

Caracterización fitoquímica de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) y *Prosopis flexuosa* var. *depressa* (alpataco), plantas con acción farmacológica*

Ardoino, S.M.^{1, 2}; Boeris, M.A.¹; Toso, R.E.¹

Resumen: Se realizó la caracterización fitoquímica de hojas de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (Algarrobo) y *Prosopis flexuosa* var. *depressa* (alpataco). En la marcha fitoquímica se determinó la presencia de flavonoides, grupos esteroidales y triterpenos, alcaloides y aminogrupos en ambas especies vegetales. En *Prosopis flexuosa* var. *depressa* no se detectaron taninos, y si en *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*. En la detección de saponinas se observó que *Prosopis flexuosa* var. *depressa* demostró menor poder tensioactivo y mayor poder emulsificante que *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*.

Palabras clave: *Prosopis flexuosa*, Algarrobo, Alpataco, Flavonoides, Alcaloides

Phytochemical characterization from *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* and *Prosopis flexuosa* var. *depressa*, plants with pharmacological action

Abstract: It was made a phytochemical characterization of the leaves of *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* and *Prosopis flexuosa* var. *depressa*. The presence of flavonoids, triterpenes and steroidal groups, alkaloids and amino groups in both plant species was determined through the phytochemical progress. In the case of *Prosopis flexuosa* var. *depressa* the presence of tannin was negative, but in the case of *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* it was positive. Saponins regarding *Prosopis flexuosa* var. *depressa* showed lower surfactant power and more emulsifier power than *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*.

Keywords: *Prosopis flexuosa*, Algarrobo, Alpataco, Flavonoids, Alkaloids

Introducción

En la actualidad las plantas tienen aplicaciones importantes en medicina, una de ellas es ser fuente directa de agentes terapéuticos. Si bien gran parte de los medicamentos se obtiene por síntesis química la mayoría de las estructuras principales están basadas en productos naturales (Bermúdez *et al.*, 2005). Aproximadamente el 60% de los compuestos anticancerígenos y el 75% de los antimicrobianos son productos naturales o derivados de éstos (Cragg y Newman, 2005). Se han publicado trabajos de estudios sobre la actividad antimicrobiana que presentan diversos extractos vegetales utilizando distintos solventes mostrando resultados alentadores, incluso frente a cepas

* Recibido: 02/08/2013. Aceptado: 10/11/2013.

1 CIDEF. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa.

2 Email Silvia Ardoino: sardoino@speedy.com.ar

de microorganismos multirresistentes (Khan *et al.*, 2010; Salvat *et al.*, 2004; Zampini *et al.*, 2007). Si bien es difícil predecir la utilidad farmacológica de ellos, ya que no existe una alta correlatividad entre el comportamiento *in vitro* e *in vivo*, debido tal vez a la compleja composición de los extractos vegetales, se confía en encontrar compuestos bioactivos entre la gran cantidad de plantas que no se han estudiado. Debe tenerse en cuenta para considerar seriamente esta especulación que más del 35 % de los medicamentos que se utilizan en la actualidad provienen de las plantas.

En el metabolismo de las plantas hay una variedad de moléculas orgánicas que no tienen una función directa en procesos como respiración, fotosíntesis o transporte de nutrientes. Se denominan metabolitos secundarios o aleloquímicos (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009). Estos compuestos del metabolismo especial son sintetizados por las plantas como defensa ante agentes peligrosos, como patógenos o la presencia de animales herbívoros o bien para atraer insectos polinizadores. Se agrupan en tres grupos químicos principales, de acuerdo a las rutas mediante las cuales son sintetizados: compuestos nitrogenados, terpenoides y compuestos fenólicos (Brusotti *et al.*, 2013). Los metabolitos secundarios no están presentes en todas las partes del vegetal en igual concentración, ni de igual manera en todas las especies vegetales, su producción suele estar acotada a un grupo taxonómico en particular (Pérez Alonso y Jiménez, 2011). Hay además variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios, originadas por distintas reacciones químicas, lo que lleva a que aparezcan diferentes concentraciones de los mismos entre especies, entre individuos de una población y hasta entre distintos órganos de una planta (Sepúlveda Jiménez *et al.*, 2003).

