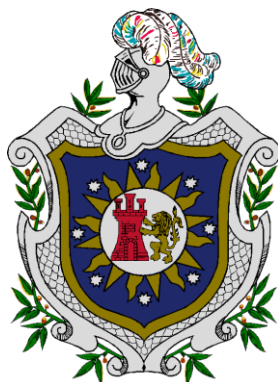


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA
RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MONOGRAFÍA PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN QUÍMICA
FARMACÉUTICA.



TÍTULO: EVALUACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DL₅₀, EN LA RAÍZ DE LA ESPECIE VEGETAL MATA DE PIEDRA (*ANTHURIUM CUBENSE*), TILGÜE, ISLA DE OMETEPE. FEBRERO – JUNIO 2015.

Autoras:

Bra. Jahoska de los Ángeles Cruz Mendoza.

Bra. Katherine Carolina Gutiérrez Latino.

Tutora:

Lic. Francisca Teresa Salazar Cabrera.

Managua, Agosto 2015.

Intenta y falla, pero nunca falles en intentarlo-Jared Leto.

Da siempre lo mejor que tienes. Lo que plantes ahora, lo cosecharás más tarde.-Og Mandino.

Dedicatoria

A Dios por regalarnos la vida, sabiduría y paciencia para alcanzar esta etapa de nuestra vida.

A nuestros padres por enseñarnos que el camino de la Vida tiene altibajos, pero que con Fe y Confianza en Dios es posible llegar hasta la meta final, a nuestros hermanos y demás familiares por alentarnos y creer en nosotras, a nuestras amigas y amigos que siempre nos han brindado su cariño y deseos de superación.

A nuestra tutora Lic. Francisca Teresa Salazar Cabrera por la disposición con la que atendió cada una de nuestras inquietudes, por guiarnos durante la realización de nuestro trabajo.

A nuestro profesor Lic. Roger Jaime Manzanares por el tiempo, los consejos y las recomendaciones brindadas y por su apoyo para hacer de esta investigación una realidad.

Jahoska de los Ángeles Cruz Mendoza y Katherine Carolina Gutiérrez Latino.

Managua, Nicaragua 3 de agosto del 2015

MSc. Rosa María González Tapia

Directora del Departamento de Química

Facultad de Ciencias e Ingenierías

UNAN – MANAGUA

Estimada Sra. González:

Por medio de la presente hago constar que las observaciones y recomendaciones realizadas al tema monográfico **“EVALUACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DL₅₀, EN LA RAÍZ DE LA ESPECIE VEGETAL MATA DE PIEDRA (*ANTHURIUM CUBENSE*), TILGÜE, ISLA DE OMETEPE. FEBRERO – JUNIO 2015”** desarrollado por las autoras Bra. Jahoska de los Ángeles Cruz Mendoza y Bra. Katherine Carolina Gutiérrez Latino, ya fueron totalmente incorporadas.

Atentamente:

Lic. Francisca Salazar

Responsable de Laboratorio

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias e Ingeniería

UNAN – Managua

RESUMEN

La Mata de piedra (*Anthurium cubense*) forma parte de las especies vegetales de uso común para la población de Tilgüe, de la Isla de Ometepe, departamento de Rivas, utilizada para el tratamiento de enfermedades, entre ellas infecciones urinarias, renales y estomacales. Sin embargo, cabe mencionar que esta planta no cuenta con estudios químicos que confirmen de forma científica de los metabolitos secundarios responsables de los efectos farmacológicos. Es por ello que resultó, importante la realización de un Tamizaje Fitoquímico, haciendo uso del protocolo de Hinojosa Dávalos et al: *Biotecnia / XV (2): 53-60 (2013)*, con el cual se pudo identificar en los extractos metanol-agua y etéreo, en la raíz de la planta los metabolitos secundarios tales como Cumarinas, Alcaloides y Esteroides por reacciones de colorimetría.

Además de la identificación de los metabolitos secundarios presentes en la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense*, fue importante conocer el grado de toxicidad que esta puede ejercer y un método bastante confiable es la determinación de la DL_{50} mediante Bioensayo en *Artemia salina*, para el estudio del *Anthurium cubense* con respecto a su toxicidad, con el cual se obtuvo que su dosis media de letalidad es de 7.94 ppm y según el CYTED (Programa iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo) se clasifica como extremadamente tóxico en referencia con la *Artemia salina*, así nuestro trabajo es un gran aporte tanto para la población de Tilgüe, como para los futuros trabajos investigativos realizados por los alumnos de la carrera de química farmacéutica y biología de la UNAN-Managua.

PALABRAS CLAVE: *Anthurium cubense*, Infecciones renales, Tamizaje fitoquímico, Dosis letal media, *Artemia salina*.

