

00566



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**“CONTROL DE CALIDAD DE UNA DROGA DE ORIGEN VEGETAL:
Iostephane heterophylla (Cav.) Hemsl”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(CONTROL DE MEDICAMENTOS)**

P R E S E N T A:

Q.F.B. GRISELDA RIOS LOPEZ

MEXICO, D.F.

2000

29-1-10



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

| | |
|------------------|---|
| Presidente | Dra. Helgi Jung Cook |
| Vocal | Dr. Mario González de la Parra Yrigoyen |
| Secretario | Dr. Andrés Navarrete Castro |
| primer suplente | Dr. Robert Arthur Bye Buttler |
| segundo suplente | Dra. Raquel López Arrellano |

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 125, Conjunto "E" de la Facultad de Química y Laboratorio de apoyo a la investigación del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor

Dra. Isabel Aguilar Laurenst

Sustentante

Q. F. B. Griselda Rios López

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Robert. Bye, Director del Jardín Botánico de la UNAM, por la recolecta e identificación del material vegetal utilizado en el estudio.

A la M. en C. Esthela Sandoval, Investigadora del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM por su asesoría para la identificación microscópica del material vegetal.

Al Biólogo Luciano Hernández Gómez, Profesor de la Facultad de Química de la UNAM. por proporcionar las cepas de microorganismos de referencia,

Al M. en C. Alfonso Lira, Profesor de la Facultad de Química de la UNAM, por facilitar el uso de la mufla para las determinaciones de cenizas.

Al Dr. Blas Lotina, Profesor de la Facultad de Química de la UNAM, por facilitar el aparato para efectuar las determinaciones espectrofotométricas.

A la Dra. Ana Luisa Anaya Lang, Investigadora del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por las facilidades otorgadas dentro de su laboratorio para la continuación del trabajo experimental de esta tesis en la época de crisis universitaria.

A los H. miembros del jurado por la revisión, comentarios y observaciones de este trabajo.

A la universidad por dar la oportunidad de ser parte de ella.

Por último a la Dra. Isabel Aguilar por su guía, enseñanza, comentarios y su amistad invaluable.

INDICE GENERAL

| | |
|--|------|
| Resumen | VI |
| Abstract | VII |
| Lista de Abreviaturas | IX |
| Lista de Cuadros | XI |
| Lista de Figuras | XII |
| Lista de gráficas | XIII |
| | |
| 1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2 ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Antecedentes históricos | 3 |
| 2.2 Situación del mercado de fitofármacos | 6 |
| 2.3 Situación de las plantas medicinales en México | 7 |
| 2.4 Recolección, secado y conservación de drogas vegetales | 11 |
| 2.5 Falsificación de las drogas | 13 |
| 2.6 Antecedentes de <i>Iostephane heterophylla</i> | 15 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 24 |
| 4. OBJETIVOS | 26 |
| 5. METODOLOGÍA | 27 |
| 5.1. Material Vegetal | 27 |
| 5.2. Identificación microscópica | 27 |
| 5.2.1. Técnica de disociados | 28 |
| 5.2.2. Técnica de inclusión en parafina y cortes | 28 |
| 5.2.3. Pruebas histoquímicas | 30 |
| 5.2.3.1. Detección de almidón | 30 |
| 5.2.3.2. Detección de lípidos | 30 |
| 5.2.3.3. Detección de proteínas y polisacáridos | 30 |
| 5.2.3.4. Detección de pectinas | 31 |
| 5.2.3.5. Detección de ligninas | 31 |

| | | |
|------------|--|----|
| 5.2.3.6. | DetECCIÓN de polifenoles | 31 |
| 5.2.3.7 | DetECCIÓN de taninos condensados | 31 |
| 5.2.3.8. | DetECCIÓN de taninos hidrolizables | 31 |
| 5.3. | Determinación de elementos extraños | 31 |
| 5.4. | Determinación de cenizas totales e insolubles en ácido | 32 |
| 5.4.1. | Cenizas totales | 32 |
| 5.4.2. | Cenizas insolubles en ácido | 32 |
| 5.5 | Determinación de material extraíble | 33 |
| 5.6 | Determinación del índice del índice de hinchamiento | 33 |
| 5.7. | Determinación de pérdida al secado | 33 |
| 5.8. | Determinación de metales pesados | 34 |
| 5.9. | Determinación de límite microbiano y ausencia de microorganismos patógenos | 34 |
| 5.9.1 | Límites microbianos | 34 |
| 5.9.1.1. | Recuento de Microorganismos Mesófilos Aerobios | 35 |
| 5.9.1.1.1 | Método en placa | 35 |
| 5.9.1.1.2 | Método en tubo (NMP) | 36 |
| 5.9.2 | Identificación de Microorganismos Patógenos | 37 |
| 5.9.2.1 | Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> | 38 |
| 5.9.2.1.1 | Prueba de la coagulasa | 38 |
| 5.9.2.2 | Identificación de Enterobacterias | 39 |
| 5.9.2.2.1. | Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 39 |
| 5.9.2.2.2. | Identificación de <i>Salmonella</i> sp | 39 |
| 5.9.2.2.3. | Identificación de <i>Escherichia coli</i> | 39 |
| 5.9.2.3 | Pruebas bioquímicas y selectivas para la identificación de especies | 40 |
| 5.9.2.3.1 | Producción de pigmentos | 40 |
| 5.9.2.3.2. | Prueba de la oxidasa | 40 |
| 5.9.2.3.3 | Pruebas bioquímicas | 40 |

| | | |
|------------|---|----|
| 5.9.2.3.4 | Identificación de patógenos entéricos no fermentativos | 40 |
| 5.10. | Identificación del xantorizol por ccf | 41 |
| 5.11 | Determinación química cuantitativa | 41 |
| 5.11.1 | Determinación de fenoles totales por el método de Price y Butler | 42 |
| 5.11.1.1 | Preparación de la muestra | 42 |
| 5.11.1.2. | Preparación de la curva | 42 |
| 6. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 45 |
| 6.1. | Identificación Macroscópica | 45 |
| 6.1.1 | Corteza | 45 |
| 6.1.2. | Madera | 45 |
| 6.2 | Identificación microscópica | 45 |
| 6.2.1 | Descripción anatómica de los tejidos | 45 |
| 6.2.1.1. | Rizodermis | 46 |
| 6.2.1.2 | Córtex | 47 |
| 6.2.1.3 | Tejido Vascular | 47 |
| 6.2.1.3.1 | Floema | 47 |
| 6.2.1.3.2. | <i>Cambium</i> vascular | 48 |
| 6.2.1.3.3. | Xilema | 48 |
| 6.2.1.3.4 | Tejido fundamental | 48 |
| 6.2.2 | Contenidos celulares | 49 |
| 6.2.2.1 | Detección de almidón | 49 |
| 6.2.2.2 | Detección de lípidos | 49 |
| 6.2.2.3. | Detección de Polisacáridos y Proteínas | 50 |
| 6.2.2.4 | Detección de pectina | 50 |
| 6.2.2.5. | Detección de lignina | 50 |
| 6.2.2.6. | Detección de polifenoles | 50 |
| 6.2.2.7. | Detección de taninos hidrolizables | 51 |
| 6.2.2.8 | Detección de taninos condensados | 51 |
| 6.3. | Determinación de elementos extraños | 55 |

| | |
|--|----|
| 6.4. Determinación de cenizas totales e insolubles en ácido | 56 |
| 6.4.1. Cenizas totales | 56 |
| 6.4.2. Cenizas insolubles en ácido | 57 |
| 6.5. Determinación del material extraíble | 58 |
| 6.6. Determinación del índice de hinchamiento | 58 |
| 6.7. Determinación de pérdida al secado | 60 |
| 6.8. Determinación de metales pesados | 61 |
| 6.9. Determinación del límite microbiano y ausencia de microorganismos | 61 |
| 6.9.1. Límite microbiano | 62 |
| 6.9.1.1. Método en placa | 62 |
| 6.9.1.2. Método en tubo | 63 |
| 6.9.2. Identificación de microorganismos patógenos | 64 |
| 6.9.2.1. Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> | 64 |
| 6.9.2.2. Identificación de enterobacterias | 66 |
| 6.9.2.2.1. Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 66 |
| 6.9.2.2.2. Identificación de <i>Salmonella sp</i> | 66 |
| 6.9.2.2.3. Identificación de <i>E. coli</i> | 67 |
| 6.9.2.3. Identificación de patógenos entéricos no fermentativos | 68 |
| 6.10. Identificación del xantorrizol por ccf | 73 |
| 6.11. Determinación cuantitativa de fenoles totales | 74 |
| 6.11.1. Especificidad | 74 |
| 6.11.2. Linearidad del sistema | 76 |
| 6.11.3. Precisión del sistema | 78 |
| 6.11.4. Validación del método | 79 |
| 6.11.4.1. Linearidad del método | 79 |
| 6.11.4.3. Exactitud y repetibilidad al 100% | 81 |
| 6.11.4.5. Precisión (reproducibilidad) | 82 |
| 6.12. Determinación de fenoles en la raíz de <i>Isoetes heterophylla</i> | 83 |
| 7 CONCLUSIONES | 87 |

| | |
|----------------|-----|
| 8 BIBLIOGRAFÍA | 89 |
| ANEXO I | 96 |
| ANEXO II | 99 |
| ANEXO III | 106 |

Resumen

En años recientes, el interés por obtener nuevos medicamentos ha dado como resultado el uso de plantas con actividad biológica, para lo cual en algunos países, principalmente en Europa, requieren un estricto control de calidad para su consumo. En México, sin embargo, no hay ninguna regulación en este campo, por lo que este trabajo está dirigido a proponer las bases para la elaboración de la monografía de *Iostephane heterophylla*, conocida como “escorcionera” o “raíz del manso”, planta cuya raíz es empleada en algunas partes de nuestro país dentro de la medicina tradicional mexicana en tratamientos para enfermedades de la piel, artritis, reumatismo, diabetes y problemas gastrointestinales. Estudios fitoquímicos realizados con este vegetal han demostrado la existencia de compuestos fenólicos como el xantorrizol, 12,13-dihidro-13-hidroxi-11-en-xantorrizol, 12,13-dihidro-12-hidroxi-13-en-xantorrizol, 12,13-dihidro-12,13-dihidroxi-xantorrizol, ácido traquiloban-19-oico, ácido ent-kaur-16-en-19-oico entre otros, de los cuales el xantorrizol es uno de los componentes mayoritarios y posee actividad antimicótica y citotóxica.

El control de calidad que se propone a esta planta es mediante las pruebas organolépticas, identificación microscópica, análisis cuantitativo de fenoles, identificación del xantorrizol por cromatografía en capa fina, determinación de contaminación microbiológica, determinación de contaminación por metales pesados, y pureza etc. pruebas que se realizaron en la raíz de *Iostephane heterophylla* por medio de estas determinaciones se comprobó que esta droga tiene un potencial promisorio como fitomedicamento.

Abstract

In recent years, the interest for obtaining new drugs has resulted in the use of plants with diverse biological activities, and for this purpose, in some countries, specially in Europe, a strict quality control is required before its use. In México, the current regulations are restricted to that included in the Mexican Pharmacopoeia (7th. Edition) and to the General Health Input Law published in the Official Journal in September of 1988 which contains general but not specific regulations for each plant. Therefore, complete monographs must be made for each medicinal plant, including everything related to their chemical contents, macro and microscopic descriptions and data regarding their safety and biological efficacy. This paper is aimed to the proposal of the basis for the elaboration of the monograph of *lostephane heterophylla* roots, a plant known by the common name "escorcionera" or "raíz del manso", which is used in the Mexican Traditional Medicine in some parts of our country to treat wounds and sores in the form of a poultice, to alleviate rheumatism and arthritis by rubbing an alcoholic tincture or aqueous extract on the joints, and to make a tea for diabetes and gastrointestinal complaints, as well as temascal baths after childbirth. It also belongs to the "cachana" complex of medicinal plants, used among others, to treat infertility in the couple. Phytochemical studies performed in the roots of this plant have led to the isolation of the following phenolic compounds: xanthorizol, 12,13-dihydro-13-hydroxy-11-en-xanthorizol, 12,13-dihydro-12-hydroxy-13-en-xanthorizol, 12,13-dihydro-12,13-dihydroxy xanthorizol and some diterpenes as trachyloban-19-oic acid, *ent*-kaur-16-en-19-oic acid, among others, from which, xanthorizol is one of the major components and has antimycotical activity. Additionally, pharmacological studies have demonstrated the inhibitory activity over the tonic contraction of rat uterus performed by both, the CHCl₃ extract and xanthorizol itself.

For the utilization and commercialization of *lostephane heterophylla* roots as phytomedicine, it is necessary to keep a quality control, proposed hereby as a

means of the performance of organoleptic tests (flavor, odor color), macro and microscopical identification, phenols quantitative analysis, thin layer chromatographic identification of xanthorrhizol as quality marker substance, purity by microbiological contamination determination, heavy metals contamination determination and volatile materials; tests that were additionally practiced to the chemical and biological study on the *I. heterophylla* roots. By means of these determinations, it was verified that this drug has a promissory potential as phytomedicine, since there are not any toxic antecedents of it.

Lista de abreviaturas

| | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| C.C. | Campo claro |
| C.V. | Coefficiente de variación |
| ccf | Cromatografía en capa fina |
| CE ₅₀ | Concentración efectiva cincuenta |
| cm | Centímetros |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| CH ₂ Cl ₂ | Diclorometano |
| CH ₃ CH ₂ OH | Etanol |
| CHCl ₃ | Cloroformo |
| D.E. | Desviación estándar |
| Der. | Derecha |
| DL ₅₀ | Dosis letal cincuenta |
| EMB | Levine-Eosina-azul de metileno |
| EtOH | Etanol |
| FeSO ₄ | Sulfato de hierro |
| g | Gramo |
| GAA | Glicerol-alcohol-agua |
| H ₂ O | Agua |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| hex | Hexano |
| Izq. | Izquierda |
| Kg | Kilogramo |
| KMnO ₄ | Permanganato de potasio |
| L | Litro |
| M | Concentración molar |
| MeOH | Metanol |
| µg | Microgramo |

| | |
|----------------|--|
| mg | Miligramo |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetros |
| nm | Nanometros |
| NMP | Número más probable |
| °C | Grado centígrado |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| pH | Concentración de hidrógeno |
| ppm | Parte por millón |
| R _F | Distancia recorrida de la muestra entre distancia recorrida del disolvente |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
| Xil-EtOH | Xilol-etanol |
| XLD | Xilosa-lisina-desoxicolato |

Lista de cuadros

| | | |
|-----------|---|----|
| Cuadro 1. | Fármacos derivados de las plantas medicinales | 6 |
| Cuadro 2. | Millones de dólares gastados en fitofármacos en 1995 | 6 |
| Cuadro 3. | Metabolitos secundarios aislados de la raíz de <i>Iostephane heterophylla</i> | 18 |
| Cuadro 4. | Resultado de bioensayos antimicrobianos de los extractos de <i>I heterophylla</i> . Diámetro de halos de inhibición en mm | 22 |
| Cuadro 5. | Resultado de bioensayos antimicóticos con extractos de <i>I heterophylla</i> . CMI en µg/mL | 22 |
| Cuadro 6. | Actividad antimicótico del xantorrizol | 23 |
| Cuadro 7. | Mezcla de alcoholes para la deshidratación del tejido | 29 |
| Cuadro 8 | Número más probable por el método del tubo múltiple | 37 |
| Cuadro 9 | Cepas de referencia | 38 |
| Cuadro 10 | Diluciones para elaborar la curva estándar | 43 |
| Cuadro 11 | Contenido celulares en los diversos tejidos de la raíz de <i>I. heterophylla</i> | 52 |
| Cuadro 12 | Cenizas totales de la raíz de <i>I. heterophylla</i> | 56 |
| Cuadro 13 | Cenizas insolubles en ácido de la raíz de <i>I. heterophylla</i> | 57 |
| Cuadro 14 | Peso y porcentaje de los extractos hexánicos, etánicos y etanol-agua 7:3. | 59 |
| Cuadro 15 | Índice de hinchamiento de <i>I: heterophylla</i> | 59 |
| Cuadro 16 | Pérdida al secado en porciento | 60 |
| Cuadro 17 | Determinación de plomo en la raíz de <i>I. heterophylla</i> . | 61 |
| Cuadro 18 | Número de UFC que crecieron en tripticaseína en caja petri | 62 |
| Cuadro 19 | Colonias de hongos presentes en lagar Sabouraud | 63 |
| Cuadro 20 | Pruebas bioquímicas para determinar el género de <i>Salmonella</i> | 68 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Cuadro 21 | Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>enterobacter aerogenes</i> | 69 |
| Cuadro 22 | Curvas elaboradas para la evaluación de la linealidad del sistema | 77 |
| Cuadro 23 | Curvas elaboradas para la evaluación de la linealidad del método | 80 |
| Cuadro 24 | Cantidad adicionada del analito, cantidad de recobro y porcentaje de recobro | 81 |
| Cuadro 25 | Absorbancia obtenida para reproducibilidad | 76 |
| Cuadro 26 | Cuantificación de fenoles en la raíz de <i>I. heterophylla</i> | 79 |

Lista de figuras

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1. | Distribución geográfica de <i>I. heterophylla</i> | 15 |
| Figura 2. | <i>Iostephane heterophylla</i> (Cav.) Hemsl | 17 |
| Figura 3. | Cortes a la raíz para la técnica de disociados y de cortes en material completo la técnica de cortes. | 28 |
| Figura 4. | Hidratación del tejido | 30 |
| Figura 5 | Determinaciones realizadas a la raíz de <i>I. heterophylla</i> | 44 |
| Figura 6 | Raíz de <i>Iostephane heterophylla</i> . | 46 |
| Figura 7 | Microfotografías de los tejidos la raíz de <i>I. heterophylla</i> | 53 |
| Figura 8. | Medios selectivos para la identificación de bacterias | 70 |
| Figura 9. | Cromatoplaca C: F. de los extractos hexánico, clorofórmico y metanolico, con el xantorizol | 73 |

Lista de gráficas

| | | |
|------------|---|----|
| Gráfica 1. | Inhibición de la contracción inducida del músculo liso de útero de rata por el xantorizol | 23 |
| Gráfica 1 | Concentración del ac. Gálico en $\mu\text{g/mL}$ vs Absorbancia | 71 |
| Gráfica 2 | Cantidad adicionada vs cantidad encontrada del analito | 74 |
| Gráfica 3 | Longitud de onda vs absorción de los reactivos de color sin el analito con el metanol. | 76 |
| Gráfica 4 | Longitud de onda Vs Absorción de los acidos carboxilicos con los reactivos de color | 77 |
| Gráfica 5 | Longitud de onda Vs Absorción de fenoles con los reactivos de color | 77 |

1 INTRODUCCIÓN

La diversidad genética y cultural del continente Americano fueron elementos que admiraron los europeos desde su llegada a América, ya que constituyeron una verdadera explosión de nuevas posibilidades económicas y terapéuticas. Este hallazgo hizo de España el centro del desarrollo de la fitoterapia en el siglo XVI, tomando después el relevo otros países europeos mediante la adquisición de plantas medicinales provenientes del nuevo y del viejo mundo. Posteriormente se logró la obtención de principios activos puros a partir de extractos de plantas, como fue el caso en Alemania, del aislamiento de la morfina cristalizada del opio por Sertürner. Este es el primer antecedente que existe sobre el aislamiento de un principio responsable de la actividad terapéutica de una planta, y con este ejemplo, se inició el desarrollo del aislamiento de fármacos provenientes de vegetales. Sin embargo, en el siglo XX se produjo el actual y continuo desarrollo de la química sintética, con la consecuencia de la desvalorización de la fitoterapia.

Las causas a las que se atribuye la decadencia de la fitoterapia en los últimos años son muy variadas. Por una parte, gran cantidad de medicamentos de origen sintético consiguieron erradicar padecimientos que constituían verdaderos azotes de la humanidad, para los que las plantas no habían ofrecido soluciones eficaces. Así, las sulfas primero y posteriormente los antibióticos (también de origen natural) crearon el espejismo de que se había logrado vencer a las enfermedades; pero surgieron nuevas enfermedades y nuevos problemas, cuadros degenerativos, resistencia ante algunos productos por el agente etiológico, así como dolencias relacionadas con el sedentarismo, etc.

Ante el enorme interés actual por la conservación de la naturaleza y la búsqueda de una vida más natural, las plantas medicinales y productos derivados de ellas revisten particular importancia con respecto a la ciencia y la tecnología por

un potencial de desarrollo en el área de la salud, ya que existe un gran conocimiento acumulado que no ha sido adecuadamente utilizado.

En años recientes, ha aumentado notablemente el interés sobre las propiedades curativas de las plantas medicinales, como por ejemplo en Europa, el consumo de fitofármacos es muy notable, y en general en los países europeos, muchas compañías farmacéuticas elaboran presentaciones con plantas medicinales o extractos de plantas, que posteriormente son exportadas y consumidas en países como el nuestro. Sin embargo, en el mercado podemos encontrar varias presentaciones de un mismo producto, con diferente calidad, puesto que no se ha especificado o regulado este aspecto en nuestro país. Para poder cumplir con lo anterior, es necesario efectuar estudios sobre las plantas medicinales que justifiquen su uso, eficacia, seguridad y CALIDAD.

En el presente trabajo, se propone el uso de algunas metodologías específicas, adecuadas a la naturaleza del o los principios activos contenidos en los productos naturales existentes en el mercado, para que estos cumplan con especificaciones mediante un control analítico sin importar su procedencia.

2. ANTECEDENTES

2.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Históricamente, se puede reconocer que las plantas medicinales representan en el mundo entero un tesoro conocido y utilizado desde los tiempos más remotos. Los estudios del mundo primitivo a este respecto indican que la búsqueda y recolección de las plantas utilizadas para curar estaban a cargo de los hechiceros, magos y médicos de las tribus (Bouissou, 1973).

Por otra parte, en el siglo I de nuestra era, Dioscórides, el médico griego dio a conocer el primer tratado (*De Materia Medica*) en el cual se describen 600 plantas medicinales, y sirvió de guía en los siguientes 1600 años. Su descripción es tan imprecisa que algunas plantas en la actualidad no se han identificado (Bouissou, 1973). En China existen más de 270 libros escritos en diferentes épocas, sobre este tema; los más importantes son: El *Materia Médica* de Shen-lung, escrito entre los siglos I y II; la primera farmacopea publicada por las autoridades gubernamentales en el siglo VII (Shih-Lin, 1977); el compendio escrito por Li-chen-chen (1518-1593), que da a conocer Shen-sung Pen tsao ching, en el cual ya se menciona a la "chalmoogra" para curar la lepra, el ginseng que se consideró afrodisíaco en el siglo XVI (Marini, 1981; Bouisou 1973) y el de plantas ilustradas, recopilado por Wu Chi-chun en el siglo XIX (Shih-L, 1977). En México se tienen reportes del uso de plantas medicinales desde la época prehispánica. Esto está descrito en los códices que dejaron los antiguos pobladores, principalmente los Mexicas (Anzures, 1981). El libro más importante sobre medicina de aquella época es el *Códice Badiano*, escrito en 1552 en lengua náhuatl por Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano, donde se describe un sinnúmero de plantas utilizadas en el tratamiento de enfermedades (Anzures 1982). El conocimiento de la flora medicinal indígena, se encuentra disperso en muchas publicaciones; tal es el caso de la obra de fray Bernardino de Sahagún, conocida como *Historia de las cosas de la Nueva España*, obra escrita en castellano. Gran

parte de esta obra esta tomada de los códigos Florentino y Matritense (Anzures, 1982). Las plantas medicinales mexicanas han sido tradicionalmente usadas por nuestro pueblo y actualmente constituyen una de las manifestaciones del acervo cultural que nos legaron nuestros antepasados, su uso tan extendido en diferentes grupos étnicos del país representa la única fuente de información con la que contamos para conocer la manera en que los campesinos y diferentes grupos étnicos solucionan sus problemas de salud, sobre todo en aquellas zonas donde la medicina occidental no ha llegado. Sin embargo, a pesar de la tradición tan arraigada y la vasta utilización que el pueblo mexicano hace de las plantas medicinales, la información al respecto no está disponible, ya que en la mayoría de los casos el conocimiento se transmite verbalmente de una generación a otra, y por otra parte, su mayor cúmulo de conocimientos ha quedado en manos de curanderos, por lo que los etnobotánicos se han dado a la tarea de recopilar el uso de plantas medicinales en nuestras diferentes comunidades étnicas (Anzures, 1982).

La historia de medicamentos derivados de plantas como la morfina a partir del opio, data de 1805 (Sliverman, 1943), suceso que marcó el principio del aislamiento de diversas sustancias activas de plantas medicinales; sin embargo, el resultado de esto fue el descrédito para la medicina vegetal entre los médicos y entre los enfermos, ya que pronto se convencieron, de que la administración de remedios vegetales en forma de polvos o de preparaciones "galénicas" presentaba inconvenientes graves: ¿se habría recolectado la planta en la época adecuada?, ¿en el lugar conveniente?, ¿se habría conservado en las condiciones adecuadas?, ¿sería la variedad más eficaz?, ¿cómo saber que ésa era la planta y no otra?. Por otra parte, la química de síntesis cada vez tomo más auge, y por último, el espíritu científico no permitía seguir usando medidas imprecisas, ni recetas empíricas con dosificaciones imprecisas (Bouissou, 1973).

Sin embargo, el empleo de las plantas medicinales como atención primaria a la salud, se siguió practicando en la mayoría de las sociedades del mundo, donde su uso permaneció como parte de las tradiciones de cada pueblo, y en muchos casos por ser más accesible que la medicina alopática (Akerle, 1988). Por esta razón, renació el interés por el estudio de las plantas medicinales (Peigen, 1988), integrándose equipos de investigadores que se han avocado a revisar viejos escritos y cartapacios de médicos y herbolarios de siglos pasados, consultando a los curanderos sobre qué es, cómo se usa y qué parte es la importante (Bouissou, 1973).

Sin contar con los medicamentos obtenidos a partir del procesamiento industrial de plantas medicinales, para 1988 se había calculado en 1500 millones de seres humanos que recurren a la medicina y terapia tradicionales de las cuales el 95% son terapias de origen vegetal (ONU, 1988). Por otra parte cerca del 60 por ciento de las prescripciones farmacéuticas de los países industrializados contienen productos naturales (Hersch, 1996) y más de 500 plantas son utilizadas como materia prima para la elaboración de medicamentos en la medicina dominante (Grünwald, 1995). En el cuadro 1 se mencionan fármacos derivados de plantas medicinales, utilizados en la medicina occidental.

Para una introducción a seguir dentro de la estandarización de la recolección de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud, creó en 1975 el Programa de Promoción y Desarrollo de la Medicina Tradicional, impulsado por el ejemplo de China, ya que ésta había solucionado sus problemas de salud, combinando los medicamentos alopáticos con fitofármacos. Posteriormente publicó una Guía para la Estandarización de Plantas Medicinales (Hersch, 1996; Marini, 1981).

Cuadro 1. Fármacos derivados de plantas medicinales

| | | |
|-------------|--------------------|-----------------------|
| *Alantoína | emetina | protoveratrinas A & B |
| atropina | *efedrina | pseudoefedrina |
| bromelina | leurocristina | quinina |
| *cafeína | α -lobelina | quinidina |
| codeína | morfina | reserpina |
| colchicina | narcotina | escopolamina |
| deserpidina | *papaverina | esparteína |
| digitoxina | picrotoxina | *teobromina |
| *L-dopa | pilocarpina | teofilina |

*Productos industrializados por síntesis (Farnsworth, 1990)

2.2. SITUACIÓN DEL MERCADO DE FITOFÁRMACOS

En Europa, actualmente se está produciendo una vuelta a la fitoterapia, como muestran claramente las cifras del mercado. En 1995, el consumo de fitofármacos en algunos países europeos alcanzó los 6000 millones de dólares gastados en fitomedicamentos. En el cuadro 2 se mencionan algunas cifras de la comercialización de fitofármacos. (Brevoort 1996).