Los compuestos fenólicos de acuerdo a su estructura química se pueden dividir en flavonoides y no flavonoides. En el grupo de los no flavonoides los más importantes son el ácido fenólico, los estilbenos y los lignanos. De los compuestos fenólicos estudiados, los que más atención han recibido han sido flavan-3-ols, flavonol y taninos. Los flavonoides han demostrado a través de numerosos estudios su actividad antimicrobiana contra diversos agentes: *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Campilobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces naeslundii*, *Chlamydia pneumoniae* (Daglia, 2012), *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, entre otros (Singh *et al.*, 2003). Además los compuestos fenólicos tienen acción antioxidante, la cual ha probado ser *in vitro* más potente que la de las vitaminas C y E y los carotenoides. Algunos compuestos fenólicos también han demostrado

in vitro inhibir el crecimiento de líneas celulares tumorales humanas (Dai y Mumper, 2010). Otras aplicaciones farmacéuticas son por sus efectos analgésicos, antihepatotóxicos e inmunoestimulantes (Gurib-Fakim, 2006)

Los terpenoides incluyen como compuestos de interés a los aceites esenciales, las saponinas y cardenólidos (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009). Los sesquiterpenos tales como la risitina y lubimina, presentes en *Solanum tuberosum*, el capsidiol de *Capsicum annum* y el 2,7-dihidroxicadalenol de *Gossypium hirsutum* tienen actividad antimicrobiana. (Sepúlveda Jiménez *et al.*, 2003). Algunos terpenoides tienen uso como fragancias y aromas en alimentación y cosmética y otras propiedades anticarcinogénicas y antiulcerosas (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009).

Los compuestos nitrogenados incluyen a los alcaloides y glucósidos cianogenéticos. Estudios realizados con alcaloides presentes en extractos de *Prosopis juliflora* han demostrado el efecto antimicrobiano de éstos sobre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella choleraesuis* (dos Santos *et al.*, 2013). Los alcaloides tienen aplicaciones como neurotransmisores (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009).

El género *Prosopis* pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Mimosoideae. Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas en regiones áridas y semiáridas de América, África y occidente de Asia (Álvarez y Villagra, 2009). Para *Prosopis flexuosa* se describen tres variedades: una arbórea (var. *flexuosa*), denominada vulgarmente “Algarrobo” o “Algarrobo dulce” y dos arbustivas (var. *depressa* y var. *fruticosa*). A la variedad *depressa* se le suele denominar vulgarmente “Alpataco dulce”, “Algarrobo Alpataco” o “Alpataco” (Steibel y Troiani, 1999). En la medicina popular se cita el uso de alpataco como astringente y antidisentérico y al algarrobo como diurético, anticatarral y colirio.

Para determinar los metabolitos secundarios presentes en una especie vegetal se realiza una marcha fitoquímica. Este procedimiento incluye una serie de métodos de detección de los diferentes grupos químicos de la especie vegetal a estudiar basados en extracciones con solventes y la posterior aplicación de pruebas cuantitativas para confirmar la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas (Lock de Ugaz, 2001).

\ Materiales y Métodos \

Se recolectó y secó el material vegetal correspondiente a hojas de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* y *Prosopis flexuosa* var. *depressa*. Para cada especie vegetal se realizó el mismo procedimiento: se molieron 30 g y se le añadió

etanol en cantidad suficiente como para cubrir el material vegetal. Se llevó a 65°C durante 2 horas y media y se filtró en caliente. Se descartó el marco y se trabajó con el extracto total según se detalla en la Figura N° 1.

Con las fracciones obtenidas se realizaron las siguientes determinaciones:

FRACCIÓN A

Flavonoides

Reacción de Shinoda

Tomar 0,5 ml de la Fracción A y agregar una granalla de Zn o Mg más 0,2 ml de ácido clorhídrico concentrado. Esperar la disolución de la granalla. Agregar 0,2 ml de alcohol amílico y luego 2 ml de agua destilada. Observar la aparición de coloración marrón, pardo rojiza o rosada en la fase orgánica. La aparición de una tonalidad desde rosado tenue hasta guinda indica la presencia de flavonoides.

