUESTRA 2

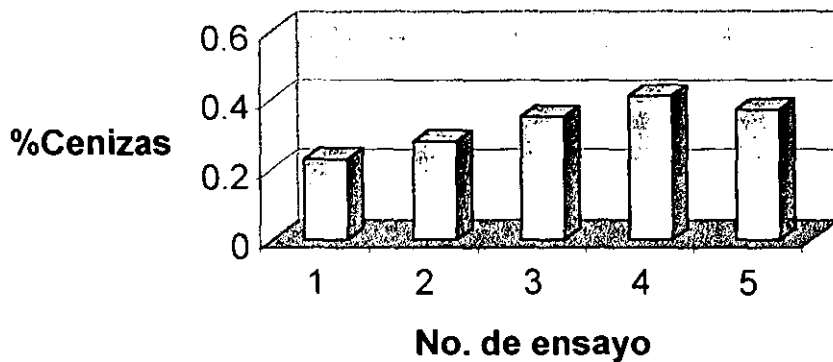


Figura 25.

CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO. Muestra 2	
No. de ensayo	%Cenizas
1	0.2
2	0.3
3	0.4
4	0.4
5	0.4
PROMEDIO: 0.3%	
DESVIACION ESTANDAR: 0.0894	

Tabla 14.

CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO MUESTRA 3

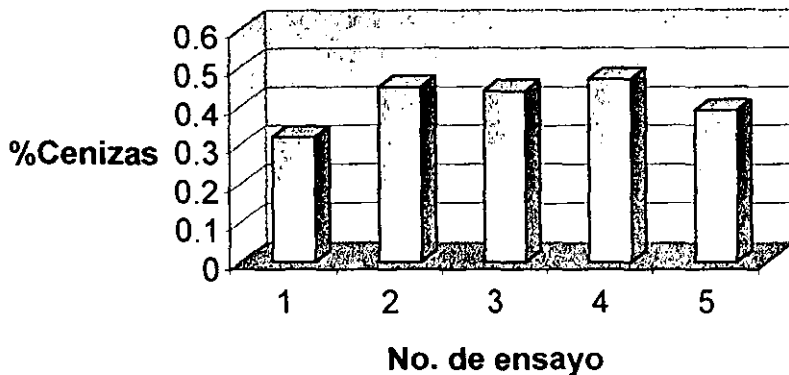


Figura 26.

CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO. Muestra 3	
No. de ensayo	%Cenizas
1	0.3
2	0.4
3	0.4
4	0.5
5	0.4

PROMEDIO: 0.4%
DESVIACIO ESTANDAR: 0.0707

Tabla 15.

CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO MUESTRA 4

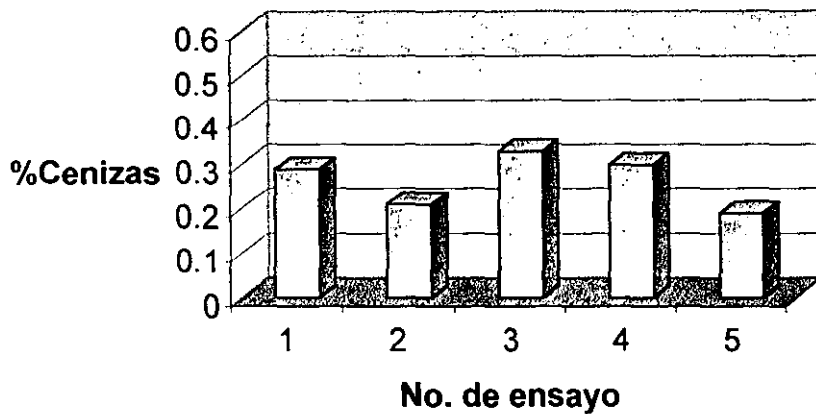


Figura 27.

CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO. Muestra 4	
No. de ensayo	%Cenizas
1	0.3
2	0.2
3	0.3
4	0.3
5	0.2

PROMEDIO: 0.3%
DESVIACIO ESTANDAR: 0.0548

Figura 16.

CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO

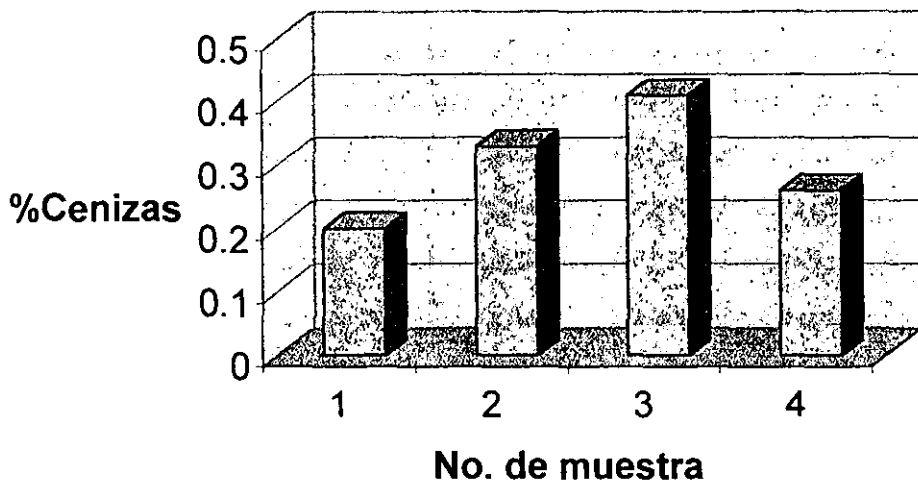


Figura 28.

CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO	
Muestra	%Cenizas insolubles en HCl
1	0.2
2	0.3
3	0.4
4	0.3

Tabla 17.

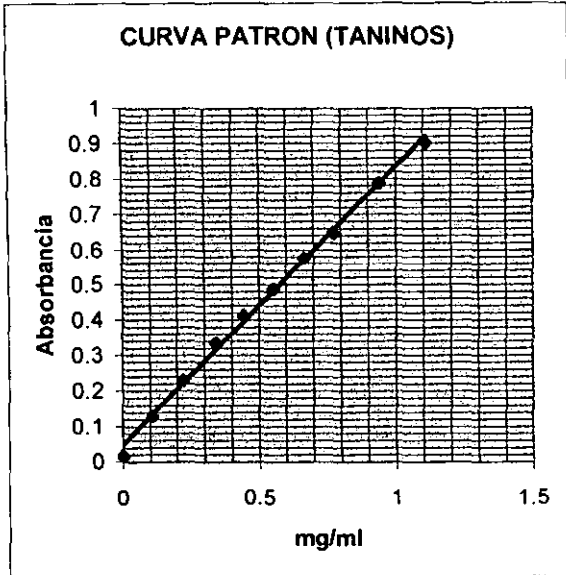


Figura 29.

CURVA PATRON (TANINOS)	
CONCENTRACION (mg/ml)	ABSORBANCIA
0	0.017
0.1104	0.131
0.2208	0.23
0.3422	0.336
0.4416	0.413
0.5520	0.488
0.6624	0.577
0.7728	0.649
0.9384	0.788
1.1104	0.903

$$r = 0.9986$$

$$r^2 = 0.9972$$

Tabla 18.

CONTENIDO DE TANINOS (BASE SECA) MUESTRA 1

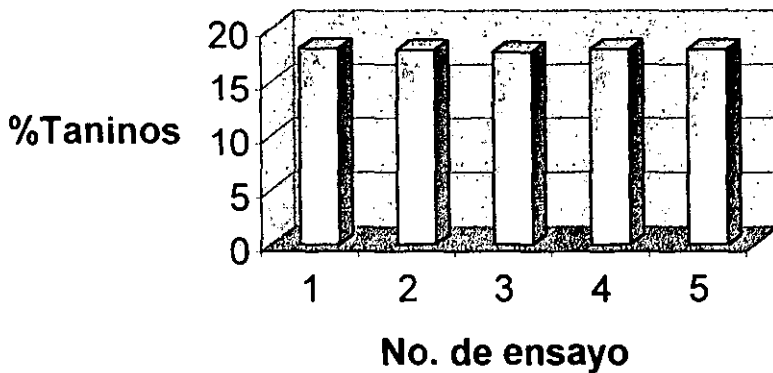


Figura 30.