Tabla de Contenido

I. ASPECTOS GENERALES

1.1.	INTRODUCCIÓN	1
1.2.	OBJETIVOS	2
1.2.1.	Objetivo General	2
1.2.2.	Objetivos Específicos	2
1.3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.4.	JUSTIFICACIÓN.....	4
1.5.	ANTECEDENTES	5

II. MARCO TEÓRICO

2.1.	MATA DE PIEDRA (<i>Anthurium cubense</i>)	6
2.1.1.	Aspectos Generales	6
2.1.2.	Características botánicas.....	7
2.1.3.	Hábitat y distribución	7
2.1.4.	Temperatura (Anthura)	8
2.1.5.	Humedad Relativa	8
2.1.6.	Toxicidad de las Plantas	8
2.1.7.	Usos etnomédicos	8
2.1.8.	Dosis	9
2.1.9.	Parte usada como droga	9
2.2.	TAMIZAJE FITOQUÍMICO	9
2.2.1.	Metabolitos secundarios frecuentes en las plantas.....	10
2.3.	EXTRACCIÓN	15
2.4.	BIOENSAYO	16
2.4.1.	Definición	16
2.4.2.	Bioensayo de toxicidad	16
2.4.3.	Aspectos importantes del bioensayo	16
2.4.4.	Bioensayo en <i>Artemia salina</i>	17
2.5.	TOXICOLOGÍA	20

2.5.1.	Definición	20
2.5.2.	Tóxico	20
2.5.3.	Toxicidad	20
2.5.4.	Dosis tóxica.....	21
2.5.5.	Dosis efectiva (DE).....	21
2.5.6.	Dosis letal media (DL ₅₀)	21
2.5.7.	Dosis letal mínima (DL _{min})	22
2.5.8.	Dosis máxima tolerable (MTD).....	22
2.5.9.	Clasificación según el grado de toxicidad.....	22
2.6.	MÉTODO DE MILLER Y TAINTER 1944 (Turner):.....	24
2.7.	MÉTODO GRÁFICO (Castilo, 2004):.....	24
2.8.	MODELO MATEMÁTICO	25

III. HIPÓTESIS

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1.	DESCRIPCIÓN DEL ÁMBITO DE ESTUDIO.....	27
4.2.	TIPO DE ESTUDIO.....	27
4.3.	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	28
4.3.1.	Población.....	28
4.3.2.	Muestra	28
	10 gramos de raíz de la especie vegetal <i>Anthurium cubense</i>	28
4.3.3.	Criterios de Inclusión.....	28
4.3.4.	Criterios de Exclusión	28
4.4.	VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN	28
4.4.1.	Variables Independientes.....	28
4.4.2.	Variables Dependientes	29
4.5.	MATERIAL Y MÉTODO	30
4.5.1.	Fuentes de información	30
4.5.2.	Materiales para procesar datos	30
4.5.3.	Método o métodos a utilizar.....	30
4.5.3.1.	Modelo Matemático para la obtención de la Muestra	31
4.5.3.2.	Tratamiento de la muestra.....	35
4.5.3.6.	Equipos y Reactivos.....	43

V. ORGANIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

- 5.1. ANÁLISIS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO..... 45
- 5.2. DATOS OBTENIDOS DURANTE EL BIOENSAYO CON *Artemia salina*..... 47

VI. CONCLUSIONES

VII. RECOMENDACIONES

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

CAPÍTULO I

ASPECTOS GENERALES

I. ASPECTOS GENERALES

1.1. INTRODUCCIÓN

La familia Araceae (*Anthurium*) es una de las especie más estudiadas con respecto a sus propiedades ornamentales, sin embargo, aún se tiene poco conocimiento en el sentido de que hay plantas que poseen sustancias con aplicaciones que faltan por descubrir, como es el caso de *Anthurium cubense*.

Anthurium cubense comúnmente conocida como mata de piedra, es una planta epífita o terrestre, común en bosques caducifolios o en las partes más secas de los bosques siempre verdes, en las zonas Atlántica y Pacífica. Siendo más común en Cuba y Nicaragua.

Anthurium cubense crece por sí sola, en piedras y/o árboles en zonas cercanas a ríos y peñas, algunos nativos del lugar la utilizan como medio ornamental y otros la emplean como tratamiento contra infecciones urinarias, renales y estomacales. Sin embargo, sus propiedades curativas no están aún sustentadas científicamente y es probable que esta planta pueda presentar propiedades medicinales atribuidas a compuestos bioactivos que se encuentren presentes en ella.