Cuadro 2. Millones de dólares gastados en fitofármacos en 1995

| Países | Millones de dólares |
|-----------------|---------------------|
| Alemania | 2500 |
| Francia | 1600 |
| Italia | 600 |
| Resto de Europa | 1300 |
| Asia | 2300 |
| Japón | 2100 |
| Estados unidos | 1500 |

Brevoort, 1993.

2.3. SITUACIÓN DE LAS PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO

En un tiempo existió una gran demanda externa de productos herbolarios mexicanos por las industrias procesadoras extranjeras. Actualmente, nuestro país continua siendo fuente de productos herbolarios como el cuachalalate, el áloe, la ortiga etc., sin embargo ha habido un decremento en la exportación e incremento en la importación por la competencia de ventas con otros países (Hersch, 1996).

Dada la crisis económica que atraviesa el grueso de nuestra población desde fines de 1994, y debido al aumento de enfermedades transmisibles, la alternativa domestica o tradicional, en busca de una cura para las enfermedades, ha estado representada por el uso nacional de plantas medicinales como recursos accesibles ante la crítica situación mencionada.

El sistema médico científico oficial empleó en una época de manera común a las plantas medicinales. Tal es el caso de la raíz de Jalapa que se menciona en la Farmacopea Mexicana de 1952, ésta fue sustituida por diversos laxantes industrializados con dosis estandarizadas y efectos conocidos (Hersch, 1996).

Sin embargo, las plantas medicinales contienen productos farmacológicos activos, variables y tienen la ventaja de que se pueden obtener en estado silvestre, a un costo bajo y en la mayoría de los casos son auto prescritas. Otra ventaja de las plantas medicinales es que son blandas, caseras, útiles y accesibles. En México, como país heredero de una rica tradición en el uso de las plantas medicinales, éstas se emplean como primer recurso para problemas que no alteran la vida normal o ponen en peligro la vida (Vargas, 1993).

El interés por el consumo de fitomedicamentos es un fenómeno que particularmente ocurre en las áreas urbanas, donde la población busca los productos medicinales naturales. En los últimos años, ha aumentado notablemente el interés sobre las propiedades curativas de las plantas medicinales tanto en las

instituciones de educación como por las autoridades del sector salud, hecho de importancia, ya que anteriormente, la investigación de plantas medicinales había quedado rezagada y olvidada, por lo que de las 30,000 especies (aproximadamente) utilizadas en la medicina tradicional (Hersch, 1996), para 1993 solo el 1.5% de las ellas contaban con estudios sobre el contenido químico o actividad biológica (Lozoya, 1993).

En nuestro país han surgido compañías que procuran competir en la producción de fitomedicamentos, diseñando productos cuya presentación comercial depende del grado de acceso que se tenga a la tecnología moderna y a la información en el ámbito nacional; estos fitomedicamentos como ya se mencionó antes, se fundamentan en el uso tradicional que los mexicanos hacen de la herbolaria prehispánica y colonial, apoyados en la antigua bibliografía sobre plantas medicinales como *Materia Medica Mexicana*, las *Farmacopeas Mexicanas* de 1884, 1896, 1925, etc. y se enfrentan a la dificultad de obtener los registros legales correspondientes que permitan su libre acceso al mercado moderno. La gran mayoría de las plantas que se emplean para la elaboración de estos productos se colecta en zonas del país donde crecen en forma SILVESTRE, ya que son pocas las plantas medicinales que se cultivan en México con fines agroindustriales, de ahí que la variabilidad de la concentración del o de los principios activos sea amplia en las plantas recolectadas.

Pendientes del interés del público consumidor, las empresas nacionales que procuran proveer con novedades que tengan repercusión comercial, introducen, por ejemplo, plantas con efectos diuréticos y ricas en fibras, para quienes buscan bajar de peso o bien, elaboran antitusígenos, antidiarreicos y espasmolíticos, basándose en recetas de las farmacopeas mexicanas de tiempos pasados. Estas circunstancias determinan el cuadro general que tiene el consumo de plantas medicinales en el México actual y que va desde el ancestral puesto de hierbas frescas en muchos mercados del país, hasta el consumo de productos procesados

industrialmente con muy diversos niveles de calidad y fundamentos, pero que se distribuyen en los mercados urbanos. En los últimos años y ante la carencia de una legislación adecuada, han ingresado al país cientos de fitomedicamentos de origen extranjero que, de igual manera, dependiendo de la capacidad tecnológica y económica de las industrias que los fabrican, ofrecen multitud de alternativas para el manejo de los problemas de salud más comunes, pero cuya validez científica es igualmente dudosa (Hersch, 1996; Lozoya; 1993).

Por otra parte, en México también tuvo repercusión la propuesta de la OMS surgida en los años setenta de revalorar la medicina tradicional y sus plantas medicinales. Aunque en grado insuficiente y con numerosas dificultades, algunas instituciones mexicanas como el IMSS, UNAM, IPN han venido realizando estudios de investigación etnobotánica, de farmacología y de química de plantas medicinales (Lozoya, 1993).

El nivel de conocimientos científicos de los recursos herbolarios nacionales es aún deficiente, en comparación con lo logrado en otros países, ya que son pocas las plantas medicinales que han podido cursar por las diferentes etapas del proceso de investigación que exigen los actuales lineamientos oficiales y que son los que determinan la aceptación formal de un medicamento. Estos lineamientos, habiendo sido elaborados desde la perspectiva de la industria químico-farmacéutica internacional hace ya muchos años, no contemplaban aún el desarrollo y uso de medicamentos herbolarios. El desinterés oficial en tantos años por la herbolaria nacional se ha reflejado en una legislación que hoy resulta inadecuada y en la falta de información accesible a los médicos sobre temas de herbolaria. Se requiere conducir acciones concretas no sólo para promover la investigación nacional de las plantas medicinales y lograr un mejor manejo de los productos herbolarios existentes, sino también para afrontar la embestida comercial de productos extranjeros que, con las características antes mencionadas, influiría irremediablemente en el mercado de medicamentos en los años venideros.

En la legislación mexicana actual se considera a los medicamentos hechos a base de plantas como medicamentos herbolarios o como remedios herbolarios. El Diario Oficial en septiembre de 1998, dentro del reglamento para los Insumos para la Salud publicó que los medicamentos herbolarios están contemplados en los artículos 66-71, los remedios herbolarios contemplados en los artículos 88 al 98, su almacenamiento en los artículos 110 al 120 y para su registro en el artículo 174.

El reglamento referente a las plantas medicinales pretende avanzar en el diseño de una estrategia que permita incorporar algunos de estos recursos en la medicina moderna, también ante la presencia en el mercado de productos medicinales herbolarios nacionales y extranjeros, estos deben cumplir con registro apropiado para su venta. Para resolver las limitaciones que en materia legal presenta el registro y reconocimiento de los productos elaborados a base de plantas medicinales, es necesaria la creación de monografías para unificar criterios y a su vez proteger al consumidor de que el producto tenga una calidad aceptable. En nuestro país hay un proyecto para la elaboración de una Farmacopea de Plantas Medicinales (Navarrete, 2000), la cual incluirá las plantas mas comercializadas en nuestro país.

Los criterios generales para guiar la formulación de las normas técnicas deben apoyarse en la experimentación e información científica que durante todos estos años ha sido reunida en el país por los diversos grupos de investigación y que incluyen aspectos muy diversos. Por ejemplo el de tipo botánico, tales como: la clasificación de la planta utilizada, incluyendo género y especie para asegurar su correcta identificación taxonómica; la definición y la descripción de la parte del vegetal considerada medicinal y la forma y el lugar en donde se colecta; el análisis del contenido microbiano del material vegetal, así como las condiciones de su cultivo (uso de insecticida, fertilizantes, calidad del agua y otros). También es necesario conocer los aspectos de tipo fitoquímico y farmacognósticos de los medicamentos herbolarios y que son parte fundamental para el procedimiento de

su manufactura para garantizar la estandarización y consistencia en la calidad de la preparación.

La información sobre las propiedades curativas del medicamento herbolario debiera integrar una monografía que comprenda los aspectos etnobotánicos, farmacológicos, químicos, toxicológicos y clínicos de las plantas medicinales que integran el producto o, en su caso, de la preparación propuesta. Ante la carencia de estudios toxicológicos específicos, el principio rector debería ser que si el producto ha sido tradicionalmente usado durante mucho tiempo sin que se demuestren aparentes daños, deberá documentarse si existieren riesgos por sobredosificación, las posibles contraindicaciones y los efectos indeseables (Villar del Fresno, 1996).

2.4. RECOLECCIÓN, SECADO Y CONSERVACIÓN DE DROGAS-VEGETALES

La recolección de plantas medicinales requiere de cuidados particulares; ante todo es preciso estar siempre seguros de que la especie recolectada sea exactamente la deseada. Es conveniente saber qué parte o partes de la planta es la que contiene él o los principios activos, cuál es el período de recolección más favorable que es el llamado período balsámico, que por lo general, aunque con muchas excepciones, corresponde al momento en que los órganos contienen una cantidad mayor de principios activos, son más turgentes y han alcanzado su máximo esplendor (D`Andreta 1972).

La recolección se realiza cuando el tiempo es seco y cálido, y las plantas no están cubiertas de rocío.

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de una raíz por lo que sólo discutiremos los cuidados para la recolección de ésta. Comúnmente, se considera como raíces a todos los órganos vegetales que se encuentran bajo tierra; en realidad, ello es cierto en la mayoría de los casos, pero a veces son tallos

transformados, como los tubérculos de las cebollas. Dichos órganos deben sacarse del suelo con la máxima precaución para dañarlos lo menos posible. La época balsámica de las raíces de las plantas anuales precede al período de floración correspondiente a otoño e invierno. Las raíces y demás partes subterráneas deben quedar inmediatamente limpias de tierra. Si el terreno es arenoso, esto se consigue con facilidad simplemente sacudiéndolas, pero si el suelo por el contrario es arcilloso, es necesario recurrir al lavado, el cual, sin embargo, debe ser breve, inmediato a la recolección y seguido de un cuidadoso secado. Si las raíces son demasiado grandes se cortan en rodajas y se disponen sobre una tela, en una sola capa, y se dejan secar expuestas al sol, o bien a la sombra, pero en lugares aireados, o se colocan en hornos cuya temperatura no rebase los 50-60 °C. Si el secado no es perfecto, la composición puede alterarse fácilmente, puede sufrir fermentaciones, ser atacada por hongos o sufrir degradaciones por enzimas presentes en la misma planta (D'Andreta 1972).

Tras el secado, las raíces se depositan en recipientes de vidrio, bolsas de papel o celofán. Surge, entonces el problema de su conservación. Las causas principales de su alteración son: la luz, la humedad, los insectos y algunos roedores. Las plantas deben guardarse siempre en la oscuridad porque la luz, aunque sea poco intensa, las decolora y, lo que es aún más grave, altera los principios activos que contienen. La humedad produce el ennegrecimiento, favoreciendo las fermentaciones causantes de olores desagradables, así como el desarrollo de los mohos. A veces, cuando las plantas son muy higroscópicas, basta una ligera humedad, como la existente en un local seco, para que se enmohezca con facilidad. Las drogas, especialmente si contienen almidón, pueden ser atacadas por insectos, que las ensucian con excremento, y excavan en ellas sus galerías (D'Andreta 1972).

Aunque se tomen todas las precauciones debemos tener en cuenta que las plantas no se conservan inalteradas durante tiempo indefinido. De hecho, la

eficacia de los principios activos que contienen se pierde con el tiempo, pues éstos son más a menos volátiles (D'Andreta 1972).

2.5. FALSIFICACIÓN DE LAS DROGAS

Cuando se adquiere una droga puede sospecharse que haya sido adulterada, es decir que esté mezclada con fragmentos de plantas extrañas a ella. Con mucha experiencia puede descubrirse esta parcial o total sustitución a primera vista; de otro modo debe recurrirse a exámenes específicos, a veces largos y complicados. Para su identificación se debe tomar en cuenta el olor, color, sabor, dimensiones y forma, así como examinarlas con lupa, al microscopio, someterlas a pruebas físicas, químicas e incluso biológicas, que requieren conocimientos muy profundos (Nadinic, 1996).

La adulteración puede ocurrir con plantas similares que tienen la misma acción terapéutica, pero en otros casos el efecto de la planta similar es nulo y en el caso más dramático, la adulteración causa problemas al paciente. De ahí la importancia de estandarizar o validar las plantas medicinales que se comercializan en nuestro país sin ningún tipo de controles, ni estudios previos.

En algunos países como España se entiende por "Validación", referido a especies vegetales, a la serie de conocimientos y pruebas experimentales que puedan permitir tener la razonable garantía sobre la seguridad y eficacia en su proyección terapéutica al ser humano. En los distintos países, la legislación sobre ensayos farmacológicos (experimentales y clínicos) se realizan como hecho imprescindible antes de la comercialización (Villar del Fresno, 1996). Pero estos protocolos pueden encarecer enormemente los gastos de comercialización de tal forma que una droga podría llegar a costar, de 10 a 50 millones de dólares (Tyler 1993), por otro lado, la dificultad de obtener una patente ocasiona que la recuperación de la inversión sea poca.

Villar del Fresno (1996), señala como problema que los preparados fitofarmacéuticos sean por lo general mezclas complejas de plantas y que por otra parte, no es aún satisfactoria la experiencia desarrollada para validar fehacientemente la mayoría de las especies.

En este mismo sentido y referido a la situación en Inglaterra, el Comité para la Revisión de Medicamentos no acepta evidencias anecdóticas como prueba de eficacia y seguridad de plantas que han sido utilizadas tradicionalmente para tratamientos de síntomas patológicos, sino que exige la presentación de publicaciones que establezcan con evidencia la mencionada eficacia. En cuanto a la seguridad (toxicidad) no es obligatorio desarrollar la experimentación, pero sí lo es el indicar que no existe ninguna referencia en la literatura relacionada con la toxicidad de la planta o del grupo o de algunos de los constituyentes. Como es lógico, esto representa una gran dificultad y existe además la imposibilidad práctica de una revisión total. Otro problema lo constituye lo referente a la dosificación, que a su vez está relacionada con la calidad y ésta con la capacidad de establecer patrones analíticos confiables, ya que aunque esté claramente establecida la identificación de la especie de un material, ésta puede variar en su composición por diversos factores tales como: clima, tipo de suelo, latitud y por lo tanto sin los patrones analíticos, no se puede desarrollar un control estricto (Villar del Fresno, 1996).

Con base en el uso tradicional de las plantas, tanto en el área analítica como en la fitoquímica biodirigida moderna, se puede hacer una regulación que no sea tan estricta como en el caso de los fármacos de nueva comercialización o registro. El estudio fitoquímico biodirigido diría cuales son los principios activos responsables de la actividad, que a su vez se utilizarían como sustancias marcadoras de la calidad de la planta.

2.6. ANTECEDENTES DE *Iostephane heterophylla*

Iostephane heterophylla (Cav.) Hemsl pertenece a la familia Asteraceae, se conoce con el nombre de Escorzonera (Escorcionera), en el norte de la república y en el Estado de México (Bye, *et al.*, 1987; Martínez, 1989); raíz del manso en el estado de Hidalgo (Villavicencio, 1995); hierba de oso, hierba del manso (Argueta, *et al.*, 1994). Es una planta herbácea perenne de 60 cm de largo, de raíz tuberosa, las hojas radicales, lobuladas, ásperas; flores en cabezuelas lilas, con largo pedúnculo y florece en septiembre. Originaria de México. Habita en climas semiseco y templado, asociado a matorrales, xerófilo, bosques de encino y de pino, en la figura 2 se muestra a *I. heterophylla* en su hábitat natural. Se distribuye en el Valle de México, Estado de México, Puebla, Jalisco, Chihuahua, San Luis Potosí, Hidalgo, Durango, etc. La Figura 1 muestra la distribución geográfica de *I. heterophylla* en la República Mexicana.

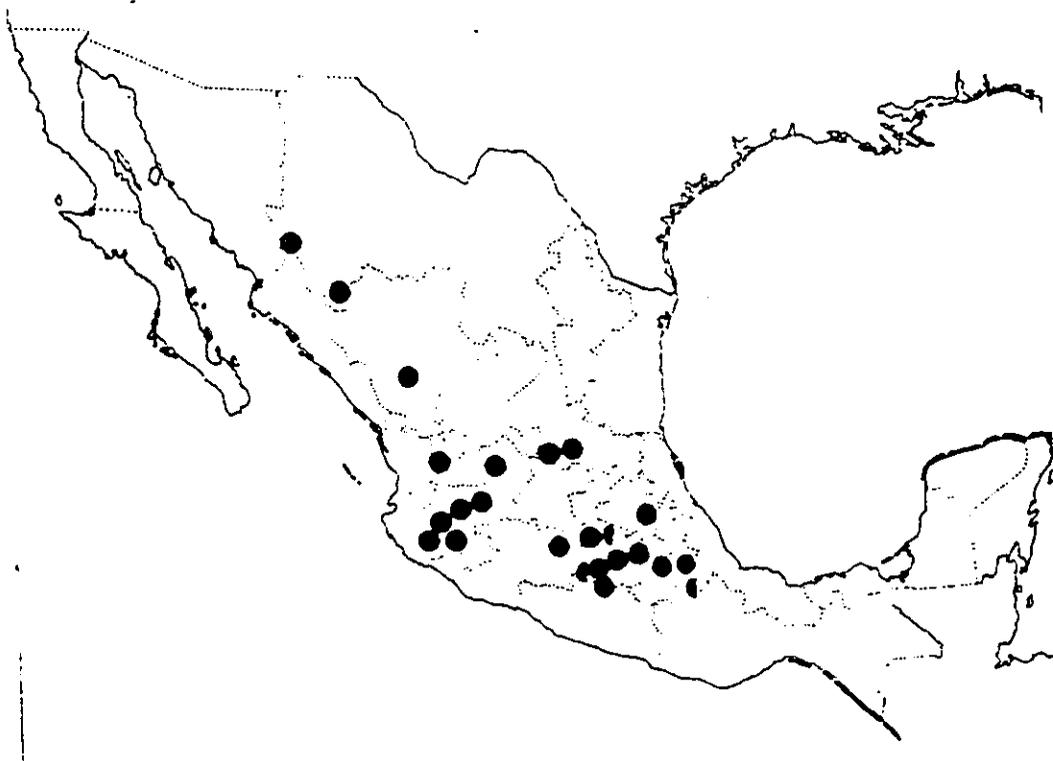


Figura 1. Distribución geográfica de *I. heterophylla* (Jerzy, 1978)

Iostephane heterophylla es una planta que está muy relacionada con *Iostephane madrensis*, al punto que muchos usuarios las confunden y las usan indistintamente. De hecho, ha sido considerada como componente del "complejo cachana", a pesar de que se conoce como escorcionera, sus usos incluyen el tratamiento de afecciones cutáneas, para heridas y llagas en forma de emplastos y para quitar verrugas; para aliviar reumatismo y artritis por frotación de una tintura alcohólica o el extracto acuoso en las articulaciones, y como té, para tratamientos de la diabetes, desórdenes gastrointestinales y padecimientos del hígado y finalmente para la esterilidad como componente del complejo cachana (Aguilar et al., 1993).

La raíz seca con el cuachalalate, el arnica, la yerba mora y la siricua constituyen los ingredientes del té "úlceros" el cual es muy popular en la ciudad de Chihuahua para curar úlceras estomacales (Bye, 1986). También es utilizada en combinación con flor de tila, hierba de teñir (*Dydimaea alsinoides*) para los dolores musculares, para el dolor de huesos solo se emplea la maceración de la raíz untada por todo el cuerpo (Argueta, 1994).

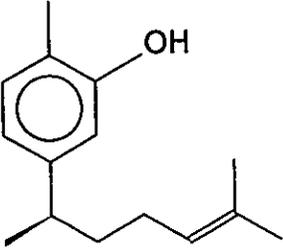
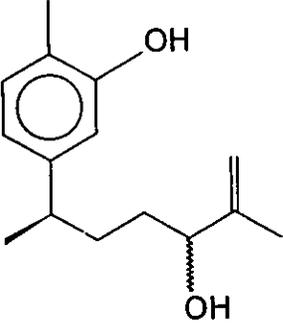
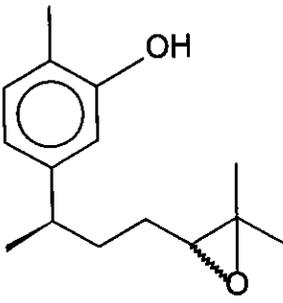
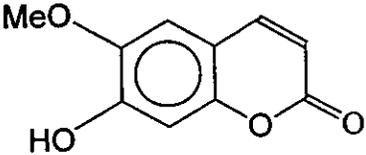
En el estado de Morelos el cocimiento de la planta suele utilizarse en el temascal para baños posparto (Argueta, 1994). En el siglo XVI Francisco Hernández relata los usos de la raíz de *I. heterophylla* para afecciones renales, alcalinizante, y antipalúdico, para la inflamación de la garganta y tónico aromático y en el siglo XX, la Sociedad Farmacéutica de México la señala como antidisentérico y pectoral (Argueta, 1994).

Estudios químicos han confirmado la presencia de los metabolitos secundarios contenidos en las raíces de la planta, mismos que se mencionan en el Cuadro 3.

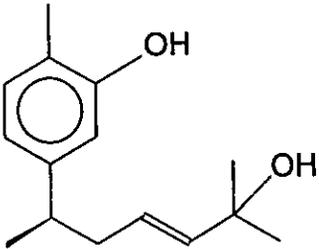
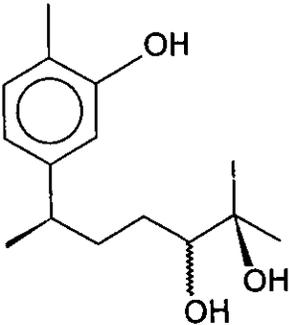
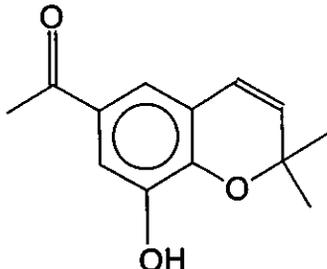
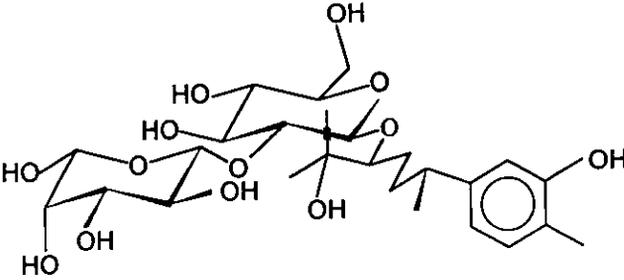


Figura 2. *Iostephane heterophylla* (Cav.) Hemsl.

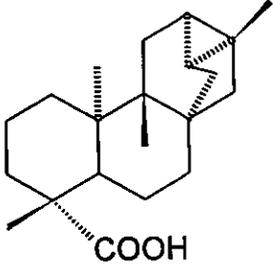
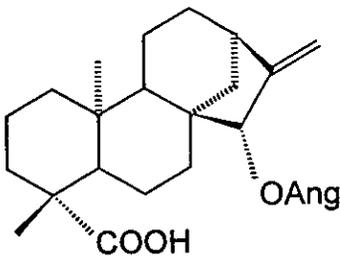
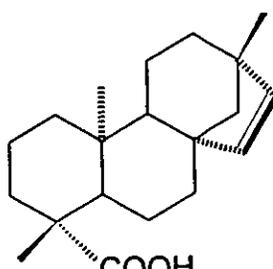
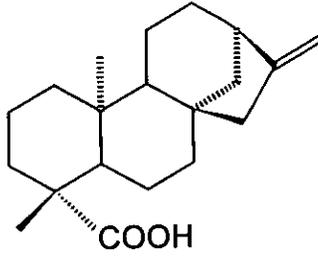
Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de la raíz
de *Iostephane heterophylla*

| Nombre y fórmula | Referencias |
|---|--|
|  <p data-bbox="355 685 526 721">Xantorrizol</p> | <p data-bbox="881 379 1161 414">Rimpler <i>et al.</i>, 1970</p> <p data-bbox="886 430 1156 466">Aguilar <i>et al.</i>, 1993</p> |
|  <p data-bbox="133 1120 762 1156">12,13-dihidro-12-hidroxi-13-en-xantorrizol</p> | <p data-bbox="890 737 1161 772">Aguilar <i>et al.</i>, 1993</p> |
|  <p data-bbox="172 1527 734 1562">12,13-dihidro-12,13-epoxi-xantorrizol</p> | <p data-bbox="899 1168 1170 1203">Aguilar <i>et al.</i>, 2000</p> |
|  <p data-bbox="359 1777 556 1813">escopoletina</p> | <p data-bbox="905 1574 1176 1609">Aguilar <i>et al.</i>, 1993</p> <p data-bbox="878 1626 1206 1661">Shafizadeh <i>et al.</i>, 1970</p> <p data-bbox="883 1678 1202 1713">Ballantyne <i>et al.</i>, 1971</p> <p data-bbox="920 1730 1164 1765">Dean <i>et al.</i>, 1969</p> |

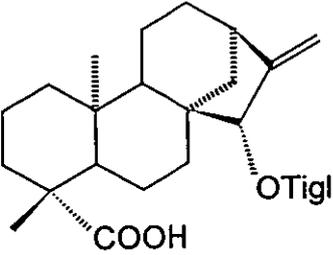
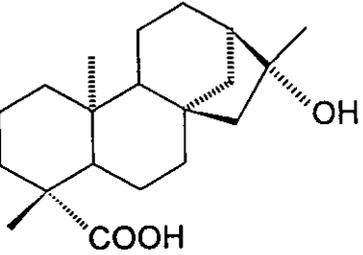
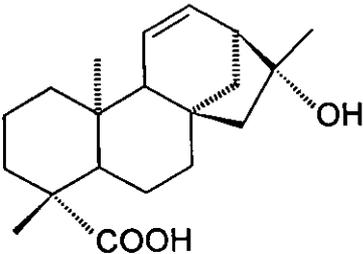
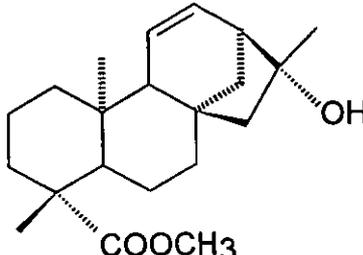
Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de la raíz
de *Iostephane heterophylla*

| Nombre y fórmula | Referencias |
|--|--|
|  <p>12, 13-dihidro-13-hidroxi-11-en-xantorrizol</p> | Aguilar <i>et al.</i> , 1993 |
|  <p>12, 13-dihidro-12,13-dihidroxi-xantorrizol</p> | Aguilar <i>et al.</i> , 2000 |
|  <p>8-hidroxi-6-acetil-2, 2-dimetil-cromeno</p> | Aguilar <i>et al.</i> , 1993 Bohlman <i>et al.</i> , 1978 |
|  | Aguilar <i>et al.</i> , 1995 |

Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de la raíz de *Iostephane heterophylla*

| Nombre y fórmula | Referencias |
|---|---|
|  <p>Ácido traquiloban-19-oico</p> | <p>Pyrek <i>et al.</i>, 1970 Herz <i>et al.</i>, 1983 Bohlman <i>et al.</i>, 1978 Aguilar <i>et al.</i>, 1993</p> |
|  <p>Ac.15α-angeloiloxi-<i>ent</i>-Kaur-16-en-19-oico</p> | <p>Bohlman <i>et al.</i>, 1977 Hertz <i>et al.</i>, 1983 Aguilar <i>et al.</i>, 1993</p> |
|  <p>Ácido <i>ent</i>-beyer-15-en 19-oico</p> | <p>Henrick <i>et al.</i>, 1964 Herz <i>et al.</i>, 1976 Oberti <i>et al.</i>, 1980 Aguilar <i>et al.</i>, 1993</p> |
|  <p>Ácido <i>ent</i>-kaur-16-en-19-oico</p> | <p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993</p> |

Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de la raíz
de *Iostephane heterophylla*

| Nombre y fórmula | Referencias |
|---|--|
|  <p>Ac15α-tigloiloxi-ent-kaur-16-en-19-oico</p> | <p>Bohlman <i>et al.</i>, 1977 Hertz <i>et al.</i>, 1983 Aguilar <i>et al.</i>, 1993</p> |
|  <p>16α hidroxí-ent-kaurano</p> | <p>Herz <i>et al.</i>, 1982</p> |
|  <p>Ácido 16α-hidroxí-ent-kaur-11-en-19-oico</p> | <p>Herz <i>et al.</i>, 1982 Ohno <i>et al.</i>, 1981 Aguilar <i>et al.</i>, 1993</p> |
|  <p>Ester metílico del ácido 16α-hidroxí-ent-kaur-11-en-19-oico</p> | <p>Hertz <i>et al.</i>, 1982 Herz <i>et al.</i>, 1983 Aguilar <i>et al.</i>, 1993</p> |

Por otra parte, estudios previos de actividades antimicrobianas (Aguilar *et al.*, 1995) han demostrado que los extractos etanólico y clorofórmico de la raíz de *I. heterophylla* presentan actividad significativa, como se indica en los Cuadros 4 y 5.