CONTENIDO DE TANINOS. Muestra 1	
No. de ensayo	%Taninos
1	18.2
2	18.0
3	17.8
4	18.0
5	18.1
PROMEDIO: 18.0%	
DESVIACIO ESTANDAR: 0.1483	

Tabla 19.

CONTENIDO DE TANINOS (BASE SECA) MUESTRA 2

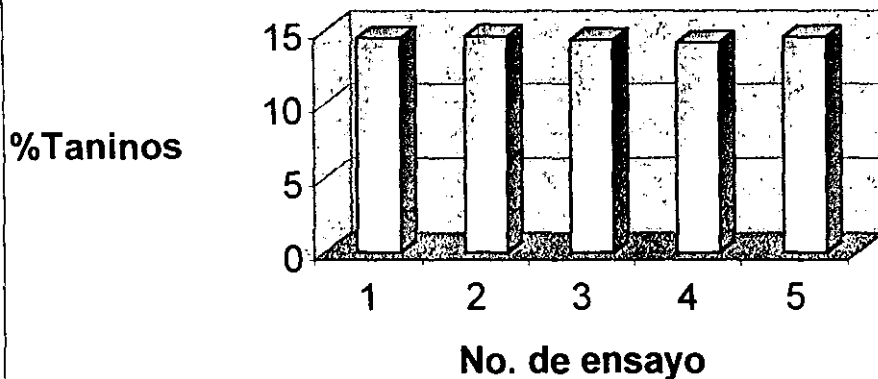


Figura 31.

CONTENIDO DE TANINOS. Muestra 2	
No. de ensayo	%Taninos
1	14.4
2	14.6
3	14.3
4	14.1
5	14.5

PROMEDIO: 14.4%

DESVIACIO ESTANDAR: 0.1924

Tabla 20.

CONTENIDO DE TANINOS (BASE SECA) MUESTRA 3

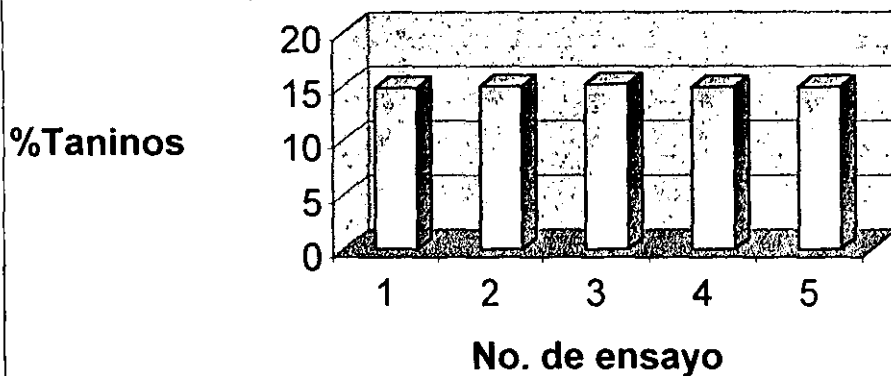


Figura 32.

CONTENIDO DE TANINOS. Muestra 3	
No. de ensayo	%Taninos
1	14.8
2	15.0
3	15.1
4	14.9
5	14.9

PROMEDIO: 14.9%
 DESVIACIO ESTANDAR: 0.1140

Tabla 21.