Los compuestos bioactivos, son moléculas que tienen una actividad biológica que se traduce en beneficios para la salud. Los fenoles, alcaloides, taninos, esteroides, cumarinas y saponinas son ejemplos de estos compuestos, sin embargo, no se han identificado los componentes del extracto de *Anthurium cubense* y tampoco se conoce si esta posee actividad tóxica. Por lo tanto, los objetivos de esta investigación son, realizar un Tamizaje fitoquímico para determinar la presencia de los metabolitos secundarios antes mencionados y realizar un bioensayo en *Artemia salina*, para con los datos obtenidos calcular la DL₅₀ de la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense*.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General

Evaluar fitoquímicamente los metabolitos secundarios presentes en la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense*, mediante un tamizaje fitoquímico para posteriormente determinar su DL₅₀ mediante el bioensayo con *Artemia salina*. UNAN-Managua, Febrero - Junio 2015.

1.2.2. Objetivos Específicos

- 1.2.2.1. Elaborar los extractos metanol-agua y etéreo para la realización del tamizaje fitoquímico en la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense*.
- 1.2.2.2. Comprobar mediante tamizaje fitoquímico la presencia los metabolitos secundarios Fenoles, Cumarinas, Saponinas, Esteroides y Alcaloides, en la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense*.
- 1.2.2.3. Calcular mediante el método de Miller y Tainter la DL₅₀ de la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense*, a través de los resultados obtenidos en bioensayo en *Artemia salina*.
- 1.2.2.4. Clasificar DL₅₀ de la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense* según la escala de toxicidad planteada por el Programa iberoamericano de ciencias y tecnologías para el desarrollo CYTED.

1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Nicaragua el uso de la medicina natural, las terapias complementarias y los productos naturales son muy comunes debido a los bajos precios que esta representa, según los datos de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S) el uso de la medicina natural y terapia complementaria está siendo cada vez más aceptada en los países pobres en un 80 % y en países ricos en un 65%. En el caso de Nicaragua, se usa en un 60% como resultado de conocimientos heredados por sus antepasados de manera empírica sin ser demostrados científicamente en el caso de algunas especies vegetales como es el caso de la *Anthurium cubense*.

La *Anthurium cubense*, conocida popularmente como mata de piedra o tabacón en Nicaragua, se distribuye desde el este de Guatemala hasta Venezuela y en Cuba, es una planta muy utilizada por la población de Tilgüe, en la Isla de Ometepe para tratar infecciones urinarias, renales o estomacales.

Debido a lo antes planteado y a que el beneficio terapéutico que se le atribuye a la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense* no posee estudios que demuestren sus propiedades farmacológicas, resulta importante conocer cuáles son los principales metabolitos secundarios que posee y si existe la posibilidad de que esta ejerza una actividad toxica en *Artemia salina* para que una vez obtenidos los resultados de interés se pueda proporcionar a la población de Tilgüe, Ometepe, estudios que confirmen el potencial terapéutico de esta especie.

1.4. JUSTIFICACIÓN

Como es evidente, según la Ley de medicina natural, terapias complementarias y productos naturales, en Nicaragua la medicina tradicional es muy utilizada hoy en día por la mayoría de la población, ya que es bastante asequible y beneficiosa para la salud, sin embargo la evaluación de las plantas medicinales comúnmente utilizadas es muy compleja y el conocimiento sobre sus posibles efectos tóxicos está muy limitado, como es el caso de la *Anthurium cubense*.

Debido a que el uso etnomedicinal de la especie vegetal *Anthurium cubense* no cuenta con estudios científicos que confirmen su efecto antibiótico y margen de seguridad, es importante realizar pruebas que nos proporcionen esta información. Un método bastante confiable según Solis et al. (Planta Med, 1993, 59: 250-252) para el estudio de las plantas con respecto a su toxicidad, es la determinación de la DL₅₀ a través del Bioensayo en *Artemia salina*, el cual permitirá obtener un dato establecido de referencia para la población al momento de hacer uso de esta planta.

De igual manera según Hinojosa Dávalos et al: Biotecnia /XV (2): 53-60 (2013) el tamizaje fitoquímico es un método confiable y de bajo costo para la determinación de los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal *Anthurium cubense*.

Por lo antes mencionado se considera de suma importancia la elaboración de esta investigación, ya que mediante los resultados que se obtengan se podrá confirmar el efecto terapéutico de la raíz de *Anthurium cubense* y se podrá clasificar su grado de toxicidad según CYTED, siendo así un gran aporte tanto para la población de Tilgüe, como para los futuros trabajos investigativos realizados por los alumnos de la carrera de Química Farmacéutica y Biología de UNAN-Managua.