Cuadro 4. Resultados de bioensayos antimicrobianos de los extractos de *I. heterophylla*. Diámetros de halos de inhibición en mm

| Microorganismos de prueba | Ext. clorofórmico (100ppm) | Ext. etanólico (100 ppm) | Sulfato de estreptomicina (100 ppm) | Nistatina |
|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|-----------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | 6 | 8 | 20 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 6 | - | 18 | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 8 | - | 22 | - |
| <i>Escherichia coli</i> | - | - | 12 | - |
| <i>Candida albicans</i> | 15 | - | - | 20 |

Cuadro 5. Resultados de los bioensayos antimicóticos con extractos de raíz de *I. heterophylla* CMI en µg/mL

| Microorganismos de prueba | Extracto clorofórmico | Extracto etanólico | Nistatina |
|------------------------------------|-----------------------|--------------------|-----------|
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 1500 | 3000 | 8-10 |
| <i>Microsporum gypseum</i> | 1500 | 3000 | 8-10 |

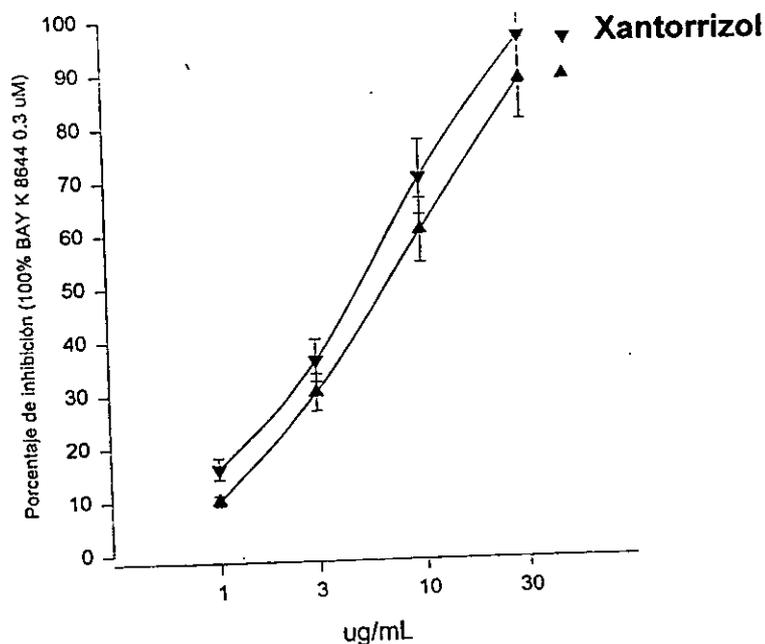
También se detectó que el compuesto responsable de la actividad antimicótica que presentaba la raíz de *I. heterophylla*, es el xantorizol compuesto

mayoritario en los extractos clorofórmicos y etanólicos, como se muestra en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Actividad antimicótica del xantorizol

| Microorganismo de prueba | CMI en $\mu\text{g/mL}$ Xantorizol | CMI en $\mu\text{g/mL}$ Nistatina |
|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Candida albicans</i> | 68.75 | 10 |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 10.0 | 10 |
| <i>Microsporium gypseum</i> | 10.0 | 10 |
| <i>Trichophyton rubrum</i> | 10.0 | 10 |

Por otra parte, el xantorizol inhibe la tonicidad del músculo liso de útero de rata inducida por una solución despolarizante. En la gráfica 1 se observa el efecto inhibitorio, dependiente de la concentración.



Gráfica 1. Inhibición de la contracción inducida del músculo liso de útero de rata por el xantorizol

3. JUSTIFICACIÓN

El mercado mundial de fitofármacos ocupa alrededor de 35 mil millones de dólares anuales (OMS, 1996). El previsible aumento del uso de las plantas medicinales para el cuidado de la salud de los habitantes en nuestro país y el creciente interés en fitofármacos de los países desarrollados son una buena oportunidad para estimular el estudio de ellos. Los fitomedicamentos tienen una amplia aceptación por los consumidores y representan en la actualidad un mercado en crecimiento en todo el mundo (Villar del Fresno, 1996). Algunos de los problemas relacionados con el poco o ningún desarrollo de fitofármacos en la industria farmacéutica basada en plantas son:

- * Poco reconocimiento del beneficio económico, social y médico, de esta industria.
- * Poco conocimiento tecnológico para la fabricación de fitofármacos.
- * Escasa prescripción de fitomedicamentos por el sector salud.
- * Ausencia de política nacional o sectorial que estimule la producción y uso de fitomedicamentos.
- * Falta de métodos y procesos de control y estandarización de fitomedicamentos.
- * Dificultad de obtener las plantas con la calidad y en la cantidad requerida.
- * Falta investigación y desarrollo en las áreas de tecnología agrícola, farmacéutica y terapéutica relacionada con plantas medicinales.
- * Problemas de registro de fitomedicamentos.
- * Desconocimiento del mercado y falta de promoción de los productos.
- * Poco incentivo gubernamental a esta Industria.

Por lo anterior, es necesario elaborar y preparar monografías sobre plantas medicinales, lo cual facilitaría su industrialización y comercialización. Así mismo, se promovería la investigación de los fitofármacos, la fitoterapia y la armonización de su estatus regulatorio.

En el caso particular de *I. heterophylla* es una planta que se conoce desde hace siglos la cual ha sido y es empleada para curar algunos síntomas, como: dolores musculares, dolores pulmonares, para la cicatrización de heridas, para los baños de temascal después del parto, para la infertilidad; la raíz seca sola o en preparados con otras plantas medicinales se vende en algunos mercados sin ningún control. Por lo anterior es necesario reglamentar la venta y uso de esta raíz ya que puede ser adulterada, en el mercado ya que existe similitud con los componentes del complejo cachana.

4. OBJETIVO GENERAL

Generar el conocimiento sobre pruebas específicas que demuestren la calidad de la raíz de *Iostephane heterophylla* como materia prima de origen vegetal, que cumple con las especificaciones generales establecidas en algunas farmacopeas, para su procesamiento en la obtención de fitomedicamentos.

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

- Investigación bibliográfica sobre *Iostephane heterophylla*.
- Identificación macro y microscópica del material vegetal y pruebas histoquímicas.
- Determinación de humedad, metales pesados, cenizas totales e insolubles en ácido y material extraño.
- Determinación de contaminación microbiana.
- Determinación del material extraíble por diferentes disolventes.
- Determinación de la concentración de los fenoles presentes en la raíz del material vegetal, por espectrofotometría.
- Identificación del Xantorizol dentro del material extraíble por cromatografía en capa delgada.

5. METODOLOGÍA

Los procedimientos descritos a continuación son los recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1987) para el control de calidad de drogas vegetales. Algunos de ellos, ya se encuentran incluidos en la edición vigente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM, 1994, 2000) USP XXIII y en la Farmacopea Europea 1993.

5.1. MATERIAL VEGETAL

En todas las determinaciones, se analizó una muestra de material vegetal (raíz) el cual fue recolectado en el Estado de Puebla e identificado por el Dr. R. Bye y Linares 26535. Una muestra de referencia se depositó en la colección etnobotánica del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, y el Herbario Nacional (MEXU). La muestra de *Iostephane heterophylla* fue secada a temperatura ambiente y una parte de ella molida, en un molino de cuchillas modelo Willey 4, con malla No. 3.

Para un mejor entendimiento se enumeraron las determinaciones que se hicieron a la raíz de *Iostephane heterophylla*.

5.2. IDENTIFICACIÓN MICROSCOPICA

Del material seco se tomó una muestra para lo cual, la raíz se cortó en rodajas, tomándose únicamente la parte central. Dichas rodajas se partieron posteriormente en forma de rebanadas de pastel (este experimento se esquematiza en la Figura 3) y se sumergieron en una solución de glicerina, alcohol y agua 1:1:1 (GAA) durante 30 días, para ablandar el tejido (López, 1998). Posteriormente, se realizaron dos experimentos: con la técnica de disociados y con la técnica de cortes en material completo de la raíz de *Iostephane heterophylla*.

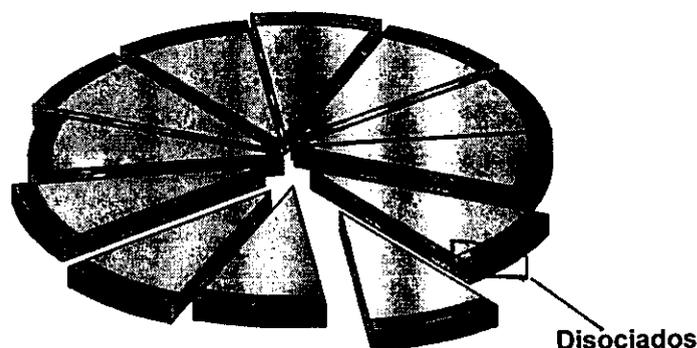


Figura 3. Cortes a la raíz para las técnicas de disociados y de cortes en material completo.

5.2.1 Técnica de disociados:

Transcurrido el tiempo de ablandamiento, se tomó una pequeña parte de la orilla de la raíz junto a la corteza y un pedazo de corteza y se cortaron en pequeños trozos de aproximadamente 3 a 4 mm de largo, como se muestra en la Figura 3; las muestras se sumergieron en una solución de ácidos 1:1 (ácido crómico al 10% y ácido nítrico al 10%), durante 18 días a 25 °C. Después de ese tiempo se hicieron preparaciones en glicerol-gelatina, que permitieron la observación al microscopio de las células que conforman la raíz (Trease *et al.*, 1987).

5.2.2 Técnica de inclusión en parafina y cortes

Después del período de ablandamiento con GAA (5.2) se procedió a efectuar una deshidratación de la muestra, con mezclas de alcoholes en las proporciones que se detallan en el Cuadro 7, por un período de cambio de cada 48 horas. El tejido se mantuvo en agitación constante a la temperatura de 25 °C durante todo el proceso de deshidratación, en un frasco de vidrio con tapón.

Todos los cambios se realizaron una sola vez para cada mezcla de alcoholes, excepto con el terbutanol al 100% el cual se utilizó tres veces por períodos de 48 horas (López, 1998).

Cuadro 7. Mezclas de alcoholes para la deshidratación del tejido

| Mezcla | % de alcoholes | mL de H ₂ O | mL de etanol al 96% | mL de terbutanol | mL de etanol al 100% |
|--------|----------------|------------------------|---------------------|------------------|----------------------|
| 1 | 30 | 70 | 26 | 5 | 0 |
| 2 | 50 | 50 | 42 | 10 | 0 |
| 3 | 60 | 40 | 47 | 15 | 0 |
| 4 | 70 | 30 | 52 | 20 | 0 |
| 5 | 85 | 15 | 52 | 35 | 0 |
| 6 | 95 | 0 | 47 | 55 | 0 |
| 7 | 100 | 0 | 0 | 75 | 25 |
| 8 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 |

En el último paso de la deshidratación, se adicionó parafina sobre la mezcla poco a poco por lapsos de una hora, hasta que el volumen de terbutanol se duplicó con la parafina adicionada, controlando la temperatura a 60 °C. Posteriormente se dejó evaporar el terbutanol hasta que el tejido estuvo embebido en parafina pura; se hicieron tres cambios de parafina pura cada 24 horas a 60 °C. Después se hizo la inclusión del tejido en un cubo de papel que contenía parafina líquida dejando solidificar ésta en el refrigerador. Al concluir la preparación del tejido, se realizaron cortes transversales y longitudinales de 20 micras de espesor con el microtomo (López, 1998).

Los cortes se fijaron en el porta objetos con gelatina al 1%. Posterior a la fijación en el porta objetos, se hizo una hidratación en donde la preparación permaneció sumergida por un lapso de 20 minutos en cada una de las mezclas de alcoholes del cuadro 7. Este proceso de desparafinación e hidratación se esquematiza en la Figura 4. A continuación los cortes se tiñeron con safranina por 30 minutos, se lavó el exceso de colorante con agua, y se volvió a deshidratar el tejido con cada una de las mezclas de alcoholes del Cuadro 7 por 2 minutos cada

mezcla; posteriormente se tiñó de verde rápido y finalmente se fijó con resina, se colocó el cubre objetos y se observó la organización del tejido al microscopio (López, 1998).

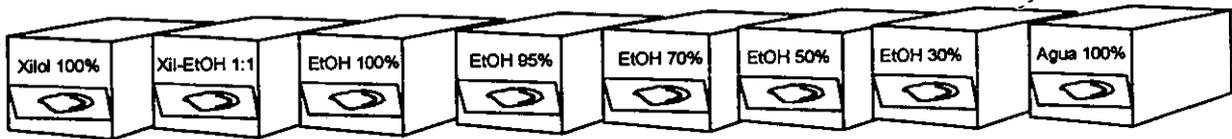


Figura 4. Hidratación del tejido

5.2.3 Pruebas histoquímicas

Para esta prueba se realizaron cortes en fresco de la raíz, transversales y longitudinales, de 40 μm de espesor con un microtomo de deslizamiento, colocando los cortes en los porta objetos a los cuales se les aplicaron diversos reactivos (López, 1998), para la realización de las siguientes pruebas de detección:

5.2.3.1. Detección de almidón

A dos cortes de la raíz de *I. heterophylla*, se les aplicó lugol durante 5 minutos, se observó al microscopio, evitando que la preparación se secase.

5.2.3.2. Detección de lípidos

A dos cortes de la raíz de *I. heterophylla*, se les aplicó rojo "O" durante 25 minutos, se lavó el exceso de colorante con alcohol al 50%, seguido de otro enjuague con alcohol al 30% y por último con agua, se observó al microscopio.

5.2.3.3. Detección de proteínas y polisacáridos

A dos cortes de la raíz de *I. heterophylla* se les aplicó ácido peryódico durante 15 minutos, posteriormente se lavó con agua, y se les aplicó como segundo reactivo una solución de Schiff durante 15 minutos. El tejido se lavó con agua al término del tiempo y por último se le aplicó azul de bromofenol durante 15

minutos; se retiró el exceso de colorante con agua y finalmente se observó al microscopio la presencia de proteínas y polisacáridos.

5.2.3.4. Detección de pectinas

A dos cortes de la raíz de *I. heterophylla* se les aplicó el colorante rojo de rutenio, durante 40 minutos; posteriormente se observó al microscopio.

5.2.3.5 Detección de ligninas

A dos cortes de la raíz de *I. heterophylla* se les aplicó floroglucina y ácido clorhídrico al 25 % al mismo tiempo, se calentó levemente con un mechero de alcohol, y finalmente se observó al microscopio con diferentes aumentos.

5.2.3.6. Detección de polifenoles

A dos cortes de la raíz de *I. heterophylla* se les agregó permanganato de potasio durante 25 minutos, se retiró el exceso de permanganato con agua y se observó al microscopio.

5.2.3.7. Detección de taninos condensados

Dos cortes de la raíz de *I. heterophylla* se tiñeron con cloruro férrico con durante 2 horas, se quitó el exceso de cloruro férrico con agua y se observó al microscopio.

5.2.3.8. Detección de taninos hidrolizables

A dos cortes de la raíz de *I. heterophylla*, se les agregó una solución de sulfato ferroso durante 20 minutos, se retiró el exceso con agua y se observó al microscopio.

5.3. DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS EXTRAÑOS

Para esta determinación se comprobó que la raíz de *Iostephane heterophylla* estuviera exenta de enmohecimiento, de microorganismos, de insectos y de otras

contaminaciones de origen animal, así como de olores anormales, decoloración u otros signos evidentes de deterioro (Trease *et al.*, 1987).

Antes de moler o pulverizar la materia prima, se pesaron 100g de la muestra, y se extendieron en una capa delgada. Los elementos extraños se detectaron por inspección a simple vista o con ayuda de una lupa (X 6), las piedras, polvo, terrones y otros materiales inorgánicos u orgánicos extraños se separaron por medios mecánicos, así como cualquier elemento de la planta que no perteneciera a la parte en estudio. Los elementos extraños se pesaron y se calculó el porcentaje que representan (FEUM 1994). El nivel de elementos extraños no debe ser superior al 2 %.

5.4. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES E INSOLUBLES EN ÁCIDO

5.4.1 Cenizas totales

En un crisol previamente calentado al rojo durante 30 minutos, enfriado en un desecador y tarado, se pesaron aproximadamente 2 g de la droga seca al aire y pulverizada, obtenida para la determinación de elementos extraños. La muestra se precalcinó con un mechero cuidando de no perder material en ningún momento. La incineración se llevó a cabo a $600 \pm 25^{\circ}\text{C}$, hasta que el residuo estuvo libre de carbón. Se enfrió en un desecador y se determinó el peso de las cenizas (FEUM, 2000).

5.4.2 Cenizas insolubles en ácido

El residuo obtenido en la determinación de cenizas totales se colocó en un crisol, y se añadieron 15 mL de agua y 10 mL de ácido clorhídrico concentrado. Se cubrió con un vidrio de reloj e hirvió suavemente durante 10 minutos y se dejó enfriar. Se filtró el residuo en papel filtro libre de cenizas y lavó con agua caliente hasta que el filtrado se neutralizó a pH 7. Posteriormente, el residuo con el papel filtro se calcinó al rojo oscuro, se dejó enfriar en el desecador y se pesó. Se repitió la calcinación hasta que la diferencia entre dos pesadas sucesivas no fuera superior a 1 mg (FEUM, 2000).

5.5. DETERMINACIÓN DE MATERIAL EXTRAIBLE

Este método determina la cantidad de constituyentes extraíbles con diferentes disolventes y se especifica como sustancias extraíbles en hexano, etanol y etanol-agua 7:3 (Trease *et al.*, 1987).

En un matraz Erlemenyer de 250 mL, se introdujeron exactamente 4.0 g de la materia prima seca a temperatura ambiente y pulverizada. Se agregaron 100 mL del disolvente, se agitó constantemente durante las primeras 6 horas y se dejó en reposo hasta que transcurrieron 24 horas. Se filtró rápidamente, sin perder el disolvente. Se transfirieron 25 mL del filtrado a un matraz previamente tarado, y se evaporó a sequedad en un baño de agua. Se secó el residuo a 105°C durante seis horas, enfrió en un desecador durante 30 minutos y pesó. Se calculó el contenido de material extraíble en mg por g de planta medicinal. Esto se hizo por triplicado, con hexano, etanol al 100% y una mezcla de etanol-agua 7:3.(OMS, 1987)

5.6. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE HINCHAMIENTO

En una probeta graduada de 25 mL con tapón esmerilado, cuya graduación dividida en 0.5 mL cubre una altura de 125 ± 5 mm, se introdujo un gramo de la materia prima vegetal molida. Se añadieron 25 mL de agua y 1 ml de alcohol y se tapó la probeta agitando enérgicamente cada 10 minutos durante un período de una hora. Se dejó en reposo durante 3 horas y eliminó la mayor parte posible del líquido retenido al nivel de la droga y las partículas de la misma que flotan en la superficie del líquido por rotación alrededor del eje vertical. Se midió el volumen ocupado por el material vegetal, incluyendo al mucílago que pudiera estar adherido a la misma. Esta prueba se realizó por triplicado (Trease, *et al.*, 1987).

5.7.DETERMINACIÓN DE PERDIDA AL SECADO

Se pesaron aproximadamente 10g de la muestra en una cápsula de porcelana previamente puesta a peso constante y se secó a 105 °C durante 5

horas, se dejó enfriar en un desecador y se pesó. Se continuó el secado, el enfriado y el pesado a intervalos de una hora hasta que la diferencia entre 2 pesadas sucesivas no fuera mayor del 0.25 %. Se calculó la pérdida al secado considerando el peso inicial (Trease, *et al.*, 1987).

5.8. DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS

En un crisol a peso constante se colocaron 250 mg del material vegetal molido y se le agregó 1 ml de una solución conteniendo ácido nítrico y ácido perclórico (2:1), se colocó en la mufla a 100 °C durante 2 horas y posteriormente se subió la temperatura poco a poco hasta alcanzar 240 °C por un lapso de 4 horas. El residuo se disolvió en 2.5 mL de ácido nítrico y se analizó por espectroscopia de absorción atómica. Se preparó un blanco el cual contenía la mezcla de ácidos, así como controles positivos con una mezcla de plomo, mercurio y cadmio (FEUM, 2000).

5.9. DETERMINACIÓN DEL LÍMITE MICROBIANO Y AUSENCIA DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Esta determinación se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita en la (FEUM 2000).

5.9.1. Límites microbianos

Las muestras se trabajaron bajo condiciones asépticas, y el tiempo transcurrido desde la preparación de la primera dilución hasta su incorporación en el medio de cultivo no excedió de una hora.

1 g de material vegetal pulverizado se suspendió en 9 mL de una solución de fosfatos pH 7.2 que es un medio adecuado para que no se altere el número y clase de microorganismos.

Dilución de la muestra

La técnica según (Trease *et al.*, 1987), recomienda que en función del grado de contaminación del producto, se efectúen las diluciones decimales que se estimen convenientes. Cuando no se tengan antecedentes al respecto, es conveniente efectuar hasta la dilución 10^{-3} y ampliar o reducir el número de diluciones con base en la experiencia. Para obtener la segunda dilución del producto transferir, 1 mL de la primera dilución a un tubo conteniendo 9 mL de solución diluida de fosfatos pH 7.2 estéril. Proseguir de igual forma para obtener las siguientes diluciones, utilizando una pipeta para cada dilución e inocular simultáneamente las placas o tubos con la dilución correspondiente.

5.9.1.1. Recuento de Microorganismos Mesófilos Aerobios

5.9.1.1.1 Método en placa.

Se efectuaron las diluciones necesarias para que 1 mL tenga entre 30 y 300 UFC/mL, para esto se inoculó por triplicado 1 mL de cada dilución del producto, en cajas de Petri estéril. Se añadieron a cada caja, 20 mL de medio agar soya tripticaseína, previamente esterilizado y mantenido en baño de agua a una temperatura aproximada de 45-48°C. Con movimientos rotatorios suaves, se mezcló la alícuota de la muestra con el medio de cultivo, evitando que el líquido se derramase. El medio de cultivo solidificó y se incubaron las placas en posición invertida a 35-37°C, durante 48-72 horas.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo en medio Sabouraud para la cuenta de hongos y levaduras, dejando incubar a 35-37°C por un período de 5 a 7 días.

Después del período de incubación, se contó el número de colonias, con el auxilio de una lupa. Se anotó el promedio de colonias por dilución y se calculó el número de UFC por g o mL del producto, considerando el factor de dilución de la muestra.

La técnica indica que si no se observa desarrollo en la dilución 1:10, expresar los resultados como: menos de 10 UFC por g o mL de muestra (FEUM, 2000).

5.9.1.1.2. Método en tubo (NMP)

Se colocaron 12 tubos conteniendo 9 mL del medio caldo soya tripticaseína, en 4 hileras de 3 tubos cada una. Se inoculó 1 mL de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} en la primera, segunda y tercera hilera de los tubos respectivamente. Se identificó cada hilera de tubos con la dilución inoculada. Se marcó la cuarta hilera como testigo. Se agitaron los tubos e incubaron a 35-37°C durante 48 horas. Después del período de incubación se anotó el número de tubos de cada dilución con turbiedad debida al crecimiento microbiano.

Se registró el número más probable (NMP) de organismos por g o mL de la muestra utilizando el Cuadro 8. La técnica recomienda repetir la prueba si cualquiera de los tubos testigo muestra desarrollo microbiano.

Cuadro 8. Número más probable por el método de tubo múltiple.

| Número más probable de microorganismos | | | |
|--|--------------------------|---------------------------|----------------|
| No. de tubos positivos (mg o mL de muestra por tubo) | | | NMP por g o mL |
| 10^{-1} (0.1 mg o mL) | 10^{-2} (0.01 mg o mL) | 10^{-3} (0.001 mg o mL) | |
| 3 | 3 | 3 | >1100 |
| 3 | 3 | 2 | 1100 |
| 3 | 3 | 1 | 500 |
| 3 | 3 | 0 | 200 |
| 3 | 2 | 3 | 290 |
| 3 | 2 | 2 | 210 |
| 3 | 2 | 1 | 150 |
| 3 | 2 | 0 | 90 |
| 3 | 1 | 3 | 160 |
| 3 | 1 | 2 | 120 |
| 3 | 1 | 1 | 70 |
| 3 | 1 | 0 | 40 |
| 3 | 0 | 3 | 95 |
| 3 | 0 | 2 | 60 |
| 3 | 0 | 1 | 40 |
| 3 | 0 | 0 | 23 |

FEUM, 2000

5.9.2. Identificación de Microorganismos Patógenos

En el Cuadro 9 se especifican algunas cepas y medios de referencia que se emplearon en la identificación de microorganismos patógenos (FEUM, 2000).

La muestra se debe pulverizar y suspender de manera que no se altere el número y clase de microorganismos.

Cuadro 9. Cepas de referencia:

| Microorganismo | Medio de cultivo |
|-------------------------------|-------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Agar soya-caseína |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Agar soya-caseína |
| <i>Salmonella typhi</i> | Caldo lactosa |
| <i>Escherichia coli</i> | Caldo lactosa |

5.9.2.1. Identificación de *Staphylococcus aureus*

Se colocaron 10 g de la muestra en 90 mL de caldo lactosa, se mezcló e incubó a 35-37°C, durante 3 horas. Se tomó un inóculo del cultivo anterior y se aisló por estría cruzada en los siguientes medios: Vogel-Johnson, manitol-sal agar y agar gelosa sangre. Se incubó a 35-37°C. Se observaron las características macroscópicas en cada medio sembrado.

5.9.2.1.1 Prueba de la coagulasa

Esta prueba se lleva a cabo siempre y cuando se sospeche que hay contaminación de *S. aureus*. Ello se obtiene de las características macroscópicas de los medios descritos anteriormente.

Se adicionan asépticamente 0.5 mL de plasma de conejo en un tubo de ensayo estéril, al que posteriormente le son agregados 0.5 mL de un cultivo líquido y puro de 18-24 horas del microorganismo analizado, los componentes se mezclan rotando el tubo y se incuba a 37°C, observándose cada 3 horas, hasta completar 24. La prueba es positiva si se observa la formación de redes de fibrina o de un coágulo. En esta prueba se deben utilizar como testigos cepas de referencia coagulasa positiva y negativa. Si no se presenta ningún grado de coagulación, la muestra cumple con el requisito de ausencia de *Staphylococcus aureus*.

5.9.2.2. Identificación de Enterobacterias.

5.9. 2. 2.1 Identificación de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se colocaron 10 g de la muestra de la raíz de *Iostephane heterophylla* en 90 mL de caldo soya-tripticaseína, se mezclaron e incubaron a 35-37°C durante 3 horas. Se tomó un inóculo del cultivo anterior y se aisló por estría cruzada en agar cetrimida, el cual se incubó a 35-37°C, durante 24-48 horas. Se observaron las características macroscópicas en el medio sembrado.