Taninos y OH fenólicos

Reacción de Cloruro Férrico

Llevar a seco 3 ml de la Fracción A calentando a Baño María (se puede hacer directamente sin llevar a seco). El residuo seco se disuelve en 1 ml de agua destilada y se le agregan 3 gotas de FeCl_3 al 1% acuoso. La aparición de coloración varía de acuerdo a la cantidad y posición de los oxhidrilos fenólicos presentes: amarilla indica la presencia de 1 -OH, verde grisácea 2 -OH adyacentes y azul negro 3 -OH adyacentes.

Reacción con gelatina

Llevar a seco otros 3 ml de la Fracción A calentando a Baño María (se puede hacer directamente sin llevar a seco). El residuo seco se disuelve en 1 ml de agua destilada y se le agregan 10 gotas de una solución acuosa de gelatina al 2% (preparada con agua tibia) (si no precipitara agregar unas gotas de solución ácida de cloruro de sodio). La aparición de turbidez hasta precipitado abundante indica la presencia de taninos.

Lípidos

Sembrar unas gotas de la Fracción A en papel de filtro, dejar secar. Exponer a vapores de I_2 . La presencia de coloración marrón-naranja indica la presencia de lípidos.

Hidratos de carbono

Reacción con fenol

Adicionar 0,5 ml de una solución acuosa de fenol al 5% a 2 ml del extracto metanólico de cada especie de *Prosopis* seco y retomada con agua y, sobre la superficie, agregar 2,5 ml de H_2SO_4 concentrado. Observar

la coloración. La presencia de color naranja-pardo indica la presencia de azúcares.

FRACCIÓN B

Núcleos esteroidales y triterpenos

Reacción de Liebermann-Burchard

Mezclar con cuidado 1,8 ml de anhídrido acético con 0,2 ml de ácido sulfúrico concentrado en medio anhidro. Tomar 0,2 ml de la fracción B y agregar 0,2 ml del reactivo de Liebermann-Burchard. Se observará una coloración verde oscura que, al poco tiempo del agregado del reactivo, pasa a negra. La formación de colores azul-verdoso indica la presencia de grupo esteroide; la coloración rosada a púrpura evidencia grupo triterpénico.

Antraquinonas

Reacción de Borntrager directa

Agitar suavemente 3 ml de la Fracción B con 5 ml de NaOH al 5% y observar la coloración. La presencia de fase acuosa rojiza, o amarilla con fluorescencia roja indica la presencia de antraquinonas.

FRACCIÓN C

Alcaloides

Reacción de Dragendorff

Disolver 8 gramos de subnitrito de bismuto en 20 ml de HNO₃ al 30%. Volcar esta solución sobre otra que contiene 22,7 g de KI en 20 ml de agua. Dejar en reposo y separar el KNO₃ decantado, diluir a 100 ml. El reactivo así preparado se utiliza para identificar alcaloides. Para la reacción tomar 0,2 ml de la Fracción C, llevar a sequedad, retomar con 2 ml de HCl 1% y agregar 2 gotas del reactivo. La aparición de un precipitado color pardo-naranja indica la presencia de alcaloides.

Cardenólidos

Reacción de Kedde

Solución I: ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2% en metanol.

Solución II: KOH al 5,7% en agua destilada.

Ensayar sobre papel de filtro. A 1 gota de la Fracción C (llevada previamente a seco y retomada con alcohol), agregar 0,1 ml del Reactivo (preparado con volúmenes iguales de las soluciones I y II). Conviene hacer un blanco reemplazando el Reactivo de Kedde por la solución II para descartar colores producidos en medio alcalino por otras sustan-

cias. La aparición de coloración púrpura o violeta persistente indica la presencia de cardenólidos.

Estructuras esteroideas

Se procede como se describió en la Fracción B.

Leucoantocianidinas

Reacción de Rosenheim

Se llevan a seco 2 ml de la Fracción C y se retoman con ese mismo volumen de HCl al 1% en agua. Se le agrega 1 ml de HCl concentrado, se mezcla y se calienta en baño María durante 10 minutos. Se enfría, se le agrega un pequeño volumen de alcohol amílico, y se agita suavemente. Observar el color de la fase amílica. La aparición de coloración desde carmesí hasta rosa pálido indica la presencia de leucoantocianidinas.