1.5. ANTECEDENTES

Salazar y Jaime (2009), Licenciadas en Química Farmacéutica de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN-Managua, realizaron un estudio investigativo que tenía por objetivo Evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de las especies vegetales *Cordia inermis* (Mill), *Monstera adansonii* (Schott), *Anthurium cubense* (Engl), *Ceiba pentandra* (L.) Gearth, *Cordia dentata* (Poirot), *Costus pulverulentus* (C. Presl), *Struthanthus orbicularis* (Kunth), para lo cual se utilizó el espectrofotómetro UV/Vis y los resultados evidenciaron que *Anthurium cubense*, presenta una capacidad antioxidante mínima, presentando un porcentaje de DPPH libre de 79.9133461 y un porcentaje de DPPH inhibido de 20.0866539

Pérez y López (2010) Licenciados en Biología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN-Managua, realizaron un estudio que tenía por objetivo potenciar y estimular el uso etnobotánico de la flora de la Isla de Ometepe, para lo cual llevaron a cabo análisis cualitativos y cuantitativos que les permitieron conocer las especies con propiedades etnomedicinales y el uso de las mismas en la comunidad de Tilgüe, como resultado se obtuvo que una de las especies vegetales identificada por los pobladores de la zona es *Anthurium cubense*, utilizada para el tratamiento de tracto urinario y/o estomacales, sin embargo no existe bibliografía de referencia científica que justifique el uso etnomedicinal y la actividad fitoquímica de esta planta.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

II. MARCO TEÓRICO

2.1. MATA DE PIEDRA (*Anthurium cubense*)

Figura 1. *Anthurium cubense*



Recuperado el 25 de mayo del 2014 de
[http://www.cybertruffle.org.uk/vinales/pics/
Anthurium cubense1.html](http://www.cybertruffle.org.uk/vinales/pics/Anthurium_cubense1.html)

2.1.1. Aspectos Generales

2.1.1.1. **Nombre Científico**
Anthurium cubense

2.1.1.2. **Familia**
Araceae

2.1.1.3. **Nombres comunes**
Mata de piedra
Tabacón.

2.1.1.4. Descripción Taxonómica

Filo: Magnoliophta

Clase: Liliopsida

Orden: Arales

Familia: Araceae

Sub- Familia: Pothoideae

Género: *Anthurium*

2.1.2. Características botánicas

Planta epífita y monocotiledónea; las raíces son fibrosas, cilíndricas de consistencia carnosa, no profundizan mucho en la tierra, blancas; el tallo es caulinar, monopódico simple, herbáceo cuando joven y semileñoso cuando adulto y puede llegar a crecer hasta 1.5 m.

El tallo principal produce de 3 a 8 hojas por año dependiendo de su nutrición ambiental y variedad; las hojas son grandes, aovadas, cordiformes largamente adelgazadas hacia la base o anchamente lanceoladas según especie.

Las flores están agrupadas en una inflorescencia en forma de espádice; grupos de colores amarillo, blanco, verde y rojizo con 300 florecillas diminutas, las cuales son hermafroditas con un ovario, dos carpelos y cuatro anteras.

2.1.3. Hábitat y distribución

Común en bosques caducifolios o en las partes más secas de bosques siempre verdes, en las zonas atlántica y pacífica; 0-600 m; fl. mayormente diciembre-febrero (ago), fr. abril-Agosto; se extiende desde el este de Guatemala a Panamá, Colombia y Venezuela, también en Cuba (Hernández, 2004).

En América del Sur, se extiende a lo largo de la costa caribeña desde el oeste de Venezuela a Colombia, con una colección periférica conocida desde el Río Patía en el sur de Colombia. Existen en el bosque seco tropical, partes más secas de bosque húmedo tropical y en bosque húmedo desde el nivel del mar hasta los 700 m. Es más común en Cuba y Nicaragua. (Croat)

2.1.4. Temperatura (Anthura)

La Anthurium es una planta tropical y, por lo tanto, no tolera bien las temperaturas inferiores a 15°C y las superiores a 30°C. Para lograr un crecimiento apropiado es importante mantener la temperatura entre los 19 y los 21°C.

2.1.5. Humedad Relativa

Si la humedad relativa es excesivamente baja, la fotosíntesis disminuye. Si por el contrario la humedad relativa es excesivamente alta, se incrementa el riesgo de problemas con infecciones fúngicas.

2.1.6. Toxicidad de las Plantas

Estudios realizados en la península de Yucatán confirman que existen cuatro tipos de especies de Anthurium que poseen efectos adversos en el ser humano, entre las cuales se encuentran *Anthurium aemulum*, *Anthrium crassinervisum*, *Anthrium schlechtrndalii* y *Anthurium tetragonum*, de las cuales se conoce que las hojas, tallos, sabia y fruto en el caso de *Anthurium tetragonum*, son las partes de la planta responsables de ejercer un efecto tóxico, teniendo como principales manifestaciones la aparición de comezón en la boca y mucosa, inflamación y asfixia (Flores, Canto, & Flores, 2000).