5.9.2.2.2 Identificación de *Salmonella sp.*

Se colocaron 10 g de la muestra en 90 mL de caldo lactosa, se mezcló e incubó a 35-37°C durante 3 horas. Como se observó crecimiento, se sembró 1 mL del cultivo del medio de enriquecimiento en 10 mL de caldo tetrionato, se mezcló e incubó a 35-37°C durante 24 horas. Se mantuvo en refrigeración el cultivo en caldo lactosa.

Como hubo crecimiento en el medio de enriquecimiento, se tomó un inóculo y se aisló por estría cruzada en los siguientes medios selectivos: agar verde brillante, agar xilosa-lisina-desoxicolato y agar sulfito de bismuto. Posteriormente se incubó a 35-37°C durante 24 horas. Se observaron las características macroscópicas de las colonias en cada medio sembrado.

5.9.2.2.3 Identificación de *Escherichia coli*.

A partir del cultivo en el caldo lactosa que se mantuvo en refrigeración, se tomó un inóculo que se sembró por estría cruzada en los siguientes medios: agar Mac Conkey y agar Levine-eosina azul de metileno y se incubó a 35-37°C durante 24 horas.

5.9.2.3 Pruebas Bioquímicas y selectivas para la identificación de especies

5.9.2.3.1 Producción de pigmentos

Si en el medio agar cetrimida se encuentran colonias sospechosas de *Pseudomonas aeruginosa*, sembrar un inoculo en los medios agar *Pseudomonas* para la detección de fluoresceína (agar *Pseudomonas* F) y agar *Pseudomonas* para la detección de piocianinas (agar *Pseudomonas* P) e incubar a 35-37°C durante 3 días. Observar la morfología de las colonias desarrolladas.

Nota esto no se elaboró por los resultados negativos obtenidos en el medio cetrimida.

5.9.2.3.2. Prueba de la oxidasa

Impregnar una tira de papel filtro con una solución al 1% de diclorhidrato de N, N-dimetil-*p*-fenilendiamina y colocar sobre ella una pequeña porción de la colonia sospechosa. La prueba es positiva si se desarrolla un color púrpura en 10 segundos. Emplear como control positivo una cepa de referencia de *P. aeruginosa*.

5.9.2.3.3. Pruebas bioquímicas

Se realizaron pruebas bioquímicas, para lo cual, se tomaron asadas de una sola colonia que presentaba las características macroscópicas de colonias entéricas y se inocularon en los siguientes medios de prueba que se utilizaron fueron las siguientes: agar Kliger triple azúcar, Vogel Poskauer, nitrato de Simmons, rojo de metilo, ureasa, glucosa y producción de gas.

5.9.2.3.4. Identificación de patógenos entéricos no fermentativos

Para corroborar los resultados de las pruebas bioquímicas, se hizo una prueba la cual se basa en pruebas bioquímicas en serie que permiten distinguir entre la familia de enterobacterias. Para esto, las colonias no se aplicarán directamente en los pozos, éstas deberán ser colonias aisladas en placas de agar sangre. Se tomó una colonia de 3 a 4 mm de diámetro que presentó la misma morfología y se resuspendió en un medio para enterobacterias; de este fluido se

colocó un inóculo en los pozos. Se taparon los pozos asépticamente e incubaron 24 horas a 35-37 °C. Después del período de incubación se leyó la prueba.

5.10. IDENTIFICACIÓN DEL XANTORRIZOL POR CCF.

La planta medicinal *Iostephane heterophylla* tiene como componente mayoritario al xantorrizol que es de naturaleza fenólica, además, se ha demostrado que éste es el responsable de la actividad antimicótica y de la inhibición de la contracción tónica uterina en rata, que presenta esta especie (Aguilar *et al.*, 1993; Aguilar *et al.*, 2000), por lo que se puede emplear como sustancia marcadora de calidad, al realizar la cromatografía en capa fina.

Se realizaron extractos de la materia prima vegetal vía maceración con diferentes disolventes como: hexano, cloroformo y metanol. Se hizo una cromatografía en capa fina en la forma tradicional en placas de vidrio de 5 x 20 cm recubiertas de gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck y se empleó como sistema de elución, diclorometano al 100%. Se aplicaron por separado en pequeñas proporciones de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico y del xantorrizol puro en la placa. Después de eluir a un 98% la placa, se secó al aire libre y se reveló con una solución de vainillina calentando a 50 °C por un minuto; se calculó el R_F del xantorrizol y se detectó la mancha de los tres extractos cuyo R_F coincidió con el del xantorrizol.

5.11. DETERMINACIONES QUIMICAS CUANTITATIVAS

Una planta medicinal puede ser ensayada respecto a un grupo completo de componentes, como por ejemplo, los alcaloides totales en la belladona o heterósidos totales en la digital. En ocasiones, puede ser necesario determinar componentes específicos, como el contenido de reserpina en *Rauwolfia sp.* (Trease *et al.*, 1987).

Iostephane heterophylla ha sido investigada desde el punto de vista fitoquímico. En ese estudio se describen el aislamiento y caracterización de un grupo de compuestos fenólicos como los principales metabolitos secundarios presentes en la especie (Aguilar *et al.*, 1993). Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se realizaron ensayos con respecto al contenido de fenoles totales.

5.11.1. Determinación de FENOLES TOTALES por el Método de Price y Butler

5.11.1.1 Preparación de la muestra.

20 mg de la raíz de *Iostephane heterophylla* pulverizada se extrajeron con 3 mL de metanol durante un minuto, con agitación constante. Se filtró rápidamente con ayuda de un embudo y enjuagó el matraz con 3 mL adicionales de metanol. Esta solución se vertió en el embudo. La solución del embudo se recibió en un matraz aforado de 10 mL, y se aforó con metanol.

De la anterior solución se tomó una alícuota de 1 mL y se llevó a un matraz de 50 mL, el cual se aforó con agua destilada.

En un matraz Erlenmeyer se adicionaron los 50 mL de la solución anterior, se adicionaron 3 mL de una solución 0.1 M de tricloruro férrico en ácido clorhídrico y se mezcló. Posteriormente se adicionaron 3 mL de una solución 0.08M de ferrocianuro de potasio y mezcló. Después de 10 minutos se leyó la absorbancia a 720 nm.

5.11.1.2. Preparación de la curva

Para la elaboración de la curva estándar se hizo una solución stock y varias diluciones como a continuación se describen. Para la preparación de la solución stock se pesaron 10 mg de ácido gálico y se aforó a 10 mL con metanol (1er aforo); de la solución stock se tomaron alícuotas para las diferentes diluciones como se muestra en el Cuadro 10 (Price *et al.*, 1977).

Los aforos de la curva se hicieron con agua destilada; la solución final se preparó en un matraz aforado de 50 mL, adicionándole 3 mL de metanol y aforándose con agua destilada.

Cuadro 10. Diluciones para elaborar la curva estándar del ácido Gálico

| 1er alícuota | 2do aforo H ₂ O | 2da alícuota | 3er aforo H ₂ O/3mL MeOH | concentración final µg/mL |
|--------------|-------------------------------|--------------|--|------------------------------|
| 0.1 mL | 10 mL | 1 mL | 50 mL | 0.2 |
| 0.2 mL | 10 mL | 1 ml | 50 mL | 0.4 |
| 0.4 mL | 10 mL | 1 ml | 50 mL | 0.8 |
| 0.6 mL | 10 ml | 1 ml | 50 mL | 1.2 |
| 0.8 mL | 10 ml | 1 ml | 50 mL | 1.6 |
| 1.0 mL | 10 ml | 1 ml | 50 mL | 2.0 |

Los 50 mL del tercer aforo se vertieron en un matraz Erlenmeyer y se les adicionaron 3 ml de una solución 0.1 M de tricloruro férrico y se mezcló. Posteriormente se adicionaron 3 mL de una solución 0.08 M de ferrocianuro de potasio y se mezcló. Después de 10 minutos se leyó la absorbancia a 720 nm (Price *et al.*, 1977).

Se hicieron diferentes concentraciones, y diversas corridas de acuerdo al parámetro de validación a evaluar (linealidad, precisión, exactitud).

La Figura 5 resume tanto el tratamiento como las determinaciones realizadas a la raíz de *I. heterophylla*.

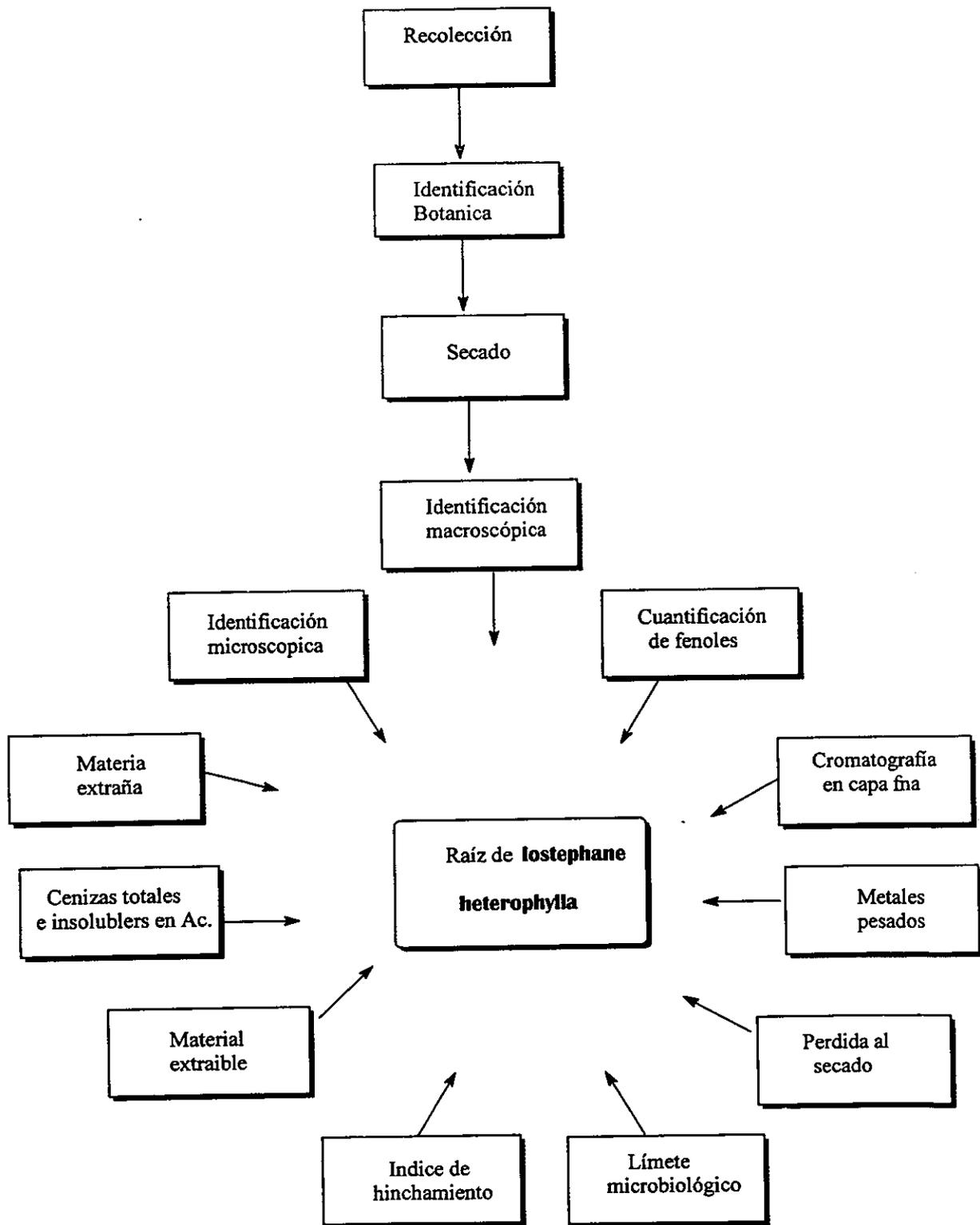


Figura 5. Determinaciones realizadas a la raíz de *I. heterophylla*

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA

La descripción macroscópica se llevó a cabo mediante la observación de la raíz de *Iostephane heterophylla*, la cual presentó las siguientes características macroscópicas:

6.1.1. Corteza

La corteza mide aproximadamente 2 mm de grosor, presenta un sabor dulce un poco astringente; se puede distinguir una corteza externa y una corteza interna. La corteza externa es de color café rojizo oscuro, plegada, fisurada, escamosa y tiene un grosor aproximadamente de 1 mm; la corteza interna es de color café claro y presenta un grosor de aproximadamente 1mm. También se pueden apreciar en la corteza canales resiníferos en forma circular y dispersos, llenos de resina que brilla en presencia de la luz; pueden presentarse costillas de 0.5 a 1.0 cm de ancho y de 0.2 a 0.6 cm de alto.

6.1.2. Madera

La madera o la parte central de la raíz presenta un sabor amargo resinoso que al final es astringente; tiene un olor agradable dulce y es de color crema. En su estructura presenta canales resiníferos muy evidentes, solitarios, abundantes que dan el aspecto de anillo. La madera es ligeramente blanda, de textura áspera sin lustre y no se observan anillos de crecimiento ni radios. En la figura 6 se muestran la raíz de *Iostephane heterophylla* y sus características macroscópicas.

6.2. IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA

6.2.1. Descripción anatómica de los tejidos

La Familia Asteraceae es una de las más evolucionadas por lo que su anatomía es compleja y cada especie puede tener diferente arreglo de tejidos en los diferentes órganos, en general las raíces están compuestas principalmente por:

rizodermis, floema y xilema (Metcalfe *et al.*, 1978). En el caso particular de la raíz de *Iostephane heterophylla* esta se compone de la rizodermis, una pequeña zona de floema y una zona mayoritaria central de xilema (Metcalfe *et al.*, 1978).



Figura 6. Raíz de *Iostephane heterophylla*

6.2.1.1. Rizodermis

Primeramente describiremos la parte que corresponde a la rizodermis, la cual, en vista transversal esta compuesta por el felema o súber el cual presenta una estructura compleja y está constituido por células alternadas en forma de bandas y paquetes de hasta 25 macroesclereidas de dos tipos: unas pequeñas de pared engrosada con lumen celular reducido, redondeadas y ubicadas en la zona cercana al felógeno y el otro tipo de macroesclereidas son más grandes, algunas de ellas presentan paredes poco engrosadas y amplio lumen celular; se presentan tangencialmente alargadas y ubicadas en la zona periférica de la rizodermis. Las bandas continuas, contienen células rectangulares, tangencialmente alargadas,

organizadas en claras hileras radiales, de paredes delgadas y suberizadas, algunas obliteradas e inmersas en estas bandas se encuentran conductos esquizógenos ovalados, cuyo epitelio está formado por un solo extracto de pequeñas células de paredes delgadas, con abundantes puntiaduras primarias, que contienen polifenoles, los cuales fueron detectados en la prueba histoquímica con KMnO_4 , los conductos más cercanos al felógeno tienen su epitelio con células no suberizadas mientras que los epitelios de los conductos más externos tienen células suberizadas e incluso algunas presentan células obliteradas (Metcalf *et al.*, 1978). Estos detalles se pueden apreciar en la Figura 7.

6.2.1.2. Córtex

Presenta un espesor de 575 μm , y está constituido principalmente por células isodiamétricas, de contorno sinuoso, algunas, cercanas al floema primario, están tangencialmente alargadas. También se presentan en esta zona paquetes de macroesclereidas, similares a las observadas en la rizodermis; en esta zona se encuentran conductos esquizógenos similares a los de la rizodermis con abundante contenido celular. El felógeno y la felodermis son inconspicuos.

6.2.1.3. Tejido Vascular

El tejido vascular está constituido por floema, xilema y tejido fundamental los cuales se describen detalladamente a continuación.

6.2.1.3.1. Floema

En vista transversal se observa que tiene un espesor de 1 mm y es de tipo acumulativo y estratificado. El floema primario está constituido por células cribosas y células parenquimáticas de diámetros tangenciales similares. El floema secundario está constituido por tubos cribosos, células acompañantes y células parenquimáticas grandes, todos ellos organizados en hileras radiales. En vista longitudinal, los elementos de tubos cribosos son nucleados y con placa cribosa inconspicua; las células acompañantes son poco evidentes. Los radios floemáticos

son evidentes, con dos a cuatro hileras de células de paredes poco engrosadas (Metcalf *et al.*, 1978).

6.2.1.3.2. Cambium vascular

El cambium vascular es evidente y esta formado por dos extractos de células de forma rectangular y núcleo evidente.

6.2.1.3.3. Xilema

El xilema de la raíz de *Iostephane heterophylla* esta compuesto por xilema primario y xilema secundario. El primero, ubicado en la zona central de la raíz, no presenta médula y esta constituido por 2 paquetes opuestos o diarca formada de vasos y fibras; los vasos miden de 45 a 65 μm de diámetro tangencial y con pared de 5 μm de grosor, los vasos más grandes corresponden al metaxilema y están ubicados hacia la periferia de los paquetes de la diarca (Metcalf *et al.*, 1978).

El xilema secundario presenta pequeños paquetes dispersos con 1 a 10 elementos de vasos, los periféricos con mayor número de vasos y más grandes, los cuales miden de 65 a 80 μm de diámetro tangencial y están arreglados en cadenas radiales; los paquetes de vasos centrales contienen menor número y son más pequeños en comparación con los periféricos que se presentan más grandes y numerosos. En vista longitudinal, los elementos de vasos son de 80 a 130 μm de largo, con puntaduras alternas sobre sus membranas laterales y placas de perforación simple sobre sus paredes terminales. El parénquima axial apotraqueal es escaso y sus células con núcleo evidentes (Metcalf *et al.*, 1978)..

6.2.1.3.4. Tejido fundamental

Conformado por células parénquimáticas radialmente alargadas, de paredes delgadas y algunas con abundante contenido celular denso. Inmerso en este tejido se observan abundantes conductos esquizógenos similares a los observados en otras partes de la raíz pero más grandes y radialmente orientados (Metcalf *et al.*,

1978). Los detalles de la descripción microscópica se pueden observar en la Figura 7.

6.2.2. Contenidos celulares

Las diferentes sustancias que constituyen las células vegetales pueden identificarse mediante pruebas microquímicas, es decir, por medio de reacciones que producen coloraciones o precipitados que pueden reconocerse microscópicamente. Estos contenidos celulares representan productos de reserva, subproductos del metabolismo, metabolitos secundarios, tales como: carbohidratos, proteínas, lípidos, aceites, alcaloides, glucósidos, gomas, mucílagos, taninos, fenoles, etc.(López, 1998)

6.2.2.1. Detección de Almidón

El almidón es un polisacárido presente en los vegetales, éste se puede identificar utilizando una solución de yodo en yoduro de potasio, si hay presencia de granos de almidón, la reacción da un color morado a negro. Al efectuar la prueba de detección de almidón en los cortes transversales y longitudinales de la raíz de *Iostephane heterophylla* se observaron puntos negros que nos indican la presencia de almidón en los tejidos fundamentales principalmente. Su presencia se corroboró al observar un corte transversal en luz polarizada, observándose granos en forma de abanico de gran tamaño.

6.2.2.2. Detección de Lípidos

Al igual que el almidón los lípidos están ampliamente distribuidos en los vegetales y constituyen principalmente la reserva de la planta, que puede identificarse utilizando el reactivo rojo O el cual tiñe los lípidos de rojo. Al efectuar dicha prueba no se observó la presencia de lípidos en ninguna estructura de la raíz de *Iostephane heterophylla*.

6.2.2.3. Detección de Polisacáridos y Proteínas

Las células vegetales están constituidas principalmente de celulosa y hemicelulosa y es posible aplicar ciertos reactivos para el reconocimiento de celulosa en las paredes celulares. En las membranas existen gran cantidad de proteínas, por lo que al realizar la prueba PAS, la mayor parte del xilema secundario y floema de la raíz de *Iostephane heterophylla* se tiñó de color violeta indicando la presencia de celulosa en dichas células y la parte de xilema primario y la rizodermis se tiñeron de azul indicando mayor contenido de proteínas en esas células.

6.2.2.4. Detección de Pectina

La pectina en tejido vegetal es la sustancia intercelular, la cual mantiene unidas a las células que conforman al tejido. Esta sustancia presente en la raíz de *Iostephane heterophylla* se puso de manifiesto al agregar rojo de rutenio, esta sustancia colorea de rojo la pectina que se encuentra entre las células de todo el tejido del xilema y floema principalmente.

6.2.2.5. Detección de Ligninas

La lignina es una sustancia que da rigidez y soporte a las plantas, ésta se deposita en células de traqueidas, vasos, fibras y esclereidas principalmente. En el caso de la raíz de *Iostephane heterophylla* ésta se encuentra dentro del xilema y en la rizodermis.

6.2.4.6. Detección de Polifenoles

En esta prueba se detectan fenoles principalmente, y en nuestro caso es muy importante ya que el resultado fue positivo alrededor de los conductos esquizógenos, en donde es evidente la gran acumulación de fenoles. Esto se puede relacionar al hecho de que estudios fitoquímicos de *I. heterophylla* demostraron que el compuesto mayoritario dentro de los metabolitos secundarios, corresponde a un fenol sustituido. Esto se puede apreciar en la Figura 7.

6.2.4.7. Detección de Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables son aquellos que pueden ser hidrolizables con ácidos o enzimas, como la tanasa. Están formados por varias moléculas de ácido fenólico que se unen por un enlace éster a un núcleo central de glucosa, y reaccionan con sales de hierro tomando una coloración azul. (Trease *et al.*, 1987)

La raíz de *I. heterophylla* no presenta taninos hidrolizables ya que no da la coloración azul característica al agregar la solución de sulfato ferroso.

6.2.4.8. Detección de taninos condensados

Las moléculas de los taninos condensados no sufren ruptura al exponerse a la acción de los ácidos. Al reaccionar con cloruro férrico dan una coloración verde la cual no se presentó al efectuar la detección de taninos condensados en la raíz de *I. heterophylla* (Trease *et al.*, 1987).

En el Cuadro 11 se presentan los resultados obtenidos de las pruebas histoquímicas, realizadas a la raíz de *Iostephane heterophylla*.

Cuadro 11. Contenidos celulares en los diversos tejidos de la raíz de *I. heterophylla*

| Determinación y Reactivo | Rizodermis | Tejido interno | |
|--|------------|----------------|--------|
| | Suber | Floema | Xilema |
| Almidón con lugol | - | + | - |
| Lípidos con rojo O | - | - | - |
| Proteínas y polisacáridos insolubles PAS | ++ | ++ | ++ |
| Pectina con rojo de rutenio | - | + | ++ |
| Lignina con floroglucinol | ++ | - | + |
| Polifenoles con KMnO_4 | ++ | ++ | ++ |
| Taninos condensados con Fe_3Cl | - | - | - |
| Taninos hidrolizables con FeSO_4 | - | - | - |

-ausencia +presencia ++abundancia

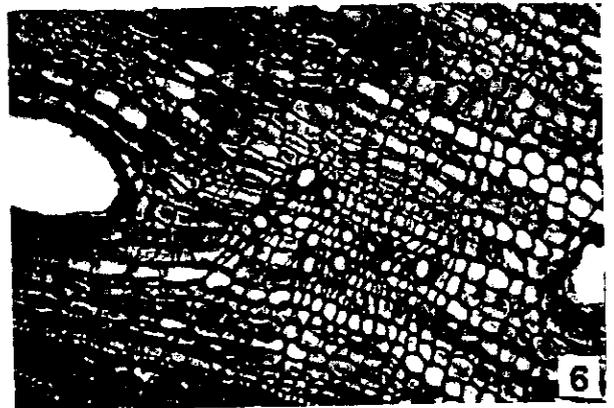
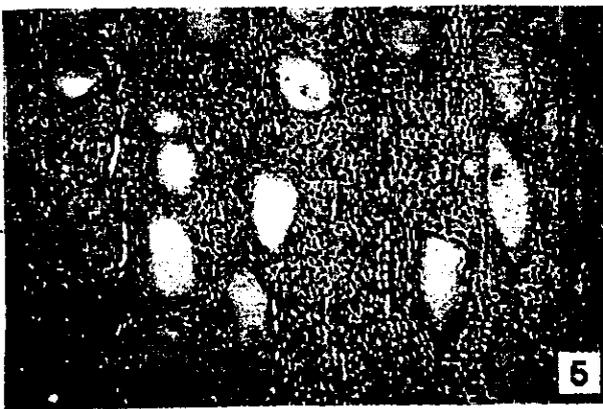
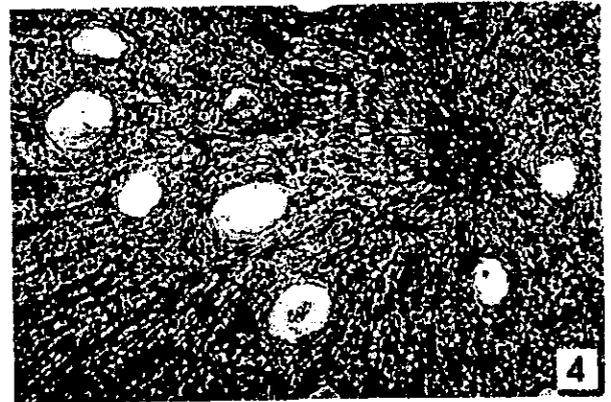
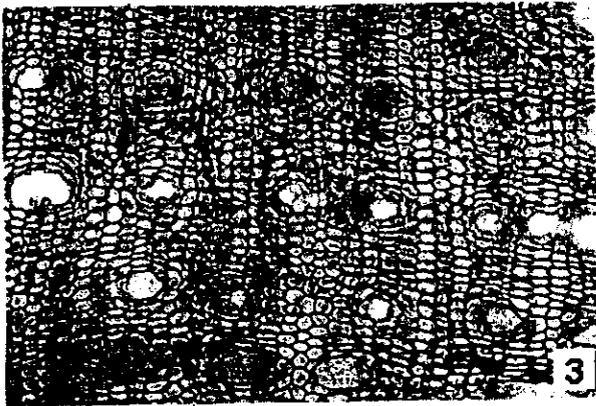
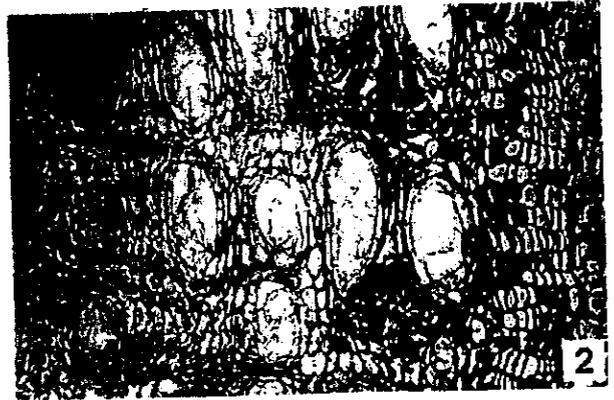
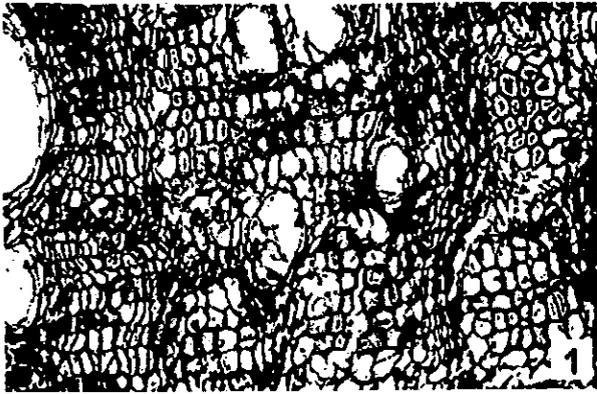


Figura 7. Cortes histológicos de la raíz de *I. heterophylla*: 1) Rizodermis sec. trans. paquetes de macroesclereidas, a 100x, 2) CórTEX sec. trans. conductos esquizógenos y macroesclereidas a 100x, 3) Floema sec. trans. a 100x 4) Xilema, sec. trans. a 100x, 5) Floema sec. long. vasos, 6) Zona central sec. trans. vasos en grupo a 25x.