ESTA TESIS NO SALE
 DE LA BIBLIOTECA

CONTENIDO DE TANINOS (BASE SECA) MUESTRA 4

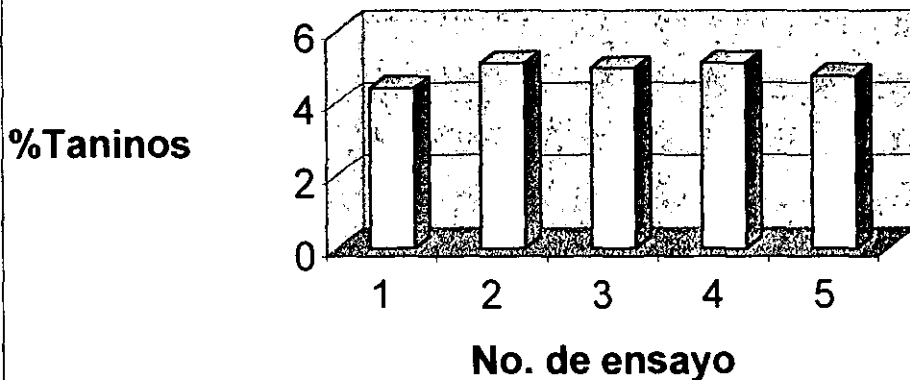


Figura 33.

CONTENIDO DE TANINOS. Muestra 4	
No. de ensayo	%Taninos
1	4.4
2	5.1
3	5.0
4	5.1
5	4.7

PROMEDIO: 4.9%
DESVIACIO ESTANDAR: 0.3050

Tabla 22.

CONTENIDO DE TANINOS (BASE SECA)

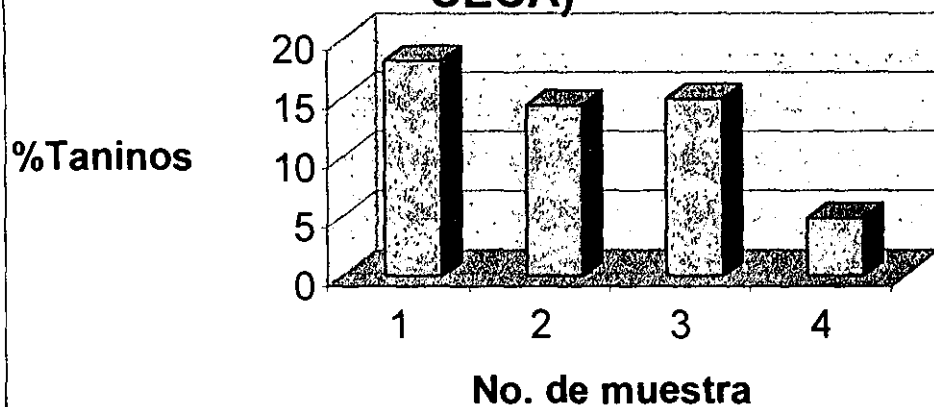


Figura 34.

CONTENIDO DE TANINOS	
Muestra	%Taninos
1	18.0
2	14.4
3	14.9
4	4.9

Tabla 23.

ESPECTRO UV-VIS. FRACCION 10-15 PURIFICADA

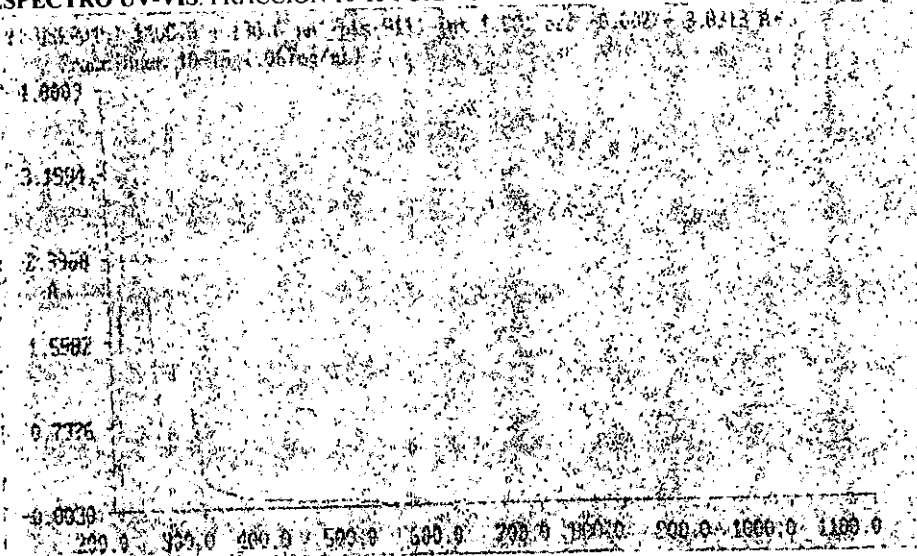


Figura 35.