2.1.7. Usos etnomédicos

Anthurium cubense es utilizada para tratar infecciones uterinas, renales o estomacales.

2.1.8. Dosis

Según la población de Tilgüe, la dosificación empleada es tomar una cuarta de la raíz hervida en un litro de agua y tres/cuartos de miel, recomendándose el tratamiento de un vaso de la decocción en cada una de las comidas diarias durante al menos quince días.

2.1.9. Parte usada como droga

Raíces de la planta.

2.2. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de allí orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés(Sharapin, 2000).

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración, debe permitir la evaluación rápida con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados de tamizaje farmacológico.

2.2.1. Metabolitos secundarios frecuentes en las plantas

Entre los principales metabolitos secundarios encontrados frecuentemente en las plantas podemos mencionar a los terpenos, esteroides, flavonoides, cromenos, benzofuranos, cumarinas, quinonas, alcaloides entre otros (Lock).

2.2.1.1. Terpenos y Esteroides:

Pueden clasificarse como monoterpenos (C 10), sesquiterpenos (C 15), diterpenos (C 20), Triterpenos (C 30) y tetraterpenos (C 40), según el número de unidades de isopreno que los forman (Lock).

Monoterpenos:

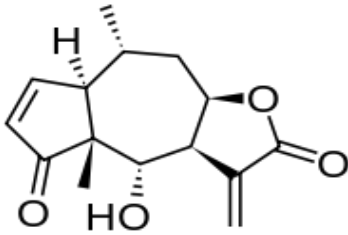
Constituyen un importante grupo de hidrocarburos, alcoholes y cetonas, que son los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales obtenidos de las hojas, raíces, corteza y flores de diversas plantas; pueden presentarse como compuestos acíclicos, monocíclicos y cíclicos (Lock).

Sesquiterpenlactonas:

Derivadas de los sesquiterpenos, son una clase de productos naturales distribuidos menos ampliamente que los monoterpenos. Son sustancias amargas que se encuentran en todas las partes de las plantas, son bastante solubles en cloroformo y en éter etílico, presentan gran importancia por la variada acción biológica que han demostrado, entre ellas acción citotóxica, antitumoral, analgésica, inhibidoras del crecimiento de bacterias entre otras.

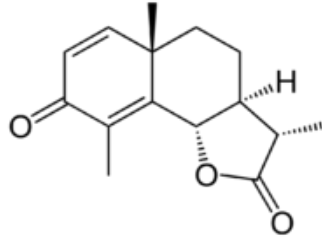
Figura 2.2.1.1.1. Esqueleto básico de sesquiterpenlactonas

**Citotóxicos y/o
antitumorales**



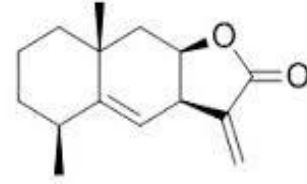
Helanina

Analgésicos



Santonina

**Inhibidor del
crecimiento**



Alantolactona

Recuperado el 2 de septiembre del 2014 de

<http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap4.pdf>

Diterpenos:

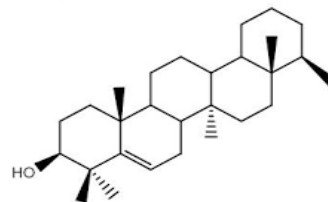
Pueden presentarse en forma de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, lactonas entre otros, se subdividen atendiendo al tipo de esqueleto carbonado en bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos. Algunos diterpenos muestran propiedades antitumorales.

2.2.1.2. Triterpenos y Esteroides

Los esteroides biogénicamente muy relacionados a los triterpenoides, pueden ser clasificados como esteroides, saponinas esteroidales, glicósidos cardiacos, esterocaloides y las llamadas hormonas esteroidales.

Las saponinas son glicósidos de ambos, Triterpenos y esteroides, dan soluciones jabonosas y algunos extractos crudos de plantas han encontrado uso como detergentes, y para la producción de espumas estables, causan hemólisis de la sangre aun en soluciones muy diluidas.

Figura 2.2.1.2.1. Esqueleto de triterpenos



Sapogenina triterpenoide

Recuperado el 2 de septiembre del 2014 de:
<http://www.bvsde.paho.org/texcom/manuales MEC/fitoterapia/cap4.pdf>

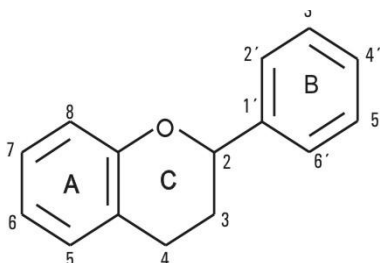
2.2.1.3. Flavonoides

Son uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de constituyentes naturales, se encuentran generalmente en mezclas como agliconas y/o glicósidos, se hallan presentes en todas las partes de las plantas, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas, flavonoles y más restringidas las isoflavonas, chalconas y auronas.