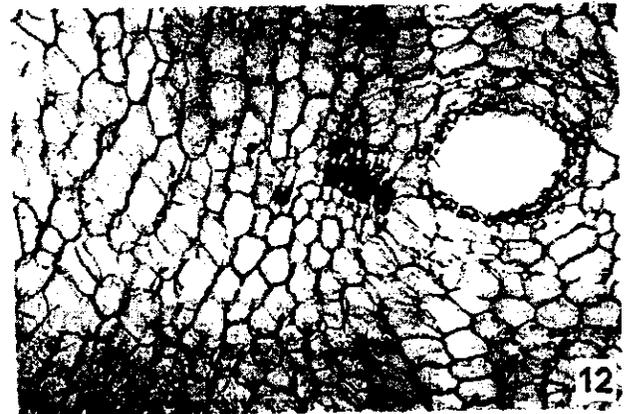
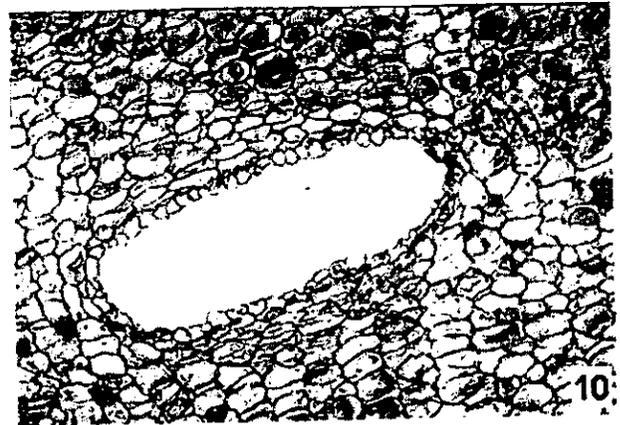
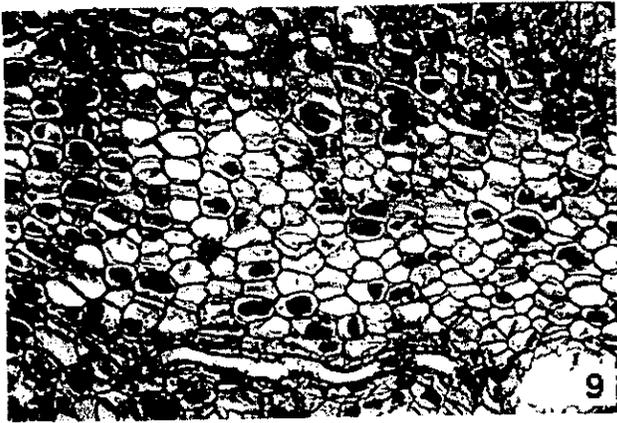
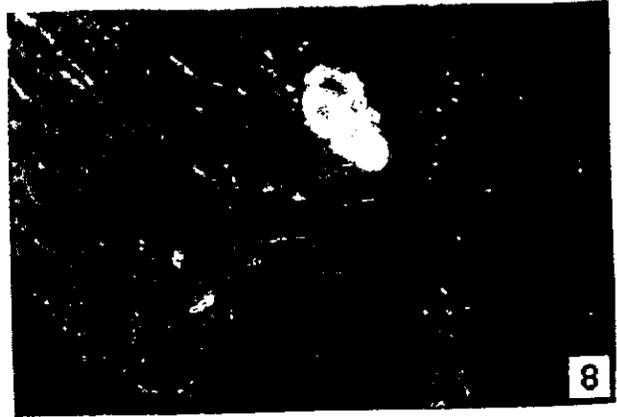
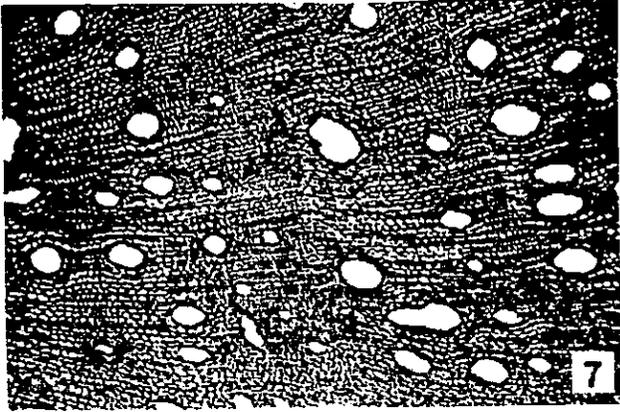


Figura 7. (Cont.) Cortes histológicos de la raíz de *I. heterophylla*. 7) Floema sec. trans. a 25x, 8) Tejido fundamental con amiloplastos en forma de abanicos a 200x, 9) Tejido fundamental sec. long. Con abundantes polisacáridos a 100x, 10) Conductos esquizógenos con epitelio monoesterificado a 100x 10) Conductos esquizógenos sec. long. con resinas presentes en los conductos, 12) Conductos esquizógenos sec. trans. con el reac. KMnO_4 identificando polifenoles a 100x.

6.3. DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS EXTRAÑOS

Al realizar la determinación de elementos extraños, la muestra no presentó: enmohecimiento, microorganismos, insectos, malos olores, decoloración, ni signos evidentes de deterioro, por lo que se procedió a la realización de la prueba de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente (Trease *et al.*, 1987).

Se pesaron 99.02 g de la raíz de *I. heterophylla*, y al llevar a cabo la prueba, se separaron los elementos extraños, los cuales estuvieron constituidos por tierra adherida a la raíz. Al término de este procedimiento se obtuvo un peso de 1.2 g de materia extraña.

$$\begin{array}{r} 99.02 \text{ g} \text{---} 100\% \\ 1.2 \text{ g} \text{-----} X \\ X = 0.83\% \end{array}$$

Calculando el porcentaje de materia extraña, se obtuvo un 0.83%. El porcentaje obtenido está dentro del límite especificado (< del 2%, Farmacopea Europea, 1997), por lo que se concluye que ésta determinación pasa.

En general es difícil obtener las materias primas vegetales puras ya que siempre vienen acompañadas de impurezas de diferentes fuentes de contaminación. Su principal fuente de contaminación es su habitat cuyos elementos extraños los cuales están constituidos por:

- 1) *partes extrañas*: todo elemento que procede de la planta originaria pero no constituye la droga (hojas, tallos, flores, etc.).
- 2) *materias extrañas*: todo elemento ajeno a la planta de origen, de procedencia vegetal o mineral (tierra, insectos, restos orgánicos, etc.).

Los elementos encontrados fueron principalmente de origen mineral correspondiendo a materias extrañas.

6.4. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES E INSOLUBLES EN ÁCIDO

Al contenido de cenizas en el material vegetal se le hicieron 2 determinaciones: cenizas totales y cenizas insolubles en ácido.

6.4.1 Cenizas Totales

Esta prueba se basa en la relación que existe entre el peso inicial de una muestra, y el residuo de las sales inorgánicas finales obtenidas, después de la ignición de la muestra.

Los resultados de las cenizas totales se muestran en el cuadro 12 expresado en gramos y en porcentajes; se llevaron a cabo cinco repeticiones.

Cuadro 12. Cenizas totales de la raíz de *I. heterophylla*.

| Peso de la muestra en g | Peso de cenizas totales en gramos | % de cenizas en la raíz de <i>I. heterophylla</i> |
|-------------------------|-----------------------------------|---|
| 1.9982 | 0.0966 | 4.8343 |
| 2.0027 | 0.0996 | 4.9733 |
| 1.9971 | 0.0923 | 4.6217 |
| 2.004 | 0.0878 | 4.3812 |
| 1.9991 | 0.1009 | 5.0473 |
| Promedio | .0954±0.0024 | 4.7716±0.12 |
| D E | .0054 | 0.2718 |

El promedio de cenizas totales fue de .0954±0.0024 g que corresponde al 4.77±0.12 % de la droga vegetal. Para esta prueba todavía no se ponen límites en la FEUM 1994, en la que sólo se menciona el procedimiento, por lo que se tendría que establecer para cada especie vegetal el límite de cenizas.

Cuando las materias primas vegetales se incineran, dejan como residuo unas cenizas inorgánicas las cuales están formadas por carbonatos, fosfatos, silicatos y sílice. El contenido de estos elementos varía entre un límite amplio y por lo tanto, tiene escaso valor para fines de tipificación (Trease *et al.*, 1987) ya que va a depender del suelo donde creció la planta. Por lo anterior tendríamos que establecer los límites de cenizas para cada especie vegetal.

6.4.2. Cenizas Insolubles en Ácido

Las cenizas insolubles en ácido son el residuo obtenido después de tratar las cenizas totales con ácido clorhídrico diluido, mismas que están compuestas principalmente por sílice.

Los resultados de la cuantificación de cenizas insolubles en ácido se obtuvieron después de las cenizas totales y los resultados se muestran en el Cuadro 13; las cenizas se expresan en gramos y en porcentajes.

Cuadro 13. Cenizas insolubles en ácido de la raíz de *I. heterophylla*.

| Peso de la muestra en g | Peso de cenizas insolubles en ácido en gramos | % de cenizas insolubles en ácido |
|-------------------------|---|----------------------------------|
| 1.9982 | 0.0160 | 0.800 |
| 2.0027 | 0.0181 | 0.904 |
| 1.9971 | 0.0154 | 0.771 |
| 2.004 | 0.0136 | 0.680 |
| 1.9991 | 0.0159 | 0.795 |
| Promedio | 0.0158±0.0007 | 0.79±0.036 |
| D E | 0.0016 | 0.08 |

No hay límites establecidos para esta determinación, por lo que se tendrían que analizar diferentes lotes con diferentes tiempos de recolección, diferente tipo de tierra donde crece, etc., para poder establecer un límite. Sin embargo,

comparando con otras partes de plantas el porcentaje que presentó esta prueba fue bajo teniendo en cuenta que es una raíz.

6.5. DETERMINACIÓN DE MATERIAL EXTRAIBLE

Esta determinación se llevó a cabo utilizando tres diferentes disolventes, hexano, etanol y etanol agua 7:3, los cuales presentan diferentes polaridades, por lo tanto diferentes capacidades de solvatación de los metabolitos presentes en las plantas medicinales por lo que nos da un amplio rango de obtener todos o casi todos los metabolitos secundarios presentes en la raíz de *Iostephane heterophylla*. En el Cuadro 14, se presentan el peso del extracto obtenido y los porcentajes de los extractos con los diferentes disolventes.

Como podemos observar en los resultados, la mezcla de etanol-agua extrajo un mayor número de componentes de la raíz de *Iostephane heterophylla* que los otros dos disolventes empleados, de menor polaridad, siendo el hexano el que extrajo la menor cantidad, por ser el menos polar. Este hecho se debe a que la raíz de *Iostephane heterophylla* contenga un mayor número de metabolitos secundarios polares.

6.6. DETERMINACIÓN DEL INDICE DE HINCHAMIENTO

El índice de hinchamiento es el volumen en mililitros ocupado por un gramo de la material vegetal, incluyendo cualquier mucílago adherido a la misma, después de ser sometida a un proceso de hinchamiento en un líquido acuoso durante 4 horas.

Dicha prueba se lleva a cabo con el material molido y seco; los resultados obtenidos se expresan en el Cuadro 15.

Cuadro 14. Peso y porcentajes de los extractos hexánicos, etanólicos y de etanol agua 7:3

| Peso de la muestra en g | Peso(g) ext. hex. | % ext. hex. | Peso(g) ext. EtOH | % ext. EtOH | Peso(g) ext. EtOH-H ₂ O 7:3 | % ext. EtOH-H ₂ O 7:3 |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--|----------------------------------|
| 4.0054 | 0.2201 | 5.4951 | | | | |
| 4.0036 | .2115 | 5.2827 | | | | |
| 3.9995 | .1900 | 4.7506 | | | | |
| 4.0000 | .2056 | 5.1400 | | | | |
| 4.0006 | .2149 | 5.3716 | | | | |
| 4.0035 | | | 0.2558 | 6.3894 | | |
| 4.0001 | | | 0.2740 | 6.8498 | | |
| 4.0002 | | | 0.2611 | 6.5272 | | |
| 4.0000 | | | 0.2428 | 6.0700 | | |
| 4.0001 | | | 0.2580 | 6.4498 | | |
| 4.0180 | | | | | 0.3318 | 8.2578 |
| 4.0173 | | | | | 0.3463 | 8.6207 |
| 4.0133 | | | | | 0.3468 | 8.6413 |
| 4.0099 | | | | | 0.3665 | 9.1399 |
| 4.0098 | | | | | 0.3470 | 8.6536 |
| Promedio | 0.2084± 0.0052 | 5.2080± 0.1282 | 0.2583± 0.0050 | 6.4572±0 .1252 | 0.3477± 0.0055 | 8.6626± 0.1403 |
| D. E | 0.01156 | 0.2866 | 0.1119 | 0.2800 | 0.0123 | 0.3138 |

La planta medicinal presentó un índice de hinchamiento de $25.83 \pm 1.4 \%$, esto es debido a que no contiene mucílago pero sí tiene espacio que puede captar agua, dando el resultado anterior.

Cuadro 15. Índice de hinchamiento de *I. heterophylla*.

| Peso de la raíz | mL ocupados por la raíz seca | mL ocupados mat. Hich. | Diferencia de volúmenes | Índice de hinchamiento |
|-----------------|------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 1.0 g | 2.4 | 2.9 | 0.5 | 20.83 |
| 1.0 g | 2.4 | 3.1 | 0.6 | 25.00 |
| 1.0 g | 2.4 | 3.0 | 0.6 | 25.00 |
| 1.0 g | 2.4 | 3.1 | 0.7 | 29.16 |
| 1.0 g | 2.4 | 3.1 | 0.7 | 29.16 |
| Promedio | | | | 25.83±1.4 |
| D.E | | | | 3.12 |

6.7. DETERMINACIÓN DE PERDIDA AL SECADO.

Esta determinación se llevó a cabo con la raíz molida y seca a temperatura ambiente y se evaluó el contenido de agua presente en la raíz aún después de secarla a 105 °C. En el Cuadro 16 se da el porcentaje de la pérdida al secado de seis repeticiones.

De esta determinación se obtuvo una pérdida al secado del 3.7 ± 0.11 % el cual representó un porcentaje bajo tomando en cuenta que la raíz fresca contiene un elevado grado de humedad. En esta determinación de pérdida al secado no hay límites especificados y solamente está contenido como un método general en FEUM 2000.

Aunque la pérdida de peso en las muestras por este procedimiento se debe principalmente al agua, también contribuyen a la pérdida de peso pequeñas cantidades de otros productos volátiles (Trease *et al.*, 19987).

Cuadro 16. Pérdida al secado en porciento

| Gramos de la raíz de <i>Iostephane heterophylla</i> | % de pérdida al secado |
|---|------------------------|
| 2.63 | 3.4 |
| 2.61 | 3.4 |
| 2.63 | 3.8 |
| 2.65 | 4.0 |
| 2.63 | 4.1 |
| 2.64 | 3.9 |
| Promedio | 3.76 ± 0.11 |
| D E | 0.27 |

6.8. DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS

Se determinaron plomo, mercurio y cadmio, por el método de absorción atómica, los resultados de 3 repeticiones de la determinación de plomo, se presentan en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Determinación de plomo en la raíz de *I. heterophylla*

| g de la raíz de <i>I. heterophylla</i> | absorbancia | ppm |
|---|-------------|-----------|
| 249 mg | 0.011 | 6.875 |
| 245 mg | 0.012 | 7.5 |
| 248 mg | 0.012 | 7.5 |
| Promedio | | 7.29±0.17 |
| D. E. | | 0.29 |

El promedio de plomo en la muestra es bajo por lo que se reporta menos de 10 ppm.

En la determinación de mercurio y cadmio no da respuesta el espectrómetro de absorción por lo que estos metales están muy por debajo de la resolución del aparato y por lo tanto por debajo del límite especificado por la OMS.

Esta determinación se realiza para la seguridad del consumidor, puesto que los metales pesados son tóxicos y cuando hay presencia en altas cantidades de éstos, indica que hay contaminación ya sea en el agua o en la tierra.

6.9. DETERMINACIÓN DEL LÍMITE MICROBIANO Y AUSENCIA DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS.

El objetivo de esta determinación es evaluar la calidad de la materia prima de las plantas medicinales, mediante el recuento de microorganismos mesófilos

aerobios, hongos filamentosos y levaduras, así como la identificación de microorganismos patógenos (Trease *et al.*, 1987).

6.9.1. Límite Microbiano

6.9.1.1. Método de placa

Este método se realiza para ver UFC de bacterias, y de hongos existentes en la raíz; en algunas Farmacopeas Europeas el límite microbiano es similar al establecido a los que se les aplica a los alimentos (Trease *et al.*, 1987).

La raíz de *I. heterophylla* fue colocada en un medio de enriquecimiento para bacterias y en otro para hongos. En el cuadro 18 se muestran los resultados obtenidos de la prueba después de 24 horas en medio de tripticaseína en cajas de petri como medio de enriquecimiento para bacterias.

Cuadro 18. Número de UFC que crecieron en tripticaseína en caja de petri

| Dilución | 1er repetición | 2da repetición | 3er repetición | promedio |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------|
| 10^{-1} | incontables | incontables | incontables | |
| 10^{-2} | 218 | 108 | 227 | 184 |
| 10^{-3} | 13 | 25 | 24 | 20 |
| 10^{-4} | 4 | 2 | 3 | 3 |
| 10^{-5} | 0 | 0 | 0 | 0 |

$$10^{-4} \text{ --- } 3$$

$$1 \text{ --- } X$$

$$X = 3000 \text{ UFC por g}$$

Se obtuvieron en promedio 3 UFC de bacterias presentes en la dilución 10^{-4} , valor que corresponde a 3000 UFC por gramo de muestra.

Medio Sabouraud. Este medio es exclusivo para el crecimiento de hongos y levaduras, con el cual se siguió el mismo procedimiento que con el medio de tripticaseína, con la única diferencia de que el tiempo de incubación fue de 5 días. En el cuadro 19 se muestran los resultados obtenidos en el medio Sabouraud.

Cuadro 19. Colonias de hongos presentes en agar Sabouraud.

| Dilución | 1er repetición | 2da repetición | 3er repetición | promedio |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------|
| 10^{-1} | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 10^{-2} | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 10^{-3} | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10^{-4} | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10^{-5} | 0 | 0 | 0 | 0 |

Se obtuvieron menos de 10 UFC de hongos y levaduras por g de muestra, por lo que se concluye que no presenta contaminación por hongos y levaduras.

6.9.1.2. Método en tubo

Esta prueba se realizó de acuerdo a la metodología descrita anteriormente en la FEUM 2000; en las tres réplicas de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} hubo crecimiento y de acuerdo al cuadro 8, el número más probable de microorganismos en la muestra por el método de tubo múltiple, es mayor a 1100 UFC por gramo de raíz. Estos resultados son compatibles ya que por el método de recuento en placa da un alto contenido de UFC que corroboramos con el método del tubo que también da un alto grado de contaminación por bacterias.

Las materias primas utilizadas para fabricar medicamentos y/o preparaciones herbolarias no deben rebasar una cuenta microbiana de 100 UFC por gramo de muestra (OMS). De acuerdo con los resultados anteriores, la raíz de *I. heterophylla* contiene un alto porcentaje de microorganismos y no es apta para el consumo humano. Estos resultados se pueden evitar si la planta medicinal es

cuidadosamente procesada desde su recolección, secado, molienda, almacenamiento, en el manejo de la misma etc., para disminuir la contaminación microbiana. Algunas compañías utilizan esterilización por radiación para este propósito.

La cantidad encontrada de hongos y levaduras en la raíz es menos de 10 UFC por el método de tubo y concuerda con los resultados obtenidos en la prueba en placa (6.9.1.1) por lo que pasa la prueba, por lo tanto se considera que la raíz tiene ausencia de hongos y levaduras.

La OMS también recomienda que según el uso del material vegetal son los límites, por ejemplo si la planta es usada tópicamente, los límites son de 10^7 UFC por g de material vegetal para microorganismos aerobios, para hongos, de 10^4 UFC por g de material vegetal. Tomando en cuenta que el uso de *I. heterophylla* es algunas veces tópico y aplicando este criterio de aceptación, la raíz es apta para ser utilizada tópicamente.

6.9.2. Identificación de Microorganismos Patógenos.

Como ya se mencionó anteriormente, la planta medicinal no debe tener un alto contenido de microorganismos y también debe de mostrar ausencia de microorganismos patógenos (*Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*). Para esto se llevaron a cabo pruebas de identificación de microorganismos cuyos resultados se mencionan a continuación.

6.9.2.1. Identificación de *Staphylococcus aureus*

En general, las colonias de *Staphylococcus sp* guardan semejanza con manchas redondas de pintura, y de acuerdo a la composición de los medios, su diámetro fluctúa entre los 2 y 3 mm; además son opacas, convexas, de bordes regulares y consistencia cremosa, su coloración varía desde el blanco (en agar gelosa sangre) a tonos amarillentos, en formulaciones que contienen teluritos como

el agar Baird-Parker y el agar Vogel-Johnson el cual también presenta un centro negro.

A diferencia de las demás especies de *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus* presenta las siguientes características macroscópicas:

- A) En agar gelosa sangre, las colonias presentan halos transparentes que corresponden a la hemólisis.
- B) En manitol-sal agar, las colonias se rodean por halos amarillos por que fermenta el manitol.

Para la identificación de *S. aureus* se utilizaron tres medios, gelosa sangre, manitol sal agar, Vogel Johnson.

Las características macroscópicas de las colonias encontradas en gelosa sangre fueron redondas, de coloración blanquecina, no presentaron halo de hemólisis; en el medio Vogel Johnson fueron de coloración rosada y no presentaron puntos negros, en comparación con el testigo de *S. aureus* en donde las colonias en Vogel Johnson fueron blancas y el medio amarillo, por otra parte las colonias en el medio manitol sal agar no presentaron halos amarillos por lo que no fermentan el manitol en comparación con el testigo de *S. aureus*.

Por lo antes mencionado, las características macroscópicas de las colonias presentes en la raíz de *I. heterophylla* no corresponden a la especie *S. aureus*, por lo que no se realizó la prueba de la coagulasa. En la Figura 8 podemos observar las características macroscópicas de las colonias presentes en la raíz de *I. heterophylla* en agar gelosa sangre, Vogel-Johnson y manitol sal agar. Las características macroscópicas se compararon con un testigo de *S. aureus*.

6.9.2.2. Identificación de Enterobacterias.

En general, las colonias de enterobacterias suelen ser blancas o grisáceas en medios que no contienen indicadores, de 2 a 6 mm de diámetro, no hemolíticas (excepto en el caso de *P. aeruginosa*), convexas, de bordes regulares, secas o mucoides en agar sangre.

6.9.2.2.1. Identificación de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa presenta las siguientes características macroscópicas:

- a) Los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* tienen un olor similar al de las tortillas húmedas.
- b) En agar cetrimida las colonias son verde-azul por la presencia de piocina dando un color verde al medio y presentan fluorescencia al exponerlas a la luz ultravioleta.

Las colonias obtenidas en el medio cetrimida después de la incubación presentan las siguientes características macroscópicas: son de color blanco y no presentan fluorescencia en presencia de luz ultravioleta por lo que no sospechamos la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*. En la Figura 8 podemos observar las características macroscópicas de las colonias que se desarrollaron en el medio cetrimida a partir de la raíz de *I. heterophylla*.

6.9.2.2.2 Identificación de *Salmonella sp*

La bacteria *Salmonella sp.* presenta las siguientes características macroscópicas:

- a) En agar verde brillante, las colonias suelen ser de color rosa transparente o blanco opaco y se encuentran rodeadas de una zona roja o rosa.

- b) En agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) las colonias son rojas con o sin centro negro.
- c) En agar sulfito de bismuto las colonias son negras o verdes.

Las colonias desarrolladas en verde brillante fueron de color verde y no estuvieron rodeadas de color rosa o rojo, el medio fue de color amarillo, en XLD las colonias fueron blancas en comparación con el testigo que presentó un color rojo y en agar sulfito de bismuto fueron de color negro, lo que pudiera indicar que se trata de *Salmonella sp*, pero en el testigo las colonias fueron verdes. Por lo anterior se elaboraron pruebas bioquímicas para discernir acerca del microorganismo del que se trataba. En la Figura 8 se pueden observar las características macroscópicas de las colonias desarrolladas en agar verde brillante, en XLD y en agar sulfito de bismuto.

Los resultados de las pruebas bioquímicas de las colonias del medio sulfito de bismuto se presentan en el Cuadro 20.

Como podemos observar en las pruebas bioquímicas, las colonias sospechosas no corresponden a las del testigo por lo que concluimos que no tenemos *Salmonella*

6.8.2.2.3 Identificación de *E. coli*.

En particular, la especie *E. coli* presenta las siguientes características macroscópicas:

- a) En agar Levine-eosina azul de metileno, las colonias de *E. coli* presentan en el centro una coloración azul o negra con brillo metálico.
- b) En agar Mac Conkey las colonias presentan una coloración roja, y en algunos casos pueden estar rodeadas por una zona de precipitación.

Las colonias desarrolladas en el medio EMB a partir de la raíz de *I. heterophylla* presentaron brillo metálico pero no la coloración azul; en el medio Mac Conkey las colonias no fueron rojas ni presentaron zona de precipitación, por lo que podemos concluir que no se trata de *E.coli*. Las características macroscópicas de este bioensayo se pueden observar en la Figura 8.

Cuadro 20. Pruebas bioquímicas para determinar la especie de *Salmonella*

| Prueba bioquímica | Colonia sospechosa | Colonia de <i>Salmonella</i> (testigo) |
|---|--------------------|---|
| Rojo de metilo | - | + |
| ureasa | + | - |
| glucosa | ++ | + |
| V.P | + | - |
| Kliger pico de flauta profundidad | + + | + - |
| H ₂ S gas | - + | + + |
| Simmons | + | + |
| nitritos | - | + |

6.9.2.3. Identificación de patógenos entéricos no fermentativos

Las características de las colonias desarrolladas en los medios para enterobacterias (Mac Conkey, bisulfito de bismuto, XLD, EMB) en la mayoría de los casos no correspondieron a las descritas en la bibliografía para enterobacterias; pero en algunos casos se presentaron las características de la familia enterobacteriaceae. Para comprobar la anterior suposición las pruebas bioquímicas Cuadro 21, resultando que la especie presente en la raíz de *I. heterophylla* es *Enterobacter aerogenes*.

Este microorganismo está ampliamente distribuido en agua, aguas negras, suelo y vegetales; también forma parte de la flora entérica comensal y no hay

reportes de que sea una especie patógena o cause diarrea. Se asocia a una variedad de infecciones oportunistas que afectan las vías urinarias y vías respiratorias (Koneman, *et al.*, 1992). Por lo que su presencia en la raíz es natural por su distribución, y no esta considerado dentro del grupo de patógenos.