FRACCIÓN D

Compuestos fenólicos

Reacción de Cloruro Férrico

Tomar 1 ml de la Fracción D y agregar 3 gotas de FeCl_3 al 1% acuoso. La aparición de coloración varía de acuerdo a la cantidad y posición de los oxhidrilos fenólicos presentes: amarilla indica la presencia de 1 -OH, verde grisácea 2 -OH adyacentes y azul negro 3 -OH adyacentes.

Proteínas y péptidos

Reacción de Biuret

Tomar 2 ml de la Fracción D y agregar 2 ml del reactivo de Biuret. El mismo se preparamezclando partes iguales de una solución acuosa de CuSO_4 al 0,25 % (0,25 g en 100 ml de agua caliente) y una solución acuosa de NaOH al 10%.

Si el color no se presenta inmediatamente, dejar reposar de 10 a 15 minutos. La aparición de coloración violeta-púrpura o violeta-rosada indica la presencia de péptidos y/o proteínas.

REACCIONES DIRECTAS

Saponinas

Poder afrógeno

Calentar en baño María 0,5 g de droga seca y pulverizada con 8 ml de agua destilada durante 30 minutos. Luego filtrar en caliente. Tomar 1 ml de esta solución y colocarla en un tubo de hemólisis. Tapar con el dedo y agitar fuertemente durante 15 segundos. Medir la espuma producida a los 0, a los 5 y a los 15 minutos.

Poder emulsificante

Añadir 1 mL de un solvente no miscible con agua (por ej. cloroformo) a 1 mL de la muestra a ensayar. Agitar. Proceder de igual manera en otro tubo, sustituyendo la muestra por agua. Comparar los resultados en ambos tubos.

Proteínas-aminogrupos

Reacción de Ninhidrina (sobre papel)

A 1 g de droga agregarle 50 ml de agua, calentar a ebullición durante 2 minutos. Filtrar en caliente. Concentrar a 5 ml. Sobre papel de filtro colocar 1 gota de solución y dejar secar. Agregar una gota de solución etanólica de Ninhidrina al 2%. Hacer en paralelo un blanco de reactivo, y un testigo utilizando triptófano o alanina (punta de espátula) en etanol al 50% (al que también se le agrega sobre la gota seca 1 gota del reactivo). Calentar en estufa 110-120 °C. La aparición de una mancha azul-violeta de igual, menor o mayor intensidad que el testigo (blanco) indica la presencia de proteínas y/o aminogrupos.

\ Resultados \

Los resultados se presentan en la Tabla N° 1.

Para ambas especies vegetales la reacción de Shinoda resultó positiva, se observó variación en la intensidad. La coloración rosada para el caso de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* indicaría la presencia de flavanonas, en tanto que la coloración anaranjada de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* indicaría la presencia de flavonas y flavonoles.

Ambas especies vegetales presentan hidroxilos fenólicos, y por la coloración verde grisácea se supone que sean dos adyacentes.

En cuanto a los taninos el resultado fue negativo en el caso de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* y positivo para *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*, mostrando un precipitado abundante.

En la presencia de saponinas también se apreciaron diferencias en cuanto a la magnitud de los resultados, si bien en ambos casos el mismo fue positivo. En la determinación del poder tensioactivo de las saponinas de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* la espuma permaneció estable menos tiempo que la espuma de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*. Por el contrario, *Prosopis flexuosa* var. *depressa* evidenció mucho mayor poder emulsificante que *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*.

\ Discusión y conclusiones \

Los resultados coinciden con lo descrito por diferentes autores (Sepúlveda Jiménez, 2003; Pérez Alonso y Jiménez, 2011) acerca de la variabilidad de la presencia de metabolitos secundarios en especies vegetales que si bien pertenecen a un mismo grupo taxonómico presentan diferencias en la distribución de los mismos, hallándose en diferentes concentraciones o incluso presentes en una especie y ausentes en otra.