La acción farmacológica es también extensa y variada ya que son bien conocidas sus actividades como la fragilidad capilar, dilatadores de las coronarias, espasmolíticas, entre otras.

Existen 13 subclases de flavonoides con un total de más de 5 000 compuestos, 10 todos presentando un esqueleto hidrocarbonado del tipo C6-C3-C6 (difenilpropano) derivado del ácido shiquímico.

Figura 2.2.1.3.1. Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.



Recuperado el 2 de septiembre del 2014
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002003000100007

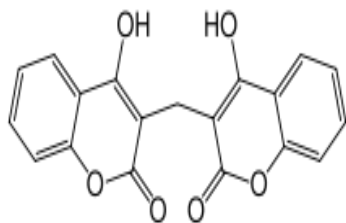
2.2.1.4. Cumarinas

Son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas, se encuentran en todas las partes de las plantas desde la raíz, flores y frutos y se presentan a menudo como mezclas en forma libre o como glicósidos.

En los últimos años se ha marcado un amplio incremento en el número de cumarinas aisladas de plantas, ello unido al interés despertado por el amplio rango de actividad biológica que muchas cumarinas han mostrado, tal es el caso de la acción anticoagulante y antibacteriana del cumarol, la acción antibiótica de la novobiocina, la aguda hepatotoxicidad de ciertas aflatoxinas entre otros.

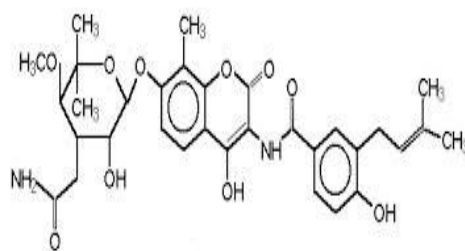
Figura 2.2.1.4.1. Estructura química de Cumarinas

Antibacterial



Dicumarol

Antibiótico



Novobiocina

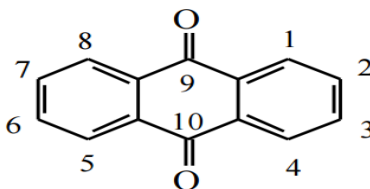
Recuperado el 2 de septiembre del 2014 de:

<http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap4.pdf>

2.2.1.5. Quinonas

Son un grupo de compuestos frecuentemente encontrados en el corazón de la madera o de la raíz y en algunos casos en las hojas, han sido reconocidas desde la antigüedad por sus propiedades tintóreas, algunos presentan además otras propiedades como la emodina que es catártica, shikonina, antimicótica entre otras.

Figura 2.2.1.5.1. Esqueleto de los Metabolitos secundarios con un núcleo dicarbonilo quinoide orto o para.

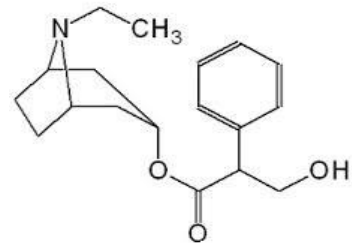


Recuperado el 2 de septiembre del 2014 de: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/quinonasp.pdf>

2.2.1.6. Alcaloides

Constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios de plantas, se encuentran en las semillas, raíces, cortezas y hojas al estado libre o como glicósidos, su función en las plantas es aun no muy conocida, aunque se reporta que algunos intervienen como reguladores del crecimiento o como repelente o atractores de insectos.

Figura 2.2.1.6.1. Alcaloides



Atropina

*Recuperado el 2 de septiembre del 2014 de:
http://www.bvsde.paho.org/texcom/manuale_sMEC/fitoterapia/cap4.pdf*

Sin embargo por años es conocida la acción fisiológica de muchos de ellos como es el caso de la acción antiespasmódica, estimulante y analgésico de la atropina, la acción sedante de la cocaína, la acción expectorante y antipirética de la emetina entre otros.

2.3. EXTRACCIÓN

La extracción es la técnica empleada para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción o para aislarlo de sus fuentes naturales. Puede definirse como la separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente (Fernández, 2012).

En la práctica es muy utilizada para separar compuestos orgánicos de las soluciones o suspensiones acuosas en las que se encuentran. El procedimiento consiste en agitarlas con un disolvente orgánico inmiscible con el agua y dejar separar ambas capas.

Los distintos solutos presentes se distribuyen entre las fase acuosa y orgánica, de acuerdo con sus solubilidades relativas. Se puede realizar desde los tres estados de la materia y se llaman de la siguiente, manera: Extracción solido–líquido, Extracción líquido–líquido y Extracción gas–líquido.