Cuadro 21. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Enterobacter aerogenes*

| Pruebas bioquímicas | Colonia sospechosa | Colonia control positivo |
|--------------------------|--------------------|--------------------------|
| Producción de indol | - | - |
| Rojo de metilo | - | - |
| Voger-Proskauer | + | + |
| Citrato de Simmons | + | + |
| Ureasa | - | - |
| Hidrólisis de gelatina | - | - |
| Motilidad | - | - |
| Fermentación de manitol | + | + |
| Fermentación glucosa | + | + |
| Fermentación de sacarosa | + | + |
| Fermentación de lactosa | + | + |
| Nitratos-nitritos | + | + |
| Producción de gas | + | + |
| Pigmento amarillo | - | - |

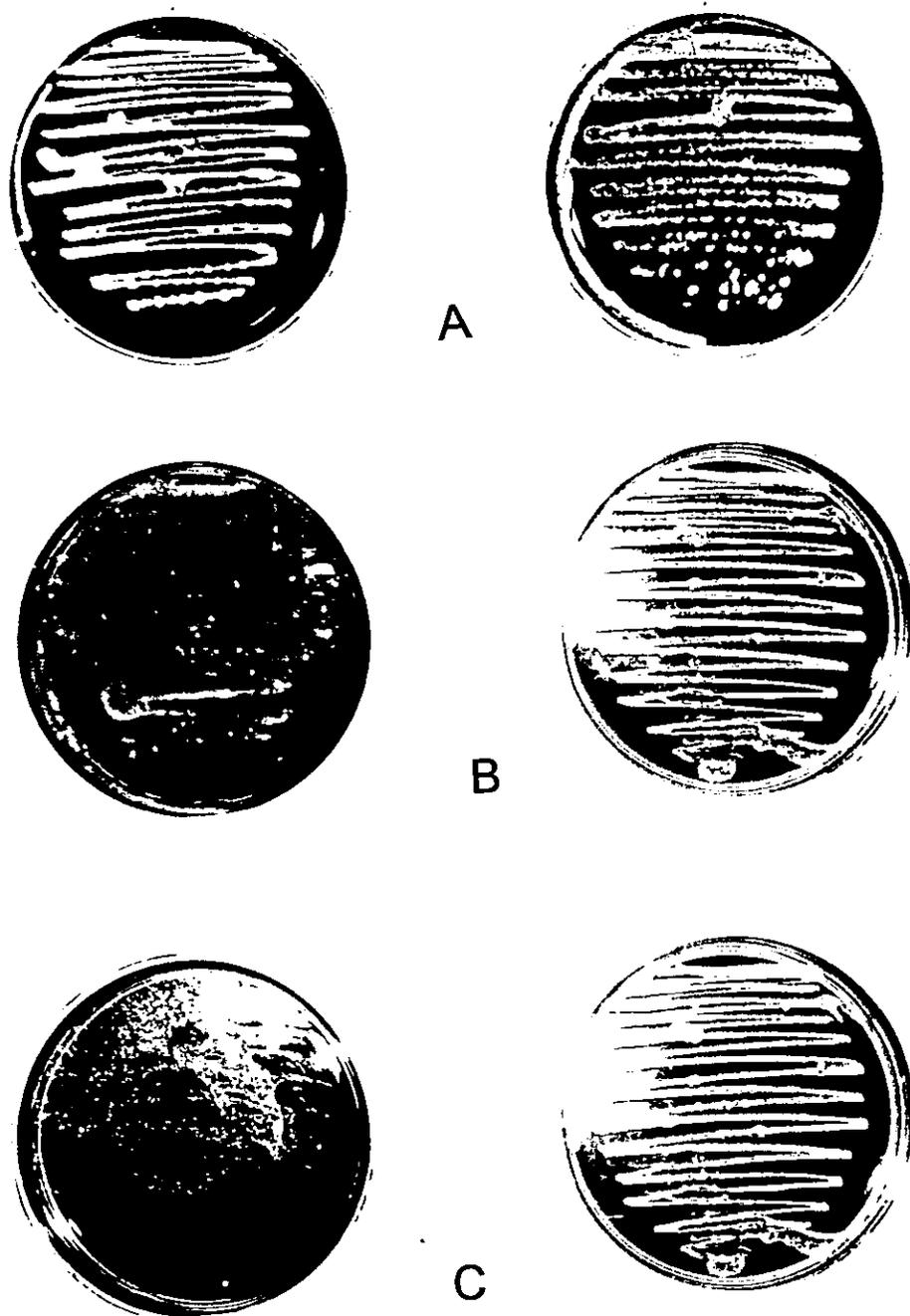


Figura 8. Medios selectivos para la identificación de *Staphylococcus aureus* izq. control positivo, der. colonias provenientes de la raíz de *I. heterophylla* A) Agar gelosa sangre, B) Agar manitol sal y C) Vogel Johnson.

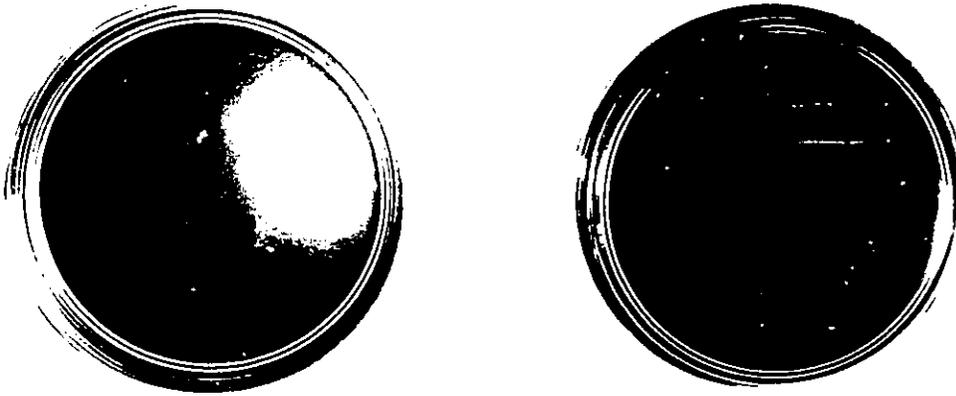
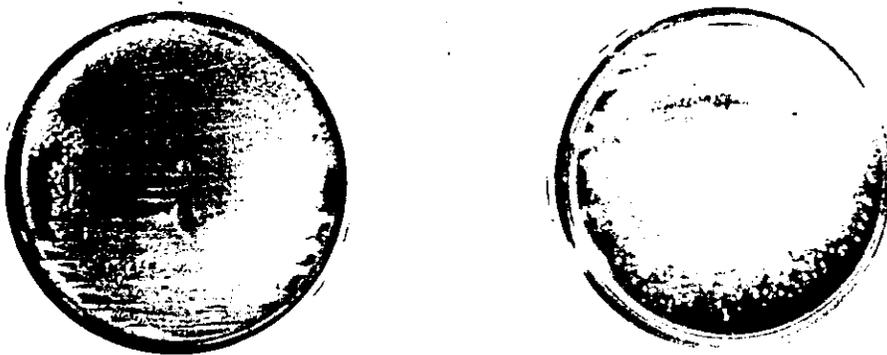


Figura 8 (continuación). Medios selectivos para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*. Agar Cetrimida; izq. control positivo, der. Colonias provenientes de la raíz de *I. heterophylla*.



A



B

Figura 8 (continuación). Medios selectivos para la identificación de *E. coli*; izq. control positivo, der. Colonias provenientes de la raíz de *I. heterophylla*. A) EMB y B) Agar Mac Conkey.

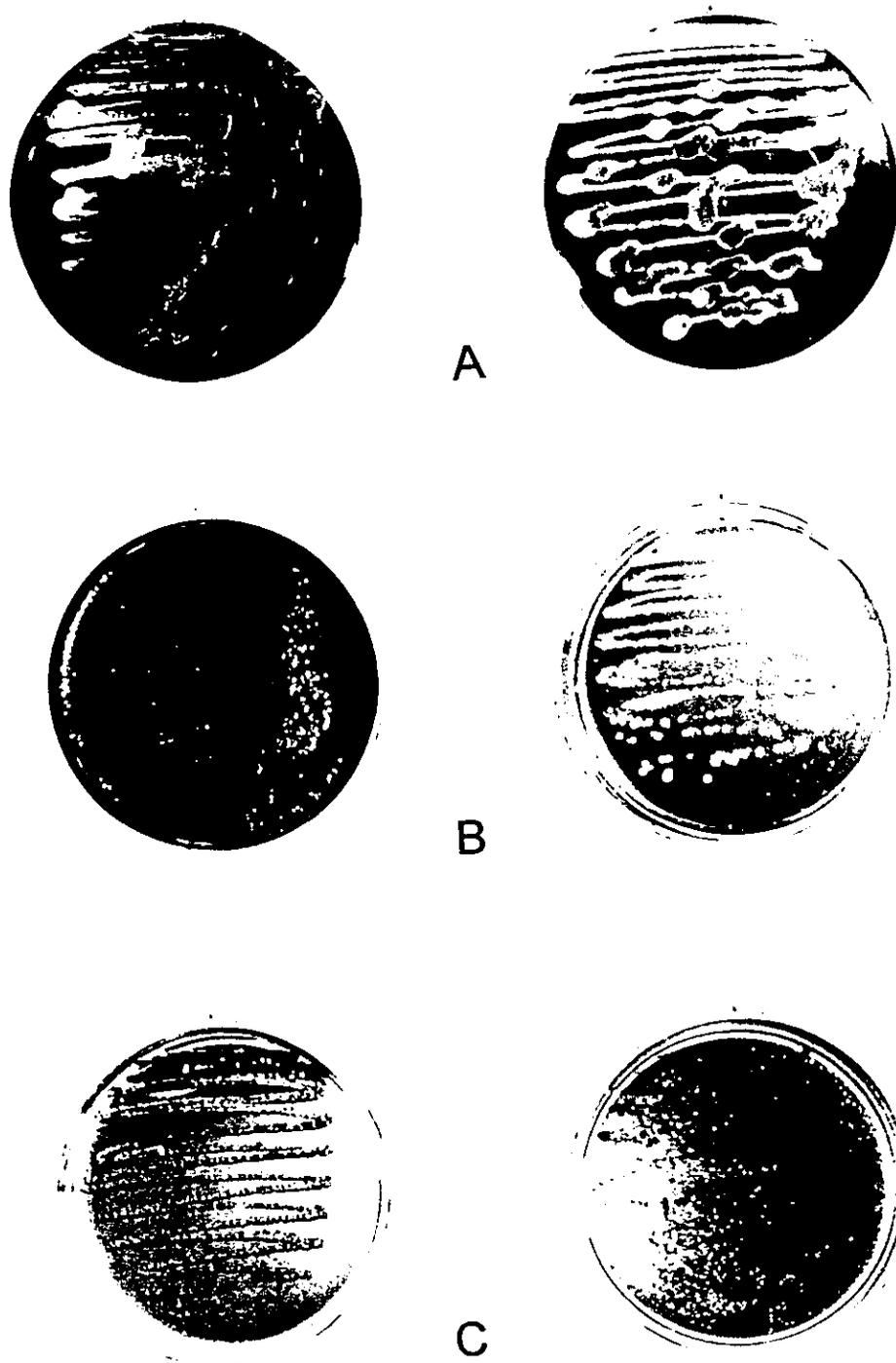


Figura 8 (continuación). Medios selectivos para la identificación de *Salmonella* sp Izq. control positivo, Der. Colonias provenientes de la raíz de *I. heterophylla* A) Verde Brillante, B) XLD y C) Agar bisulfito de bismuto.

10. IDENTIFICACIÓN DEL XANTORRIZOL POR CCF

En la Figura 9 se presenta la cromatoplaqa realizada a los distintos extractos de la raíz de *I. heterophylla* donde se ve claramente en todas ellas la presencia del xantorrizol como mancha con las mismas características, no importando la polaridad del disolvente de extracción. El R_F del xantorrizol es de 0.56.

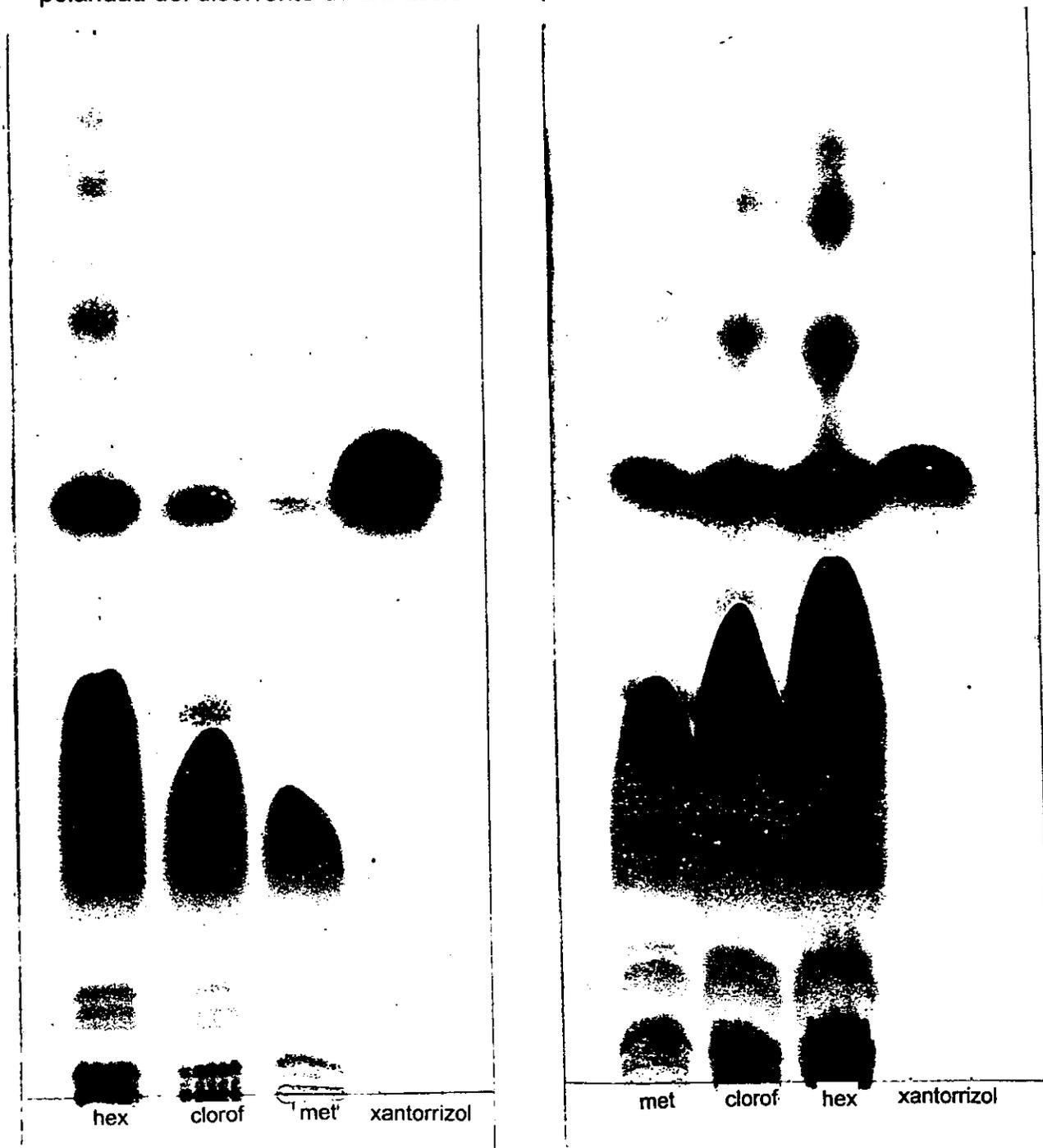


Figura 9. Cromatoplaqa en capa fina de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico comparándolos con el xantorrizol en un sistema de elución 100% diclorometano.

6.11. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE FENOLES TOTALES.

Muchos estudios ecológicos reportan el ensayo de fenoles totales en materiales biológicos. La base conceptual del ensayo es la cuantificación de la concentración total de grupos hidroxilo de naturaleza fenólica presentes en el extracto de prueba (Price *et al.*, 1977; Mole *et al.*, 1987). El método se fundamenta en una reacción de oxidación-reducción entre los hidroxilos del grupo fenol y los iones del hierro, formando un complejo colorido, conocido como azul de Prusia.

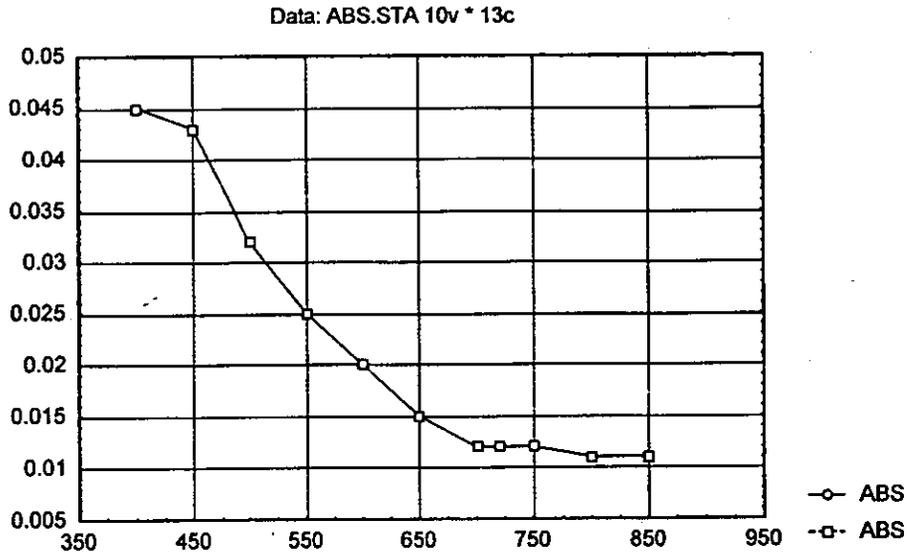
La cuantificación se lleva a cabo mediante las lecturas de densidad óptica por medio de un espectrofotómetro en una longitud de onda del visible. Como todo método analítico este debe comprobarse que es confiable, reproducible, exacto, etc., para lo cual se validó, tomando en cuenta los siguientes parámetros: especificidad, linealidad de sistema, linealidad del método, precisión, reproducción y exactitud.

A continuación se desglosará cada una de las determinaciones que se hicieron para validar la cuantificación de fenoles por el método espectrofotométrico.

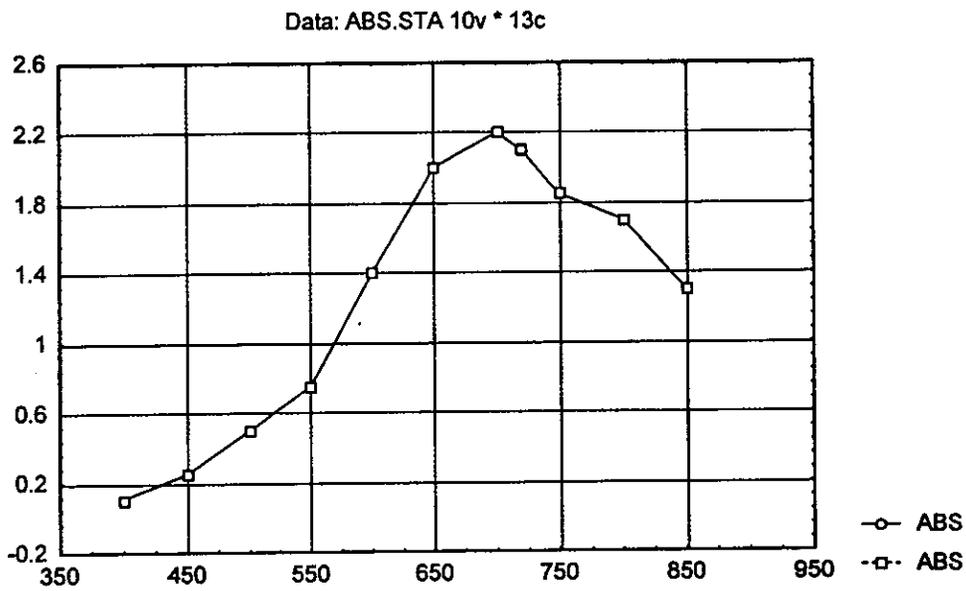
6.11.1. Especificidad

La especificidad de un método analítico es su habilidad para medir exacta y específicamente el analito en la presencia de varios componentes que puedan estar presentes en la muestra o en la matriz.

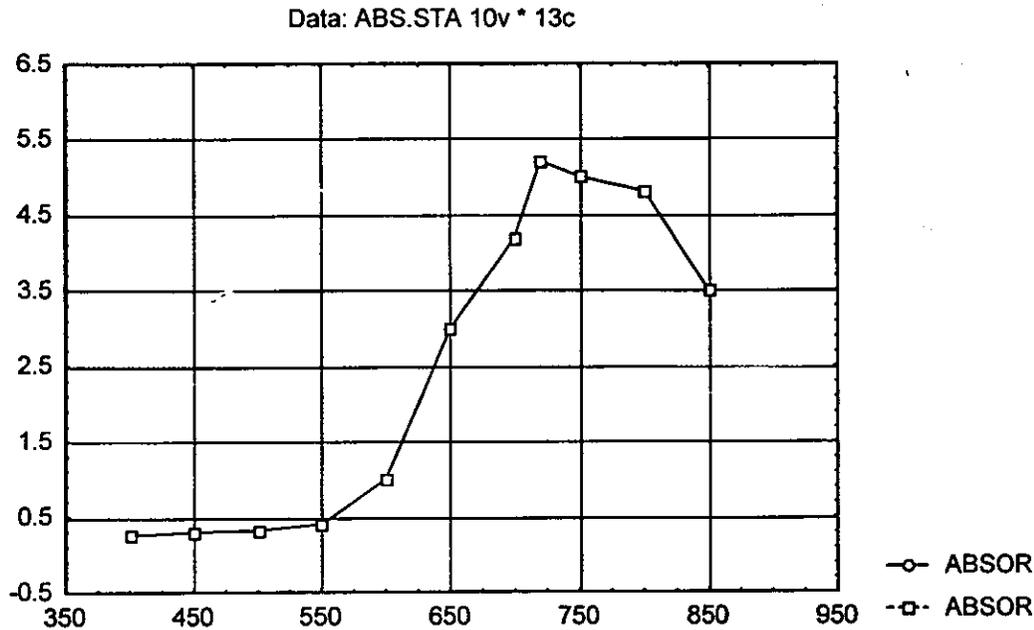
Para este parámetro se realizaron corrimientos de muestras que contenían, una matriz con metanol-agua y los reactivos de color, a diferentes longitudes de onda del visible y del U. V. (gráfica 2).



Gráfica 2 .Espectro de densidad óptica vs longitud de onda de U.V-visible ($\lambda = 400-950$ nm). Blanco (metanol-agua) con los reactivos de color



Gráfica 3. Espectro de densidad óptica vs longitud de onda de U.V-visible ($\lambda = 400-950$ nm). Ácido gálico con los reactivos de color



Gráfica 4. Espectro de densidad óptica vs longitud de onda de U.V-visible ($\lambda = 400-950$ nm). Extracto metanólico de la raíz de *I. heterophylla*, enriquecido con ácido gálico y los reactivos de color

Como podemos observar el método es específico ya que en la matriz de la extracción de la raíz de *I. heterophylla*, están presentes ácidos carboxílicos, los cuales no reaccionan y no dan el complejo de color (gráfica 4).

En la bibliografía se reporta que esta reacción se lleva a cabo únicamente con el ion fenolato y fierro (Price *et al.*, 1977) formando un complejo, dando la coloración de azul de Prussia.

6.11.2. Linearidad del sistema.

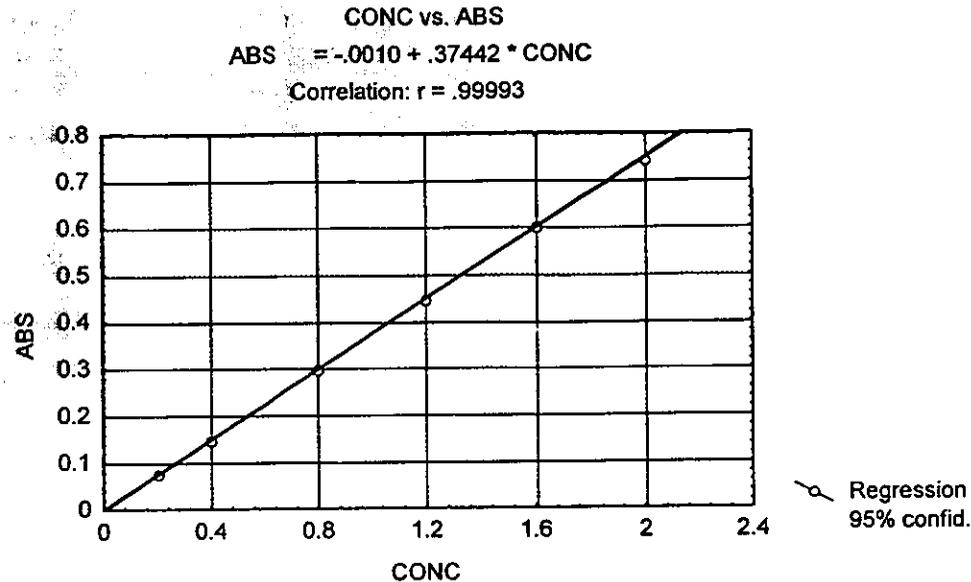
Para evaluar este parámetro se realizaron tres curvas como se indicó en la metodología; en el Cuadro 22 se encuentran reportadas las densidades ópticas a las diferentes concentraciones de ácido gálico.

Con los resultados obtenidos de las tres curvas, se hizo el análisis estadístico en el programa Statistica for Windows (Release 4.2 Stat Soft, Inc.1993), del cual obtuvimos los siguientes resultados: $r = 0.999929$ y $r^2 = 0.999858$ donde $b = -0.001036347$ y $m = 0.37442$, los parámetros estadísticos anteriores nos indicaron que b no es significativo y m es altamente significativo (Anexo 3).

“ r ” es el coeficiente de correlación que existe entre x y y , y el valor obtenido nos indicó que están relacionados linealmente, esto es, que al incrementarse la concentración se incrementa la densidad óptica proporcionalmente de acuerdo al valor de m . El comportamiento de los datos se observa en la Gráfica 5. Por otro lado al elaborar la prueba de t para r se observó que r es altamente significativa, por lo que el comportamiento de la curva de la concentración vs. la absorbancia es lineal. El parámetro b es la ordenada al origen, que en este caso, es no significativa, esto nos indicó que cuando la concentración del analito es cero la densidad óptica es de cero; r^2 es de 0.999 lo cual nos indica que la ecuación de la linealidad explica el comportamiento de los datos.

Cuadro 22. Curvas elaboradas para la linealidad del sistema

| Concentración $\mu\text{g/mL}$ | Curva 1 Densidad óptica | Curva 2 Densidad óptica | Curva 3 Densidad óptica |
|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0.2 | 0.074 | 0.0757 | 0.0768 |
| 0.4 | 0.1485 | 0.1488 | 0.1490 |
| 0.8 | 0.2964 | 0.2984 | 0.2961 |
| 1.2 | 0.4452 | 0.4441 | 0.449 |
| 1.6 | 0.60001 | 0.6031 | 0.6031 |
| 2.0 | 0.7432 | 0.7476 | 0.7505 |



Gráfica 5. Concentración del Ac. Gálico en µg/mL vs. Densidad óptica

El intervalo de confianza para el intercepto (b) es de $-0.0038 < -0.0010 < 0.0027$

El intervalo de confianza para la pendiente (m) es de $0.3512 < 0.3744 < 0.3976$

Otro parámetro que se calculó, es el coeficiente de variación de los datos obtenidos en las tres curvas anteriores, el cual fue de 0.98%. Con base en el boletín del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, donde indica que r debe ser ≥ 0.99 , $r^2 \geq 0.98$ y $C:V \leq 1.5\%$, al observar los resultados obtenidos, se concluye que la curva cumple con los requisitos descritos para la linealidad del sistema, por esto las curvas siguen un comportamiento lineal.

6.11.3. Precisión del sistema

La precisión en un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados individuales. Se determina por ensayo de un número de alícuotas de una muestra homogénea, donde se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación. Los límites establecidos por el Colegio Nacional de Químicos

Farmacéuticos Biólogos, son C.V. $\leq 1.5\%$ y para métodos microbiológicos C. V. $\leq 3.0\%$

| Concentración $\mu\text{m/mL}$ | Absorbancia | |
|-----------------------------------|-------------|----------------------|
| 0.8 | 0.2974 | Promedio |
| 0.8 | 0.2984 | 0.2971 |
| 0.8 | 0.2961 | D:E |
| 0.8 | 0.2983 | $3.21 \cdot 10^{-3}$ |
| 0.8 | 0.3022 | C. V |
| 0.8 | 0.2915 | 1.082 % |
| 0.8 | 0.2964 | |

Los datos anteriores cumplen con el criterio de precisión del sistema por lo que se concluye que el sistema es preciso.