ESPECTRO UV-VIS. FRACCION 54 PURIFICADA

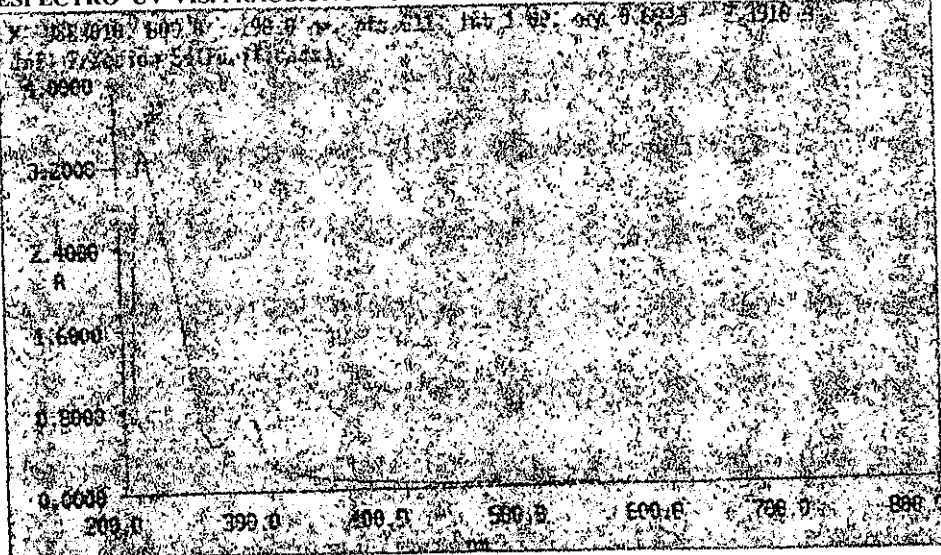


Figura 36.

ESPECTRO IR. FRACCION 10-15 PURIFICADA

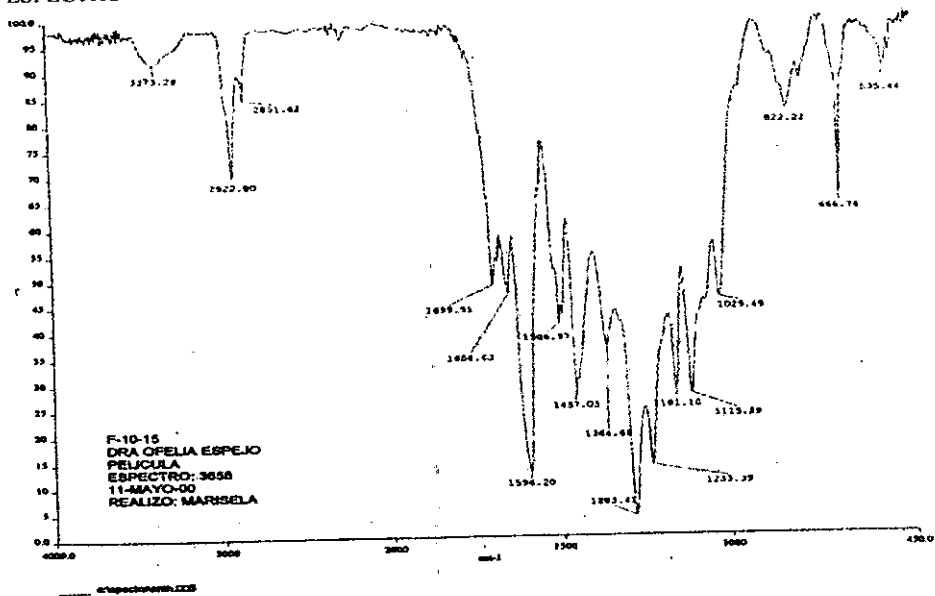


Figura 37.