2.4. BIOENSAYO

2.4.1. Definición

Según la FAO es definido como test en los cuales un tejido vivo, organismo o grupos de organismos, se usan como reactivos para la determinación de la potencia de una sustancia activa fisiológicamente (Serrano, 2003).

Los bioensayos son realizados bajo condiciones controladas con el propósito de evaluar cualitativa y cuantitativamente el efecto que los agentes xenobióticos producen sobre organismos vivos.

2.4.2. Bioensayo de toxicidad

Los bioensayos de toxicidad permiten evaluar el grado de afectación que una sustancia química tiene en organismos vivos y éstos pueden ser agudos o crónicos.

2.4.3. Aspectos importantes del bioensayo

Para que la valoración biológica o bioensayo, proporcione resultados útiles, hay que tener en cuenta las siguientes especificaciones (Villar):

- Utilizar un número suficiente de animales, tanto para testigos patrones y experimentales, determinando el número mínimo mediante el cálculo estadístico.
- Utilizar lotes de animales homogéneos, es decir que tengan el mismo peso, edad, sexo, alimentación, higiene etc.
- Si la droga no produce muerte de los animales de experimentación, se debe recurrir al estudio cruzado.
- Debe procurarse que la curva que relacione la respuesta con la dosis, sea una línea recta con poca pendiente.
- La muestra debe prepararse a concentraciones bastante diluidas, recomendándose el incremento gradual de las concentraciones.

2.4.4. Bioensayo en *Artemia salina*

Figura 2.4.4.1. *Artemia salina*



Las *Artemias salina*, son camarones minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparente a la luz; pertenecen al *Phylum arthropoda*, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda. Se conocen comúnmente por el nombre de *Artemia*, también llamados monos de mar.

Recuperado el 14 de junio del 2014 de <http://www.mudnett.com/images/slide2.jpg>

El género *Artemia* está compuesto por varias especies, de las cuales se han identificado al menos cinco especies bisexuales y varias poblaciones partenogenéticas, entre ellas *Artemia salina* Leach, *Artemia persimilis*, *Piccinelli Prosdocimi*, *Artemia franciscana Kellogg* Leach, *Artemia persimilis*.

Estas especies se encuentran distribuidas en todo el mundo en aguas de elevada salinidad, pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35°C. Se alimentan de algas y bacterias y son fuente de alimento para peces, pájaros y varios invertebrados.

Las hembras producen huevos que, en condiciones externas favorables, eclosionan produciendo larvas de un tamaño aproximado de 1 mm. Los huevos también pueden formar quistes y permanecer en esta forma por un año o más. Las *Artemias* se convierten en adultos transcurridas 6 a 8 semanas, alcanzando un tamaño promedio de 7mm.

2.4.4.1. Aplicaciones

Las larvas de *Artemia salina*, se han utilizado por más de 40 años en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos y se ha estudiado su biología y usos potenciales en diversos campos como un método práctico y económico para la determinación de bioactividad de compuestos sintéticos y productos naturales.

El ensayo de *Artemia salina*, tiene las ventajas de ser más rápido (24 horas), barato y sencillo (no se requieren técnicas asépticas). Se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, no necesita equipamiento especial y se emplean pequeñas cantidades de muestras (2-20 mg o menos).

Este sistema de bioensayo puede ser utilizado fácilmente por farmacólogos y químicos de productos naturales; cada técnico de laboratorio conduce sus propias pruebas biológicas, y obtiene de una manera rápida y reproducible los resultados estadísticos confiables del bioensayo (Pino, 2010).

De esta manera, los compuestos bioactivos novedosos se pueden detectar y aislar rápidamente mediante un fraccionamiento biodirigido de los extractos de las plantas.

Por último, los defensores de los derechos de los animales no han objetado el uso de estos invertebrados para el trabajo experimental.

2.4.4.2. Variantes experimentales del bioensayo en *Artemia salina*

Los aspectos que deben ser considerados para desarrollar una prueba de *Artemia salina* estándar son los siguientes:

- Utilizar los estadios larvales tempranos para pruebas de toxicidad aguda.
- Los huevos tienen que eclosionar bajo condiciones estrictamente controladas de temperatura, salinidad, aireación, luz y pH.
- Las larvas tienen que ser exactamente de la misma edad al inicio de cada prueba,
- Durante la prueba, la larva no debe transformarse en otro estadio con una sensibilidad diferente.
- Las pruebas deben realizarse con quistes del mismo origen geográfico,
- Las condiciones experimentales de la prueba tienen que ser definidas con gran exactitud.
- Realizar una prueba control en paralelo con un químico de referencia.