6.11.4. Validación del método

6.11.4.1 Linealidad del método

La linealidad de un método analítico, es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por transformaciones matemáticas bien definidas, son proporcionales a la concentración de la sustancia (analito de interés) dentro de un intervalo determinado. Los criterios de aceptación son $m = 1$, $b = 0$, $r \leq 0.99$ y $r^2 = 0.98$.

Para la realización de esta determinación se elaboraron tres curvas independientes, de las cuales se obtuvo la concentración encontrada. Los resultados se encuentran en el cuadro 23.

Al realizar los cálculos (Anexo 3) en el programa mencionado anteriormente se obtuvo lo siguiente: $r = 0.99992$, $r^2 = 0.99985$, $m = 1.0023$ y $b = -0.0017$; donde m es altamente significativo mientras que b es no significativo y por lo tanto toma un

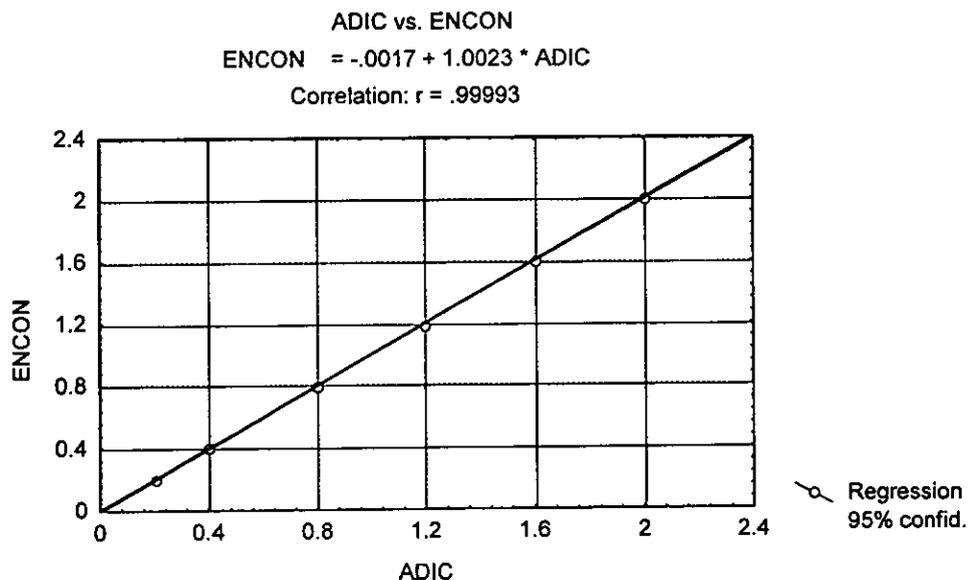
valor de cero; siguiendo con los criterios anteriores concluimos que el método es lineal.

Cuadro 23. Curvas elaboradas para la evaluación de la linealidad del método.

Cantidad adicionada vs. cantidad encontrada

| Cantidad adicionada µg/mL | Curva 1 | Curva 2 | Curva 3 |
|------------------------------|---------|---------|---------|
| 0.2 | 0.1976 | .2021 | .0.2003 |
| 0.4 | 0.3979 | .4006 | 0.4075 |
| 0.8 | 0.7966 | 0.8012 | 0.8016 |
| 1.2 | 1.1820 | 1.1990 | 1.1867 |
| 1.6 | 1.6003 | 1.6027 | 1.6160 |
| 2.0 | 1.9965 | 2.004 | 2.0159 |

En la gráfica 6 podemos observar el comportamiento de los datos, la curva que se obtuvo al realizar el análisis estadístico, y la ecuación que describe el comportamiento de los datos.



Gráfica 6. Cantidad adicionada vs cantidad encontrada del analito.

El intervalo de confianza para intercepto es de $-0.091 < -0.017 < 0.0614$
 El intervalo de confianza para la pendiente es de $0.9958 < 1.0023 < 1.02946$

6.11.4.3. Exactitud y repetibilidad al 100%

Se determinó con 6 muestras de la solución estándar de manera independiente, con la cantidad necesaria para obtener la concentración del 100%, haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista. El criterio de aceptación es que el C. V. $\leq 3\%$ y el promedio de recobro sea entre 97-103%.

Observando los datos experimentales (Cuadro 24) el porciento de recobro y el coeficiente de variación están dentro de los límites establecidos por lo que se concluye que es un método exacto.

Cuadro 24. Cantidad adicionada del analito, cantidad de recuperada y porciento de recobro

| Cantidad adicionada $\mu\text{g/mL}$ | Cantidad recuperada | % de recobro | |
|--------------------------------------|---------------------|--------------|--|
| 0.4 | 0.3928 | 98.2 | Promedio = 0.4040 D. E. C.V. |
| | 0.4095 | 102.37 | |
| | 0.4105 | 102.62 | |
| | 0.4078 | 101.95 | |
| | 0.3985 | 99.62 | |
| | 0.4050 | 101.25 | |
| 0.8 | 0.8044 | 100.55 | Promedio = 0.8037 D.E. = 0.0133 C.V. = 1.66% |
| | 0.7916 | 98.95 | |
| | 0.7890 | 98.62 | |
| | 0.8178 | 102.22 | |
| | 0.8210 | 102.625 | |
| | 0.7989 | 99.86 | |
| 1.2 | 1.1960 | 99.66 | Promedio = 1.1940 D.E. = 0.0187 C.V. = 1.56% |
| | 1.2095 | 100.79 | |
| | 1.2105 | 100.91 | |
| | 1.1899 | 99.15 | |
| | 1.1985 | 99.87 | |
| | 1.1956 | 99.63 | |

6.11.4.5. Precisión (reproducibilidad)

Este parámetro se determinó con una muestra homogénea del producto, cercana al 100 % de la concentración teórica, se analizó por dos analistas en dos días diferentes por triplicado (Cuadro 25). El coeficiente de variación debe ser menor e igual al 3%.

La reproducibilidad del método está justificada ya que la variación existente entre dos analistas y dos días diferentes es poca, si se lleva a cabo en las mismas condiciones experimentales, por lo tanto, cumple con los criterios descritos anteriormente.

Cuadro 25. Absorbancias obtenidas para la reproducibilidad

| | Analista 1 | Analista 2 |
|----------|------------------------|------------|
| 1er día | *0.2985 | *0.2978 |
| | 0.2976 | 0.2983 |
| | 0.2968 | 0.2964 |
| 2do día | *0.2890 | *0.2979 |
| | 0.2889 | 0.2968 |
| | 0.2885 | 0.2986 |
| Promedio | 0.2954 | |
| D. E. | 4.054*10 ⁻³ | |
| C. V. | 1.372 | |

*Los resultados corresponden a los valores de absorbancia

Todos los experimentos y parámetros calculados anteriormente, se utilizaron para comprobar que el método usado, para la cuantificación de fenoles en la raíz de *I. heterophylla*, está validado y es confiable con los resultados obtenidos a partir de esta metodología.

6.12 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES EN LA RAÍZ DE *I. heterophylla*.

Como se mencionó en los antecedentes, el compuesto mayoritario en la raíz de *I. heterophylla* es el xantorizol, el cual es de naturaleza fenólica, por lo que para su cuantificación se utiliza la reacción de los cianuros en presencia de fierro. Para su determinación se hicieron varias réplicas obteniéndose los siguientes resultados esquematizados en el Cuadro 26 en el que se dan los microgramos de fenoles, obtenidos por gramo de droga seca.

Se obtuvieron 13.8 mg de fenoles totales por g de raíz de *I. heterophylla* lo que indica un porcentaje elevado; esto es congruente con los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo del trabajo, ya que al realizar las pruebas histoquímicas, se observa gran cantidad de fenoles en los tejidos que forman los conductos esquizógenos y en los conductos mismos. Teniendo en cuenta que los conductos tienen gran cantidad de fenoles y comparando estos resultados con los obtenidos en la cuantificación de fenoles por el método de Price y Butler, los datos se respaldan, ya que se obtuvieron de diversas fuentes de experimentación.

Por lo anterior, concluimos que el xantorizol es una buena sustancia marcadora ya que existe en gran cantidad en la raíz y además es responsable de las actividades biológicas probadas a la planta.

El Cuadro 27 resume los resultados de las determinaciones practicadas a la raíz de *I. heterophylla*.

Cuadro 26. Cuantificación de fenoles en la raíz de *I. heterophylla*

| Peso de la muestra en g | Absorbancia | $\mu\text{g/mL}$ | Cantidad encontrada de fenoles en la raíz | mg de fenoles por g de raíz |
|-------------------------|-------------|------------------|---|-----------------------------|
| 0.0300 | 0.2915 | 0.7785 | 0.3892 mg | 12.97 |
| 0.0300 | 0.2713 | .72746 | 0.3637 mg | 12.12 |
| 0.0300 | 0.28368 | 0.7576 | 0.3788 mg | 12.62 |
| 0.0300 | 0.29744 | 0.794402 | 0.3972 mg | 13.24 |
| 0.0300 | 0.2874 | 0.7676 | 0.3838 mg | 12.79 |
| 0.0300 | 0.2924 | 0.7802 | 0.3901 mg | 13.00 |
| 0.0300 | 0.2849 | 0.7609 | 0.3804 mg | 12.68 |
| 0.0300 | 0.28912 | 0.7722 | 0.3861 mg | 12.87 |
| 0.0300 | 0.2996 | 0.8002 | 0.4001 mg | 13.33 |
| 0.0300 | 0.3177 | 0.8485 | 0.4242 mg | 14.14 |
| 0.0300 | 0.3041 | 0.8122 | 0.4061 mg | 13.54 |
| 0.0300 | 0.308 | 0.8226 | 0.4113 mg | 13.71 |
| promedio | | | | 13.08 \pm 0.16 |
| D.E | | | | 0.544 |
| C.V. | | | | 4.16 % |

Cuadro 27. Comparación de resultados obtenidos de la raíz de *I. heterophylla* con los criterios de aceptación internacional.

| Característica | Referencia | Criterio de aceptación | Resultados |
|-----------------------------|--------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| Identificación macroscópica | | | Estructura propia de la planta |
| Identificación microscópica | | | Anatomía propia de la planta |
| Material extraño | Farmacopea Europea | menos del 2% | 0.83% |
| Cenizas totales | | No hay especificaciones | 4.77±0.12 % |
| Cenizas insolubles en ácido | | No hay especificaciones | 0.79±0.036 % |
| Perdida al secado | | No hay especificaciones | 3.76±0.11 % |
| Índice de hinchamiento | | No hay especificaciones | 25.83±1.4 % |
| Material extraíble | | No hay especificaciones | |
| Hexano | | No hay especificaciones | 5.208±0.128 % |
| EtOH | | No hay especificaciones | 6.457±0.125 % |
| EtOH-H ₂ O 7:3 | | No hay especificaciones | 8.662±1.140 % |
| Metales pesados | | | |
| mercurio | OMS | menos de 10 ppm | no se detecto |
| cadmio | OMS | menos de 10 ppm | no se detecto |
| plomo | OMS | menos de 10 ppm | 7.29±0.168 ppm |
| Lim. Microbiano UFC | | | |
| Método en placa | | | |
| Bacterias | OMS | no mas de 10 ² UFC por g | 3000 UFC por g |
| hongos y levaduras | OMS | no mas de 10 ³ UFC por g | < de 10 UFC por g |
| Método en Tubo | | | |
| Bacterias | OMS | no mas de 10 ⁶ UFC por g | 1100 UFC por g |
| hongos y levaduras | OMS | no mas de 10 ⁶ UFC por g | < de 10 UFC por g |

Cuadro 27.(Continuación) Comparación de resultados obtenidos de la raíz de *I. heterophylla* con los criterios de aceptación internacional.

| Identificación de patógenos | | | |
|--------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|--|
| <i>S. aureus</i> | OMS | Ausencia | Ausencia |
| <i>E. coli</i> | OMS | Ausencia | Ausencia |
| <i>Salmonella sp</i> | OMS | Ausencia | Ausencia |
| <i>P. aeruginosa</i> | OMS | Ausencia | Ausencia |
| Cromatografía en capa fina | | No hay referencia | R _F 0.56 del Xantorriazol |
| Parámetros de validación | | | |
| Linealidad del sistema | Col. Nac. de QFB de México | $r \geq 0.99$ C.V.=1.5% | $r=0.99993$ C.V.=0.98% |
| Precisión del sistema | Col. Nac. de QFB de México | C.V. =1.5% | C.V.=1.082% |
| Linealidad del método | Col. Nac. de QFB de México | $m=1$ $b=0$ $r=0.99$ | $m=1.0023$ $b=-0.0017$ $r=0.99992$ |
| Exactitud y repetibilidad del método | Col. Nac. de QFB de México | C.V $\leq 3\%$ recobro del 97-103% | C.V =1.66% Recobro 98-102 |
| Reproducibilidad del método | Col. Nac. de QFB de México | C.V $\leq 3\%$ | C.V. =1.372% |

CONCLUSIONES

El estudio de la raíz de *Iostephane heterophylla* permitió su evaluación química y microbiológica generando resultados que dan las siguientes conclusiones:

- Mediante la evaluación de cenizas, pérdida al secado, índice de hinchamiento, elementos extraños, material extraíble, metales pesados y determinaciones microbiológicas (pruebas que nos indican la pureza de una materia prima vegetal), se concluyó que la droga vegetal estudiada es pura, ya que no tiene contaminantes que puedan afectar la seguridad del consumidor o pueda afectar la efectividad de la droga misma.
- El hallazgo de *P. enterobacter* como contaminante de la raíz no excluye a la planta medicinal como droga, ya que ese microorganismo no es patógeno. Se recomendaría una limpieza externa a la materia prima vegetal previa a su uso.
- Las determinaciones de identidad, que se efectuaron, como fueron las características micro y macroscópicas, la cromatografía en capa delgada y la cuantificación de fenoles permiten identificar los componentes de la raíz y en que cantidad se encuentran.
- Se estableció al xantorizol como sustancia marcadora de calidad. Esta se puede evaluar cualitativa y cuantitativamente.
- Los resultados obtenidos del trabajo realizado pueden servir como referencia a un estudio más elaborado para la obtención de una monografía de *Iostephane heterophylla*

PERSPECTIVAS

La conclusión de un trabajo de investigación genera preguntas y por lo tanto nuevas perspectivas que amplían el tema. Particularmente la presente investigación sobre la planta medicinal *Istephane heterophylla* permite sugerir la reproducción del estudio en diferentes lotes de plantas, los cuales tendrían que recolectarse en diferentes épocas, lugares, climas, y edad de la planta para tener una muestra representativa de la población y poder entonces especificar los límites de muchas determinaciones que en este trabajo no fue posible, ya que solo se contábamos con un solo lote.

Bibliografía

- ◆ Aguilar, M. I., Delgado, G., (1995) Novel bisabolene glycoside and other constituents from the medicinal plant *Iostephane heterophylla* (Asteraceae). *J. Natural Products*, **7**, 155-162.
- ◆ Aguilar, M. I., Delgado, G., Bye, R. y Linares, E. (1993) Bisabolene, polycyclic diterpenoids and other constituents from the roots of *Iostephane heterophylla*. *Phytochemistry*, **33**, 1161-1163.
- ◆ Aguilar, M. I., Delgado, G., Hernandez, M. L. y Villarreal, M. L. (2000) Bioactive compounds from *Iostephane heterophylla* (Asteraceae). *J. Natural Products*, **8**, 35-40
- ◆ Akerele, O. (1988) Medicinal Plants and Primary Health care: an agenda for action. *Fitoterapia*, **59**, 355-357
- ◆ Anzures y Bolaños La Medicina Tradicional Mexicana; SEP México (1981); pp 9-11.
- ◆ Anzures, M. C. y Bolaños La Herbolaria en México; Coordinación Cultural UNAM México (1982); pp17-20, 49-57.
- ◆ Argueta, V. A., Cano, A. L., y Rodarte M.E.. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Vol II, primera edición, INI México 1994 772.
- ◆ Ballantyne, M., McCabe, P. H. y Murray, D. H. (1971) Claisen rearrangements-II. Synthesis of six natural coumarins. *Tetrahedron* **27**, 871.

- ◆ Bohlmann y Le Van Ngo. (1977) Neue Kaurensaure-derivative aus Wedelia-arten. *Phytochemistry* **16**, 579-581.
- ◆ Bohlmann, F. y Jakupovic, J. (1978) Über neue chromene und andere inhaltsstoffe von *Lagascea rigida*. *Phytochemistry*, **17**, 1677-1678.
- ◆ Bouissou, (1973) Las Plantas Medicinales; *Salud Mundial* **1**, 3-17.
- ◆ Brevoort, P. (1996). The United States Market for Botanicals. *CYTED* pp 45-52.
- ◆ Bye, R. y Linares, E. (1987) A Study of four medicinal plant complexes of México and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*, **19** 153-183.
- ◆ Bye, R. (1986) Medicinal Plants of the Sierra Madre: Comparative Study of Tarahumara and Mexican Market Plants. *Economic Botany*, **40(1)**, 103-124
- ◆ Cowen D., Helfand, W. (1994). Historia de la Ffarmacia. Editorial Libros de Barcelona, Primera edición España.
- ◆ D'Andreta, C. Plantas Medicinales. TEIDE, primera edición España (1972); pp 6-11.
- ◆ Dean, F. M. y Parton, B. (1969) The structure and synthesis of (+)-Obliquin. *J. Chem. Soc.(C)*, 526.

- ◆ Diario Oficial Mexicano, Septiembre de 1998.
- ◆ Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Sexta edición; Secretaría de Salud, México, 1994.
- ◆ Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Séptima edición; Secretaría de Salud, México, 2000.
- ◆ Farnsworth N. R. y Warner, H. (1990) Economic and medicinal plant research. 4, 38-56.
- ◆ Guías oficiales de validación de la dirección general de control de Insumos para la salud, Secretaria de Salud, México 1995
- ◆ Grünwald, J., "The European Phytomedicines Market. Figures, Trends, Analyses", en Herbalgram, 34, 1995, pp 60-65.
- ◆ Henrick, C. K. y Jefferies, P. R. (1964) The diterpenes of *Ricinocarpus stylosus* Diels. *Australian Journal of Chemistry* 17, 915-933.
- ◆ Hersch, P. Demanda mundial en: Destino común: Los recolectores y su flora medicinal. Primera edición. INAH, México D. F. 1996 pp 22-32.
- ◆ Hertz, W., Govindan, S. V. y Watanabe, K. (1982) Diterpenes of *Helianthus rigidus* y *H. salicifolius*. *Phytochemistry* 22, 2021-2025.
- ◆ Herz, W. y Kulanthaivel, P. (1983) *Ent*-kauranes and trachylobanes from *Helianthus radula*. *Phytochemistry* 22 2543-2546.

- ◆ Herz, w. y Sharma R. P. (1976) New hydroxilated ent-kauranoic acids from *Eupatorium album*. *Journal of Organic Chemistry* **41**, 1021-1026.
- ◆ Koneman, E., Allen S., Dowell V., Janda W., Sommers H. y Winn, W.) *Diagnóstico microbiológico; Tercera edición, Médica Panamericana; México 1992; pp 203-250, 413-450.*
- ◆ Kupchan, M. (1971) *Drugs from Natural Products-Plants Sources Drug Discovery advances in Chemistry Series 108, 1-13.*
- ◆ Jerzy, R. *Vegetación de México, Limusa, México 1978, 85-86*
- ◆ Lock, U. O. (1996) *Red Iberoamericana de Productos Naturales de Uso Medicinal. CYTED; pp 27-28.*
- ◆ López Curto, M.L., Márquez Guzmán, J. y Murguía Sánchez, G. *Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas, Facultad de Ciencias UNAM, 1998; pp 93-95.*
- ◆ Lozoya, X (1997) *Fármacos de Origen Vegetal de Ayer y de Hoy; Investigación y Ciencia; pp 4-10.*
- ◆ Lozoya, X. *Función de las plantas Medicinales en la Medicina del Siglo XXI, en la Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Edición conmemorativa. Secretaría de Salud 1993; pp 255-270.*
- ◆ *Manual de medios de cultivo editada por Merck, México (1994); pp 45-170.*

- Marini, G. (1981) Chinese experience regarding the use of plants in traditional Medicine and Popular Medicine. *Fitoterapia*, **2**, 51-63
- ◆ Martínez, M. Las Plantas medicinales de México; sexta edición; Editorial Botas; 1989, pp 279.
- ◆ Metcalfe, C.R. y Chalk L. Anatomy of the dicotyledon leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses; quinta edición, Vol II Oxford and the Clarendon Press, Inglaterra 1972, pp783-805.
- ◆ Miller, J. C. y Miller J. N. Estadística para Química Analítica; segunda edición, Addison-Wesley Iberoamericana, México 1993, pp95-104.
- ◆ Mole, S. y Waterman P. G. (1987) A Critical Analysis of Techniques for Measuring Tannins in Ecological Studies; *Oecologia* **72**, 137-147.
- ◆ Nadinic J. (1996) Experiencia de los laboratorios Pharmatrix. *CYTED*, 71-75.
- ◆ Navarrete A. (2000) Comunicación personal
- ◆ Oberti, J. C., Pomilio, B. y Gros, E. (1980) Diterpene and sterols from *Wedelia glauca*. *Phytochemistry* **19**, 1051-1052.
- ◆ Ohno, N., Gershenzon, J., Neuman, P. y Mabry, T. J. (1981) Diterpene carboxylic acids and a heliangolide. *Phytochemistry*, **20**, 2393-2395.
- ◆ Organización de las Naciones Unidas para el desarrollo Industrial; Conferencia sobre medicinales citadas en el "Marketing of medicinal

- Herbs and spice plants in France, Apéndice del Journal of Sanitary Industry, Francia, 134 (9) 19988.
- ◆ Organización Mundial de Salud (1987) Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials.
 - ◆ Peigen, X. (1988) Medicinal Plants and Primary Health care: An agenda for Action **59**, 355
 - ◆ Price, M. L. y Butler, L. (1977) Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain, *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 1268-1273.
 - ◆ Pyrek, J. (1970) New pentacyclic diterpene acid. Trachyloban-19-oic from sunflower. *Tetrahedron* **26**, 5029-5032.
 - ◆ Ramírez-Gama, R., Luna, M. B., Mejía, Ch. A., Reyes, T, García, V. y Müggenburg, Manual de Microbiología General; Facultad de Química UNAM México 1992.
 - Reglamento de Insumos para la Salud, Diario Oficial Septiembre de 1998
 - ◆ Rimpler, H., Hansel, R. y Kochendoerfer, L. (1970) Xanthorrhizol, ein neues sesquiterpen aus *Curcuma xanthorrhiza*. *Z. Naturforsch.* **25B** 995.
 - ◆ Shafizadeh, F. y Melnikoff, A. B. (1970) Coumarins of *Artemisia trideniata* ssp. *Vaseyana*. *Phytochemistry*, **9**, 1311-1316.
 - ◆ Shih-Lin, H (1977) Las plantas medicinales de China, *Medicina tradicional*, **1**, 15-22.

- ◆ Silverman M., *Drogas mágicas Oropella* Santiago de Chile, 1963. pp 20-47.
- ◆ Tyler, V. *The Honest Herbal. A sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies*, Nueva York, Pharmaceutical Products Press, 1993.
- ◆ Trease-Evans, *Farmacognosia*, Interamericana 1987, pp 134-150, 829-839.
- ◆ Villar del Fresno, A. M. (1996) Validación científica de las plantas medicinales. *CYTED* pp 35-41.
- ◆ Villavicencio, M. A. *Plantas Útiles del Estado de Hidalgo*. Primera edición, Universidad Autónoma de Hidalgo, México 1995, pp 25-26.
- ◆ William, W., Hines, D. y Montgomery *Probabilidad y Estadística para Ingenieros y Administración*; tercera edición, CECSA, México, 1988; pp 389-415.

- ◆ Silverman M., *Drogas mágicas Oropella* Santiago de Chile, 1963. pp 20-47.
- ◆ Tyler, V. *The Honest Herbal. A sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies*, Nueva York, Pharmaceutical Products Press, 1993.
- ◆ Trease-Evans, *Farmacognosia*, Interamericana 1987, pp 134-150, 829-839.
- ◆ Villar del Fresno, A. M. (1996) *Validación científica de las plantas medicinales. CYTED* pp 35-41.
- ◆ Villavicencio, M. A. *Plantas Útiles del Estado de Hidalgo*. Primera edición, Universidad Autónoma de Hidalgo, México 1995, pp 25-26.
- ◆ William, W., Hines, D. y Montgomery *Probabilidad y Estadística para Ingenieros y Administración*; tercera edición, CECSA, México, 1988; pp 389-415.

Etilen glicol 75 mL
Rojo O necesario para la saturación
Mezclar perfectamente el butanol y el etilen glicol, posteriormente agregar el rojo "o" hasta que la solución esté saturada. Consérvase en refrigeración.

⊗Ácido peryódico

Ac. peryódico 0.6 g
Agua destilada 100 mL
Disolver el ácido peryódico en agua y aforar a 100 mL

⊗Solución de Schiff

Fucsina básica 0.1 g
Ac. acético 2 mL
Meta-bisulfito de sodio 2g
Agua destilada 100mL

Disolver la fucsina en la solución ácida del ácido acético, agua y el meta-bisulfito de sodio, en agitación constante durante 2 horas, la solución no debe presentar color. Conservar en refrigeración

⊗Azul negro de naftol

Azul negro de naftol 1g
etanol al 50% 100 mL

Agregar el azul de negro de naftol en el alcohol; agitar hasta disolver totalmente el azul y filtrar.

⊗Floroglucinol

floroglucinol 0.2 g
etanol 10 mL

Disolver el floroglucinol en etanol

⊗Solución de vainillina

| | |
|------------|-------|
| vainillina | 0.2g |
| etanol | 10 mL |

Disolver la vainillina en etanol

⊗Rojo de rutenio

Se prepara una solución 1:5000 con rojo de rutenio en agua

⊗Permanganato de potasio

Se prepara una solución al 1% en agua

⊗Jalea glicerinada

| | |
|----------------|--------|
| Gelatina | 50 g |
| Glicerina | 250 mL |
| Fenol | 5 g |
| Agua destilada | 200 mL |

Disolver la gelatina en agua caliente, después de disolver la gelatina espere a que baje la temperatura y agregue la glicerina y el fenol agitando vigorosamente. Consérvese en refrigeración y antes de usar fundir en baño María.

⊗Solución reveladora de vainillina

Vainillina

Acido sulfúrico concentrado

etanol

ANEXO 2

Medios de cultivo

⊗Agar tripti-caseína

| | |
|------------------|------|
| Caseína | 15g |
| Cloruro de sodio | 5 g |
| Agar-agar | 15 g |
| Triptona | 15 g |
| Agua destilada | 1 L |

Preparación: Disolver 40 g del medio por 1 litro de agua destilada, esterilizar durante 15 minutos a 121°C, verter en cajas de petri.

⊗Agar gelosa sangre

| | |
|----------------------|------------|
| Extracto de peptonas | 20.0 g |
| Cloruro de sodio | 5.0 g |
| Agar-agar | 15.0 g |
| Sangre | 50 a 80 mL |
| Agua destilada | 1 L |

Preparación: Disolver 40g del medio por litro de agua destilada, esterilizar a 121°C durante 15 minutos, enfriar a 45-5 °C, e incorporar 50 mL de sangre desfibrinada t verter en cajas petri.

⊗Agar Sabouraud

| | |
|----------------|------|
| Peptona | 10 g |
| Glucosa | 20 g |
| Agar-agar | 17.0 |
| Agua destilada | 1 L |

Preparación: Disolver 30 g del medio en un litro de agua destilada, esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C, verter en cajas de petri

⊗Agar Vogel Johnson

| | |
|-------------------------|---------|
| Peptona de caseína | 10 g |
| Extracto de levadura | 5 g |
| Manitol | 10 g |
| Cloruro de litio | 5 g |
| Glicina | 10 g |
| Rojo de fenol | 0.025 g |
| Agar-agar | 13 g |
| Telurito de potasio | 0.2 g |
| Hidrofosfato dipotásico | 5.0 |
| Agua destilada | 1 L |

Preparación: Disolver 58 g del medio por litro de agua y esterilizar durante 15 minutos a 121 °C, dejar enfriar a 50 °C y agregue el telurito de potasio en forma de solución esterilizada por filtración, verter en cajas de petri.