ESPECTRO IR. FRACCION 54 PURIFICADA

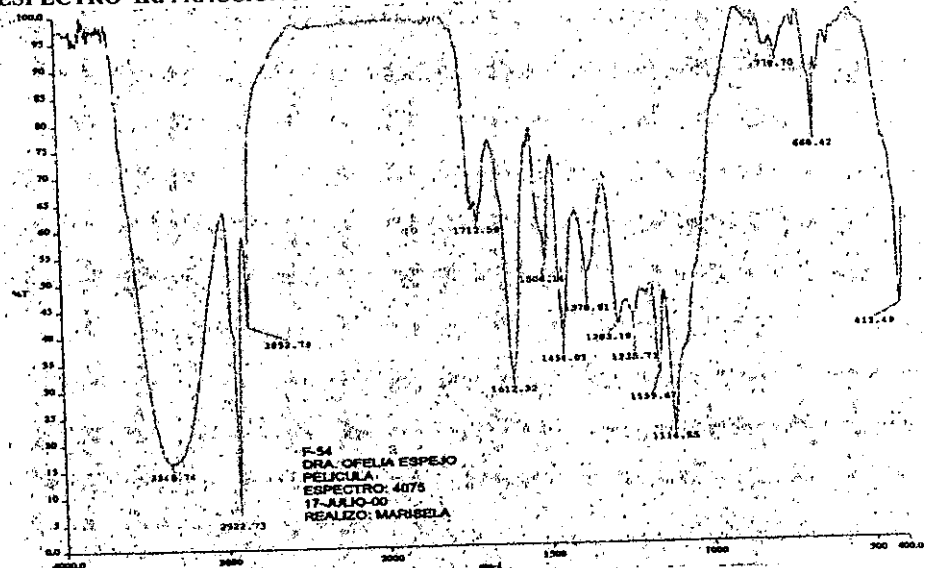


Figura 38.

ENTEROBACTERIAS Y ALGUNAS OTRAS GRAM-NEGATIVAS		
Muestra	Desarrollo en medio agar bilis rojo violeta	
1	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo

Tabla 24.

ESCHERICHIA COLI				
Muestra	Desarrollo en medio:			
	Agar Levine-cosina-azul de metileno		Mac Conkey	
1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla 25.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA				
Muestra	Desarrollo en medio agar cetrimida			
	36°C		42°C	
1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla 26.

MESOFILOS AEROBIOS		
Muestra	NMP / g	
1	1100	1100
2	1100	1100
3	1100	1100
4	>1100	>1100

Tabla 27.

CUENTA DE HONGOS		
Muestra	UFC / g	
1	100	110
2	60	70
3	200	220
4	80	90

Tabla 28.

CUENTA DE LEVADURAS		
Muestra	UFC / g	
1	3700	3300
2	5000	4000
3	3000	3500
4	1000	1500

Tabla 29.

ENTEROBACTERIAS Y ALGUNAS OTRAS GRAM-NEGATIVAS	
Muestra	Desarrollo en medio agar bilis rojo violeta
1	Negativo
2	Negativo
3	Negativo
4	Negativo

Tabla 30.

ESCHERICHIA COLI		
Muestra	Desarrollo en medio:	
	Agar Levine-cosina-azul de metileno	Mac Conkey
1	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo
3	Positivo	Positivo
4	Negativo	Negativo

Tabla 31.

PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA IDENTIFICACION DE E. COLI		
Prueba		Resultado
SIM	H ₂ S	Negativo
	Indol	Negativo
	Movilidad	Positivo
Citrato Simmons		Positivo
VP		Negativo
MR		Negativo

Tabla 36

PSEUDOMONAS AERUGINOSA		
Muestra	Desarrollo en medio agar cetrimida	
	36°C	42°C
1	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo

Tabla 32.

MESOFILOS AEROBIOS	
Muestra	NMP / g
1	1100
2	1100
3	1100
4	1100

Tabla 33.

CUENTA DE HONGOS		
Muestra	UFC / g	
	1	140
2	100	120
3	190	140
4	120	140

Tabla 34.

CUENTA DE LEVADURAS		
Muestra	UFC / g	
1	12200	12200
2	23180	19520
3	12790	13400
4	29280	31720

Tabla 35.