A partir de la presencia de grupos químicos tales como flavonoides, taninos, esteroidales y triterpenos, alcaloides, saponinas y aminogrupos se puede investigar sobre los posibles efectos de extractos vegetales de estas especies. Así, la presencia de flavonoides y taninos podría crear expectativas sobre efectos antimicrobianos, antioxidantes, antitumorales y analgésicos. Los grupos esteroidales y triterpenos, y las saponinas hacen pensar en posibles efectos antimicrobianos, antiulcerosos y anticarcinogénicos. El hallazgo de alcaloides y aminogrupos también podría otorgar a estas especies vegetales efectos antimicrobianos y de uso en la farmacología de los neurotransmisores. La posibilidad de que estos efectos se presenten o no dependerá del tipo de compuesto asociado al grupo químico, su concentración y asociación con otros compuestos.

Mediante los resultados obtenidos en la marcha fitoquímica descrita se puede confirmar la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos de dos grupos OH adyacentes, lípidos, grupos esteroidales y triterpenos, alcaloides y saponinas en material vegetal correspondiente a *Prosopis flexuosa* var. *depressa* y la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos de dos grupos OH adyacentes, taninos, lípidos, grupos esteroidales y triterpenos, alcaloides y saponinas en material vegetal correspondiente a *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*.

Para investigar los efectos farmacológicos de cada uno de estos grupos deberán hacerse los bioensayos correspondientes.

\ Bibliografía \

- Álvarez, J.A.; Villagra, P.E. 2009. *Prosopis flexuosa* DC. (Fabaceae, Mimosoideae). *urtziana* 35(1):47-61.
- Ávalos García, A.; Pérez-Urria Carril, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Revisa (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
- Bermudez, A.; Oliveira-Miranda, M.A.; Velazquez, D. 2005. La Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *INCI* [online], vol. 30, n. 8 pp. 453-459. Disponible en: <http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005000800005&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0378-1844.

- Brusotti, G.; Cesari, I.; Dentamaro, A.; Caccianza, G.; Massolini, G. 2013. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.007>
- Cragg, G.M.; Newman, D.J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.* 100(1-2):72-79.
- Daglia, M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion on Biotechnology* 23:174-178.
- Dai, J.; Mumper, R.J. 2010. Plant Phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313-7352.
- dos Santos, E.; Pereira, M. L.; da Silva, C.; Souza-Neta, L.; Geris, R.; Martins, D.; Santana, A.; Barbosa, L.; Silva, H.; Freitas, G.; Figueiredo, M.; de Oliveira, F.; Batista, R. 2013. Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on in vitro ruminal digestion. *Int. J. Mol. Sci* 14:8496-8516.
- Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday, and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.* 27(1):1-93.
- Khan, R.; Zakir, M.; Afaq, S.H.; Latif, A.; Khan, A. 2010. Activity of solvent extracts of *Prosopis spicigera*, *Zingiber officinale* and *Trachyspermum ammi* against multidrug resistant bacterial and fungal strains. *J. Infect. Dev. Ctries.* 4(5):292-300.
- Lock de Ugaz, O. 2001. Análisis fotoquímico y metabolitos secundarios. En: *Manual de Fitoterapia*. Revisoras: Villar López, M.; Mesa Ramos, M.; Pimentel, O.G. Organización Panamericana de la Salud. EsSalud. Lima; Perú. ISBN 9972-785-34-3. OPS/PER/01,11. 41-43.
- Pérez-Alonso, N.; Jiménez, E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in Vitro*. *Biotechnología Vegetal* Vol. 11, No. 4: 195-211.
- Salvat, A.; Antonacci, L.; Fortunato, R.; Suarez, E.; Godoy, H. 2004. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. *Phyto-medicine.* 11(2-3):230-4.
- Sepúlveda Jiménez, G.; Porta Ducoing, H.; Rocha Sosa, M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología, A.C.* 21 (003):355-363.
- Singh, B.; Bhat, T.K.; Singh, B. 2003. Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5579-5597.
- Steibel, P.E.; Troiani, H.O. 1999. El género *Prosopis* (Leguminosae) en la Provincia de La Pampa (República Argentina). *Rev. Fac. Agronomía. UNLPam* 10(2):25-48.
- Zampini, I.; Cudmani, N.; Isla, M. 2007. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 41 (3): 385-93.