⊗Manitol sal agar

| | |
|-------------------|---------|
| Peptona | 10.0 g |
| Extracto de carne | 1.0 g |
| Cloruro de sodio | 75.0 g |
| Manitol | 10.0 g |
| Rojo de fenol | 0.025 g |
| Agar-agar | 12.0 g |
| Agua destilada | 1 L |

Preparación: Disolver 108 g del medio por litro de agua y esterilizar durante 15 minutos a 121°C, verter en cajas de petri.

⊗McConkey

| | |
|--------------------|--------|
| Peptona de caseína | 17.0 g |
| Peptona de carne | 3.0 g |
| Cloruro de sodio | 5.0 |

| | |
|--------------------------|--------|
| Lactosa | 10.0 g |
| Mezcla de sales biliares | 1.5 g |
| Rojo neutro | 0.03 g |
| Cristal violeta | 0.001 |
| Agar-agar | 13.5 g |
| Agua destilada | 1 L |

Preparación: Disolver 108g del medio por 1 litro de agua destilada, esterilizar durante 15 minutos a 121°C, verter en cajas de petri.

⊗Cetrimida

| | |
|---|---------|
| Peptona de gelatina | 20.0 g |
| Cloruro de magnesio | 1.4 g |
| Sulfato de potasio | 10.0 g |
| N-cetil-N, N, N-trimetilamonibromuro (cetrimida) | 0.3 g |
| Agar-agar | 13.0 g |
| Glicerina | 10.0 mL |
| Agua destilada | 1L |

Preparación: Disolver 44.5 g del medio por 1 litro de agua destilada y agregar posteriormente 10 mL de glicerina, esterilizar durante 15 minutos a 121°C, verter en cajas de petri.

⊗Verde brillante

| | |
|----------------------|--------|
| Peptona de caseína | 5.0 g |
| Peptona de carne | 5.0 g |
| Extracto de levadura | 3.0 g |
| Cloruro de sodio | 5.0 g |
| Lactosa | 10.0 g |
| Sacarosa | 10.0 g |
| Rojo de fenol | 0.08 g |

| | |
|-----------------|----------|
| Verde brillante | 0.0125 g |
| Agar-agar | 13.0 g |
| Agua destilada | 1L |

Preparación: Disolver 51g del medio por 1 litro de agua destilada, esterilizar durante 15 minutos a 121°C, verter en cajas de petri.

⊗XLD xilosa-lisina-desoxicolato

| | |
|----------------------|--------|
| Extracto de levadura | 3.0 g |
| Cloruro de sodio | 5.0 g |
| Xilosa | 3.5 g |
| Lactosa | 7.5 g |
| Sacarosa | 7.5 g |
| Lisina | 5.0 g |
| Desoxicolato sódico | 2.5 g |
| Tiosulfato de sodio | 6.8 g |
| Citrato de amonio | 0.8 g |
| Rojo de fenol | 0.08 g |
| Agar-agar | 13.5 g |
| Agua destilada | 1 L |

Preparación: Disolver 55 g del medio por 1 litro de agua destilada, esterilizar durante 15 minutos a 121°C, verter en cajas de petri.

⊗EMB Eosina-azul de metileno-lactosa

| | |
|-------------------------|----------|
| Peptona | 10.0 g |
| Lactosa | 10.0 g |
| Hidrofosfato dipotásico | 2.0 g |
| Eosina amarillenta | 0.4 g |
| Azul de metileno | 0.0625 g |
| Agar-agar | 13.5 g |
| Agua destilada | 1L |

Preparación: Disolver 36 g del medio por litro de agua y esterilizar durante 15 minutos a 121°C, verter en cajas de petri.

⊗Caldo de enriquecimiento selenito-cistina

| | |
|------------------------|--------|
| Peptona de caseína | 5.0 g |
| Cistina | 0.01 g |
| Lactosa | 4.0 g |
| Fosfato de sodio | 2.0 g |
| Hidroselenito de sodio | 4.0 g |
| Agua destilada | 1 L |

Preparación: Disolver 23 g del medio por 1 litro de agua destilada, esterilizar por filtración.

⊗Caldo tetrionato

| | |
|--------------------------|--------|
| Peptona de caseína | 2.5 g |
| Peptona de carne | 2.5 g |
| Mezcla de sales biliares | 1.0 g |
| Carbonato de calcio | 10.0 g |
| Ttosulfato de sodio | 30.0 g |
| Aditivos | |
| Yoduro de potasio | 5.0 g |
| Yodo | 6.0 g |
| Agua destilada | 1 L |

Preparación: Disolver 46 g del medio por 1 litro de agua destilada si es necesario calentar brevemente, esterilizar por filtración.

⊗Agar Simmons

| | |
|-------------------------|-------|
| Dihidrófosfato amónico | 1.0 g |
| Hidrofosfato dipotásico | 1.0 g |
| Cloruro de sodio | 5.0 g |

| | |
|---------------------|--------|
| Citrato de sodio | 2.0 g |
| Sulfato de magnesio | 0.2 g |
| Azul de bromotimol | 0.08 g |
| Agar-agar | 13.0 g |
| Agua destilada | 1 L |

Preparación: Disolver 22.5 g del medio por 1 litro de agua destilada, esterilizar durante 15 minutos a 121°C, verter en tubos de ensayo y dejar solidificar inclinados.

⊗Agar kligler

| | |
|----------------------|---------|
| Peptona de caseína | 15.0 g |
| Peptona de carne | 5.0 g |
| Extracto de carne | 3.0 g |
| Extracto de levadura | 3.0 g |
| Cloruro de sodio | 5.0 g |
| Lactosa | 10.0 g |
| Glucosa | 10.0 g |
| Sacarosa | 10.0 g |
| Amonio de hierro III | |
| Citrato | 0.5 g |
| Tiosulfato sódico | 0.3 g |
| Rojo de fenol | 0.024 g |
| Agar-agar | 12.0 g |
| Agua destilada | 1 L |

Preparación: Disolver 65g del medio por litro de agua y esterilizar durante 15 minutos a 121°C, verter en tubos de ensayo dejar solidificar en posición inclinada.

⊗Caldo lactosa

| | |
|---------------------|-------|
| Peptona de gelatina | 5.0 g |
| Extracto de carne | 3.0 g |

Lactosa 5.0g

Agua destilada 1 L

Preparación: Disolver 13 g del medio por 1 litro de agua destilada, esterilizar durante 15 minutos a 121°C.

⊗ Caldo urea

Extracto de levadura 0.1 g

Dihidrofosfato potásico 9.1 g

Hidrofosfato disódico 9.5 g

Urea 20.0 g

Rojo de fenol 0.01 g

Agua destilada 1 L

Preparación: Disolver 38.5 g del medio por 1 litro de agua destilada, esterilizar por filtración.

⊗ Agar nutritivo

Peptona de carne 5.0 g

Extracto de carne 3.0 g

Agar-agar 12.0 g

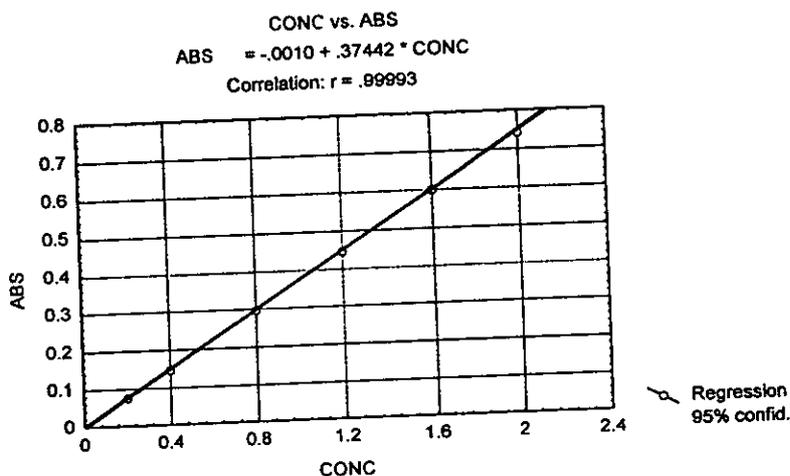
Agua destilada 1 L

Preparación: Disolver 20 g del medio en 1 L de agua destilada, esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Verter en cajas petri.

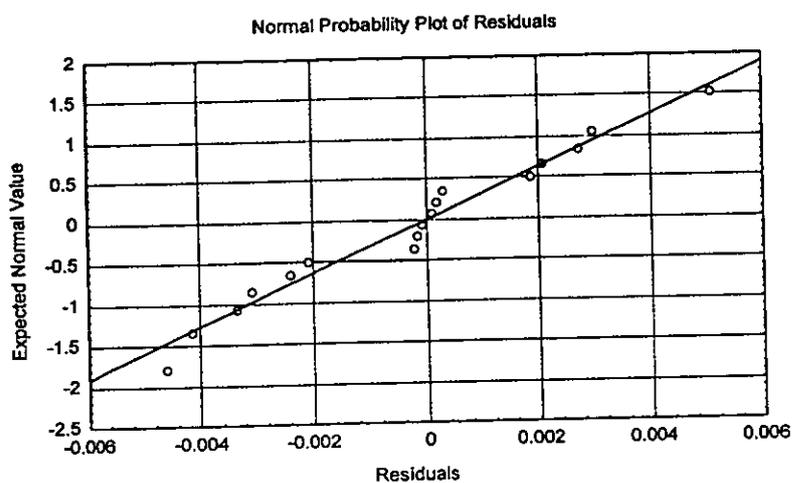
Anexo 3

A) linealidad del sistema

| STAT. MULTIPLE REGRESS. | | Regression Summary for Dependent Variable: ABS (maiz.sta) | | | | |
|-------------------------|---------|---|----------|---------------|----------|---------|
| | | R= .99992933 R²= .99985866 Adjusted R²= .99984983 F(1,16)=1132E2 p<.000000 Std.Error of estimate: .00301 | | | | |
| N=18 | BETA | St. Err. of BETA | B | St. Err. of B | t(16) | p-level |
| Intercept | | | -.001036 | .001351 | -.7672 | .454143 |
| CONC | .999929 | .002972 | .374417 | .001113 | 336.4353 | .000000 |

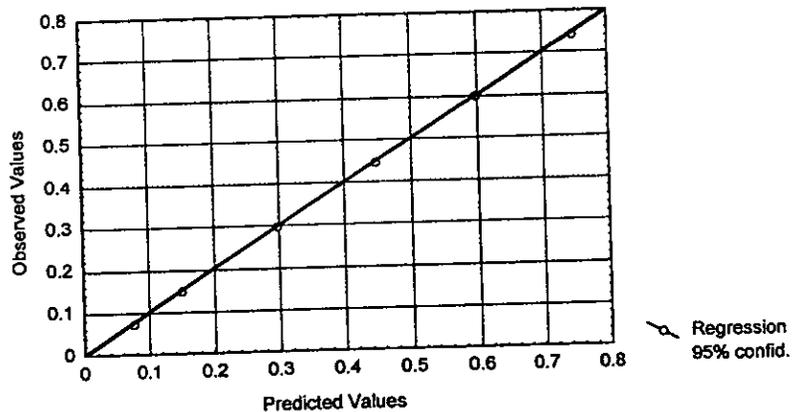


| STAT. MULTIPLE REGRESS. | | Analysis of Variance (maiz.sta) | | | |
|-------------------------|-----------------|---------------------------------|-------------|----------|---------|
| Effect | Sums of Squares | df | Mean Square | F | p-level |
| Regress. | 1.023373 | 1 | 1.023373 | 113188.7 | .000000 |
| Residual | .000145 | 16 | .000009 | | |
| Total | 1.023517 | | | | |



| STAT. MULTIPLE REGRESS. | | Predicted & Residual Values (maiz.sta) Dependent variable: VARI | | | | | | | |
|-------------------------|----------------|--|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| Case No. | Observed Value | Predictd Value | Residual | Standard Pred. v. | Standard Residual | Std.Err. Pred.Val | Mahalns. Distance | Deleted Residual | Cook's Distance |
| 1 | .200000 | .200526 | -.000526 | -1.27098 | -.06554 | .003116 | 1.615386 | -.000620 | .000448 |
| 2 | .400000 | .399474 | .000526 | -.96736 | .06548 | .002671 | .935778 | -.000591 | .000300 |
| 3 | .800000 | .794433 | .005567 | -.36460 | .69331 | .002022 | .132930 | .005944 | .017362 |
| 4 | 1.200000 | 1.191794 | .008206 | .24183 | 1.02184 | .001950 | .058483 | -.008720 | .034784 |
| 5 | 1.600000 | 1.605446 | -.005446 | .87312 | -.67817 | .002544 | .762343 | -.006054 | .028528 |
| 6 | 2.000000 | 1.987586 | -.012414 | 1.45632 | 1.54589 | .003410 | 2.120871 | .015145 | .320668 |
| 7 | .200000 | .205066 | -.005066 | -1.26405 | -.63087 | .003105 | 1.597822 | -.005957 | .041145 |
| 8 | .400000 | .400275 | -.000275 | -.96613 | -.03429 | .002669 | .933414 | -.000310 | .000082 |
| 9 | .800000 | .799774 | .000226 | -.35644 | .02821 | .002016 | .127053 | .000242 | .000029 |
| 10 | 1.200000 | 1.188857 | .011143 | .23735 | 1.38764 | .001948 | .056335 | .011840 | .063990 |
| 11 | 1.600000 | 1.613457 | -.013457 | .88535 | -1.67581 | .002560 | .783843 | -.014980 | .176892 |
| 12 | 2.000000 | 1.999336 | .000664 | 1.47425 | .08267 | .003439 | 2.173423 | -.000813 | .000940 |
| 13 | .200000 | .208004 | -.008004 | -1.25957 | -.99667 | .003098 | 1.586509 | -.009403 | .102076 |
| 14 | .400000 | .400809 | -.000809 | -.96532 | -.10080 | .002668 | .931840 | -.000910 | .000708 |
| 15 | .800000 | .793631 | .006369 | -.36582 | .79307 | .002022 | .133823 | .006800 | .022740 |
| 16 | 1.200000 | 1.190993 | .009007 | .24061 | 1.12160 | .001950 | .057894 | .009571 | .041879 |
| 17 | 1.600000 | 1.613457 | -.013457 | .88535 | -1.67581 | .002560 | .783843 | -.014980 | .176892 |
| 18 | 2.000000 | 2.007080 | -.007080 | 1.48607 | -.88171 | .003458 | 2.208410 | -.008692 | .108655 |
| Minimum | .200000 | .200526 | -.013457 | -1.27098 | -1.67581 | .001948 | .056335 | -.014980 | .000029 |
| Maximum | 2.000000 | 2.007080 | .012414 | 1.48607 | 1.54589 | .003458 | 2.208410 | .015145 | .320668 |
| Mean | 1.033333 | 1.033333 | .000000 | -.00000 | .00000 | .002623 | .944444 | -.000124 | .063229 |
| Median | 1.000000 | .994315 | -.000024 | -.05955 | -.00304 | .002614 | .857841 | -.000034 | .031656 |

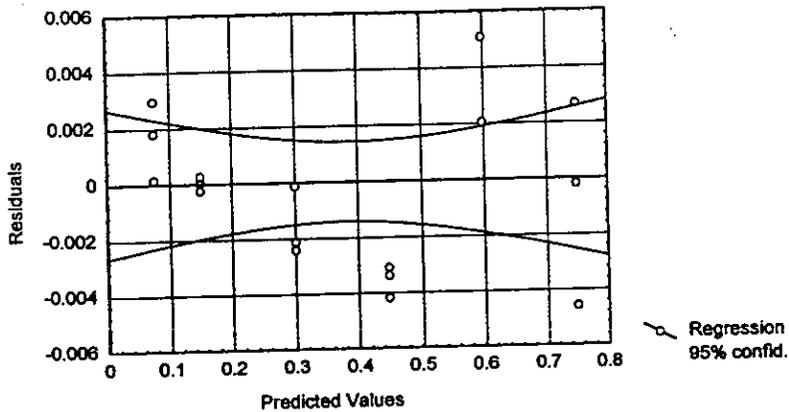
Predicted vs. Observed Values
Dependent variable: ABS



| STAT. MULTIPLE REGRESS. | | Variables currently in the Equation (maiz.sta) | | | | | |
|-------------------------|---------|--|---------------|-----------|----------|----------|---------|
| Variable | Beta in | Partial Cor. | Semipart Cor. | Tolerance | R-square | t(17) | p-level |
| CONC | .999929 | .999929 | .999929 | 1.000000 | 0.00 | 336.4353 | .000000 |

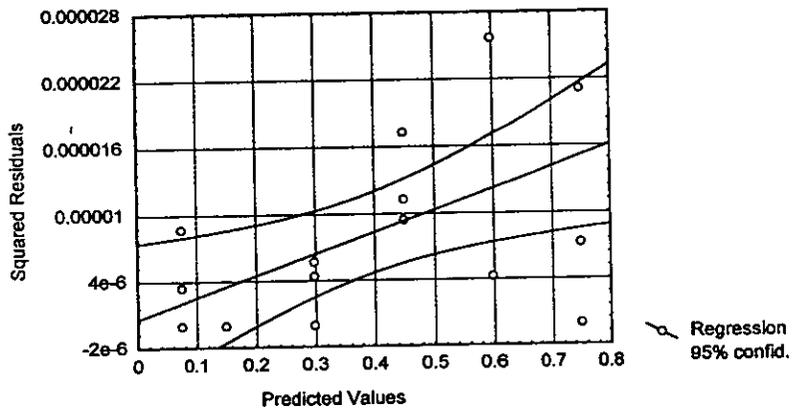
Predicted vs. Residual Scores

Dependent variable: ABS



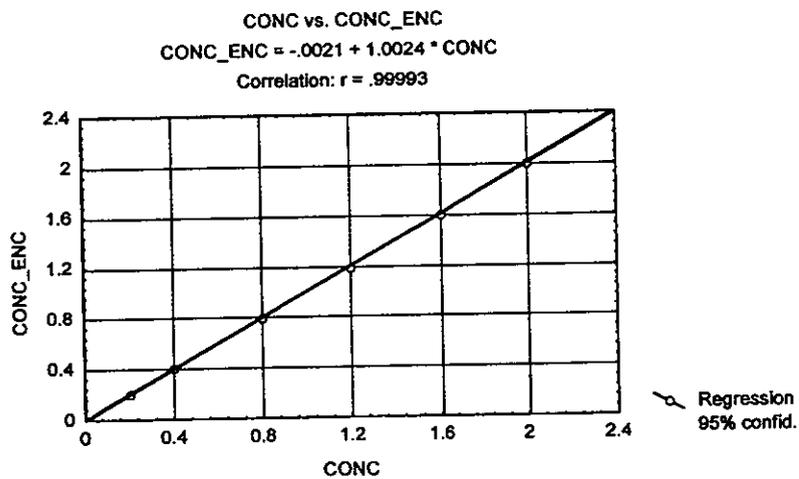
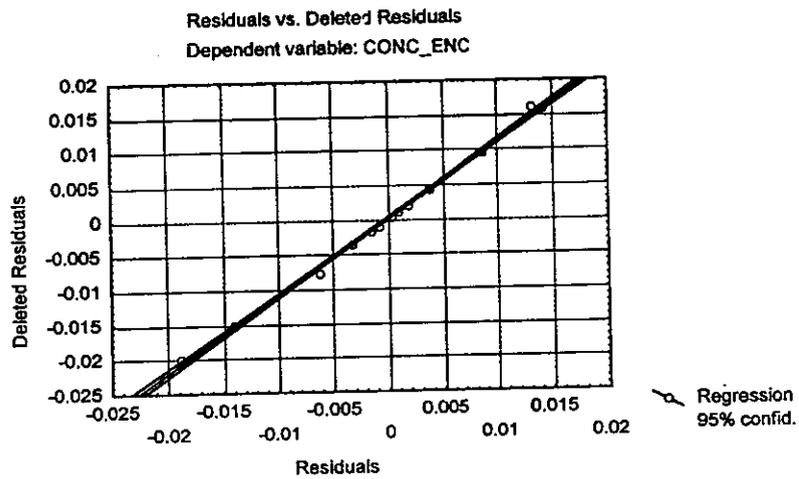
Predicted vs. Squared Residuals

Dependent variable: ABS

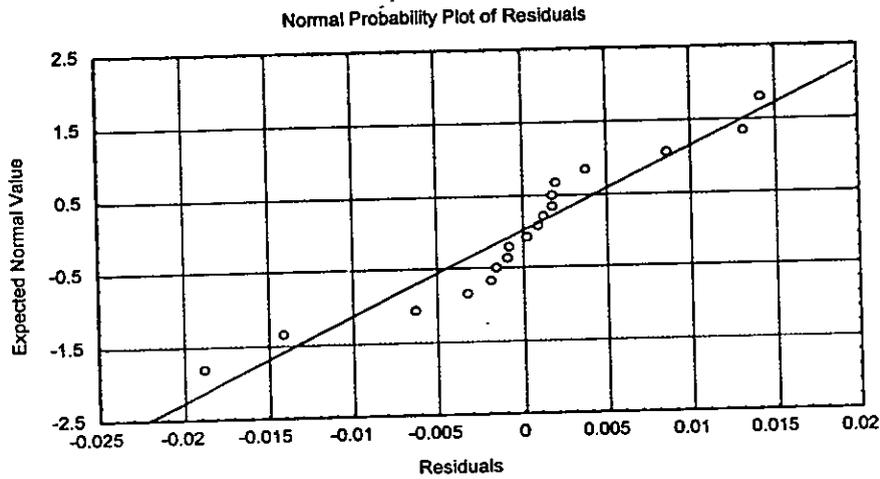


B) Linearidad del método

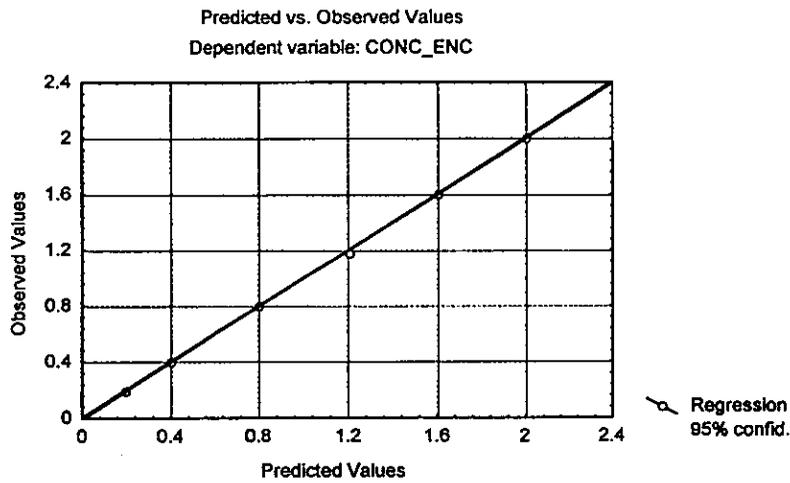
| Regression Summary for Dependent Variable: CONC_ENC (val.sta) | | | | | | |
|---|---------|------------------|----------|---------------|----------|---------|
| STAT. MULTIPLE REGRESS. R= .99992605 R ² = .99985210 Adjusted R ² = .99984285 F(1,16)=1082E2 p<.00000 Std.Error of estimate: .00824 | | | | | | |
| N=18 | BETA | St. Err. of BETA | B | St. Err. of B | t(16) | p-level |
| Intercept | .999926 | .003040 | -.002111 | .003700 | -.5707 | .576127 |
| CONC | | | 1.002442 | .003048 | 328.8799 | .000000 |



| STAT. MULTIPLE REGRESS. | Analysis of Variance (val.sta) | | | | |
|-------------------------|--------------------------------|----|-------------|----------|---------|
| Effect | Sums of Squares | df | Mean Square | F | p-level |
| Regress. | 7.335701 | 1 | 7.335701 | 108162.0 | .000000 |
| Residual | .001085 | 16 | .000068 | | |
| Total | 7.336786 | | | | |



| STAT. MULTIPLE REGRESS. | Predicted & Residual Values (met.sta) | | | | | | | | |
|-------------------------|---------------------------------------|----------------|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| | Dependent variable: ADIC | | | | | | | | |
| Case No. | Observed Value | Predictd Value | Residual | Standard Pred. v. | Standard Residual | Std.Err. Pred.Val | Mahalns. Distance | Deleted Residual | Cook's Distance |
| 1 | .200000 | .199354 | .000646 | -1.27277 | -.07864 | .003193 | 1.619949 | .000761 | .000647 |
| 2 | .400000 | .398870 | .001130 | -.96828 | .13743 | .002735 | .937569 | .001270 | .001322 |
| 3 | .800000 | .796906 | .003094 | -.36082 | .37638 | .002067 | .130192 | .003303 | .005102 |
| 4 | 1.200000 | 1.180976 | .019024 | .22532 | 2.31432 | .001989 | .050771 | .020207 | .176882 |
| 5 | 1.600000 | 1.597966 | .002034 | .86171 | .24749 | .002590 | .742543 | .002259 | .003746 |
| 6 | 2.000000 | 1.994006 | .005994 | 1.46612 | .72915 | .003507 | 2.149520 | .007327 | .072304 |
| 7 | .200000 | .203344 | -.003344 | -1.26668 | -.40679 | .003183 | 1.604484 | -.003934 | .017168 |
| 8 | .400000 | .401863 | -.001863 | -.96371 | -.22664 | .002729 | .928745 | -.002094 | .003574 |
| 9 | .800000 | .800896 | -.000896 | -.35473 | -.10905 | .002063 | .125835 | -.000957 | .000426 |
| 10 | 1.200000 | 1.197935 | .002065 | .25121 | .25126 | .002001 | .063104 | .002196 | .002114 |
| 11 | 1.600000 | 1.600958 | -.000958 | .86628 | -.11658 | .002596 | .750435 | -.001064 | .000836 |
| 12 | 2.000000 | 2.000989 | -.000989 | 1.47678 | -.12034 | .003525 | 2.180883 | -.001212 | .001998 |
| 13 | .200000 | .202346 | -.002346 | -1.26820 | -.28543 | .003185 | 1.608344 | -.002761 | .008470 |
| 14 | .400000 | .408846 | -.008846 | -.95306 | -1.07613 | .002714 | .908317 | -.009928 | .079488 |
| 15 | .800000 | .801894 | -.001894 | -.35321 | -.23041 | .002062 | .124757 | -.002021 | .001901 |
| 16 | 1.200000 | 1.185964 | .014036 | .23294 | 1.70753 | .001992 | .054259 | .014912 | .096668 |
| 17 | 1.600000 | 1.613927 | -.013927 | .88607 | -1.69421 | .002622 | .785118 | -.015504 | .180961 |
| 18 | 2.000000 | 2.012960 | -.012960 | 1.49505 | -1.57661 | .003555 | 2.235176 | -.015942 | .351726 |
| Minimum | .200000 | .199354 | -.013927 | -1.27277 | -1.69421 | .001989 | .050771 | -.015942 | .000426 |
| Maximum | 2.000000 | 2.012960 | .019024 | 1.49505 | 2.31432 | .003555 | 2.235176 | .020207 | .351726 |
| Mean | 1.033333 | 1.033333 | .000000 | -.00000 | .00000 | .002684 | .944444 | -.000177 | .055852 |
| Median | 1.000000 | .991435 | -.000927 | -.06394 | -.11281 | .002668 | .846717 | -.001011 | .004424 |



| Variables currently in the Equation (val.sta) | | | | | | | |
|---|---------|--------------|---------------|-----------|----------|----------|---------|
| Variable | Beta in | Partial Cor. | Semipart Cor. | Tolerance | R-square | t(17) | p-level |
| CONC | .999926 | .999926 | .999926 | 1.000000 | 0.00 | 328.8799 | .000000 |