Figura N° 1: Marcha fitoquímica

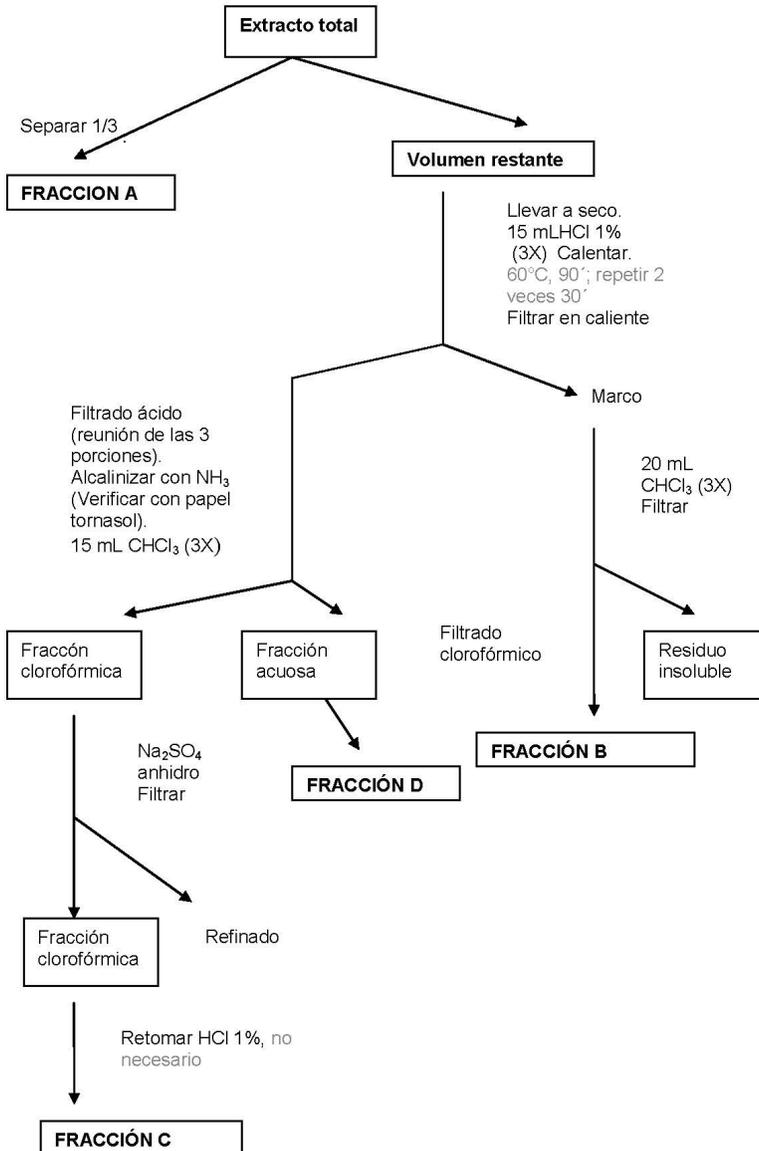


Tabla N° 1: Resultados

	<i>Prosopis flexuosa</i> var. <i>depressa</i>	<i>Prosopis flexuosa</i> var. <i>flexuosa</i>
Fracción A		
Flavonoides (Shinoda)	Positivo tonalidad rosa	Positivo tonalidad anaranjada
OH Fenólicos (Cloruro Férrico)	Positivo tonalidad verde grisácea	Positivo tonalidad verde grisácea
Taninos Reacción de la gelatina	Negativo Turbidez leve	Positivo Precipitado
Lípidos	Positivo	Positivo
Hidratos de carbono (fenol)	Positivo coloración naranja	Positivo coloración naranja
Fracción B		
Esteroidales y triterpenos (Liebermann-Burchard)	Positivo	Positivo
Antraquinonas (Borntrager)	Negativo	Negativo
Fracción C		
Alcaloides (Dragendorff)	Positivo	Positivo
Cardenólidos (Kedde)	Dudoso sin coloración persistente	Negativo
Leucoantocianidinas (Rosenheim)	Negativo	Negativo
Fracción D		
Proteínas y péptidos (Biuret)	Negativo	Negativo
Reacciones directas		
Saponinas (poder tensioactivo)	Positivo ++	Positivo +++
Saponinas (poder emulsificante)	Positivo +++	Positivo +
Proteínas- aminogrupos (nihidrina)	Positivo coloración azul oscuro	Dudoso coloración levemente superior que el blanco de reactivo