2.5. TOXICOLOGÍA

2.5.1. Definición

Desde el punto de vista etimológico, la palabra toxicología deriva de dos palabras griegas: toxikon (veneno) y logos (tratado), que quieren decir ciencia de los venenos, no obstante, si bien los primeros momentos de su organización como ciencia fuera definida de este modo, pronto quedaba claro que esta definición, resultaba bastante incompleta puesto que el objetivo de esta ciencia se extiende a un campo mucho más amplio, abarcando también el cuadro clínico provocado por la ingestión del compuesto tóxico, en consecuencia se llega a la siguiente definición: ciencia centrada en el estudio descripción y comprensión de la interrelaciones entre la sustancia química y los organismos, así como de sus efectos sobre los seres vivos (Gutierrez, 2001).

2.5.2. Tóxico

Es toda sustancia química que, incorporada al organismo vivo a determinada concentración, produce en virtud de su estructura química y a través de mecanismos fisicoquímicos y bioquímicos, alteraciones de la fisicoquímica celular, que pueden ser transitorias o permanentes, siempre incompatible con la salud y en algunos casos con la vida (Gutierrez, 2001).

2.5.3. Toxicidad

Se denomina toxicidad a la actividad tóxica, concreta y específica, vinculada a la estructura química de una sustancia exógena al organismo por su interacción con la molécula endógena, precisamente, esta actividad biológica es la que permite juzgar acerca de la capacidad que posee una sustancia para poder actuar como nociva para un organismo vivo bajo unas determinadas condiciones (Gutierrez, 2001).

2.5.4. Dosis tóxica

Las sustancias tóxicas comienzan a portarse como tales a partir de una cierta concentración del tejido o tejido diana. Debido a las marcadas diferencias que encontramos entre los individuos de una misma especie, estas medidas han de hacerse con criterios esencialmente estadísticos (Repetto, 1997).

La primera fase en cualquier estudio de la toxicidad de una sustancia consiste en determinar si puede o no acceder al organismo desde posibles fuentes de exposición. Una vez que se ha demostrado su absorción, se calcula la biodisponibilidad por las distintas rutas de ingreso y los parámetros cinéticos fundamentales.

Para esto se determina primero la dosis que es la cantidad de sustancia administrada o absorbida por un individuo en proporción a su peso o volumen corporal, ordinariamente en 24 horas, se suele expresar en mg/ kg.

2.5.5. Dosis efectiva (DE)

Es la dosis de una sustancia que origina un efecto definido en un sistema dado; la DE-50 es la dosis que causa el 50 por 100 del efecto máximo (Repetto, 1997)

2.5.6. Dosis letal media (DL₅₀)

Se define como la dosis ingerida necesaria para producir la muerte en el 50% de los animales a los que se administrada. En este mismo sentido, la DT₅₀ o dosis toxica, es la necesaria para generar efectos tóxicos al 50 % de los animales que se aplica(Ladron, 1995).

Cabe señalar que la DL_{50} no es una medición precisa, pues se obtiene por estimación estadística, lo que da lugar a variaciones dependiendo del método empleado para calcularla.

2.5.7. Dosis letal mínima (DLmin)

La menor cantidad de sustancias que introducida en el organismo produce la muerte a algún animal de experimentación bajo un conjunto de condiciones definidas (Repetto, 1997).

2.5.8. Dosis máxima tolerable (MTD)

Cantidad máxima de una sustancia que introducida en el organismo no mata a los animales de experimentación (Repetto, 1997).

2.5.9. Clasificación según el grado de toxicidad

El rango de toxicidad puede variar enormemente en función de la vía de administración. La clasificación más extendida es la propuesta por Gosselin (Goseelin, 1981) para compuestos administrados por vía oral, pero que resulta útil para evaluar la toxicidad por todas las vías, salvo la respiratoria. La UE ha definido la toxicidad de los tóxicos no gaseosos y gaseosos, según su DL_{50} (concentración letal en atmosfera) en 4h, según se recoge en las tablas 2.5.9.1. y 2.5.9.2.

Tabla 2.5.9.1. Clasificación de Gosselin de las sustancias tóxicas.

DENOMINACIÓN	RANGO DE TOXICIDAD
Supertóxica	Menos de 5 mg/kg
Extremadamente tóxica	5-50 mg/kg
Muy tóxica	50-500 mg/kg
Moderadamente tóxica	500 mg – 5 g/kg
Débilmente tóxica	5-15 g/kg
Prácticamente atóxica	Más de 15 g/kg

Fuente: Ladron J & Moya V (1995). Toxicología Médica Clínica y Laboral. Madrid McGraw-Hill Interamerican pag 13

Tabla 2.5.9.2. Clasificación de la UE

CATEGORÍA 4 HORAS (PPM)	DL ₅₀ VÍA ORAL (MG/KG)	CL ₅₀
Extremadamente tóxica	≤ 1	≤ 50
Altamente tóxica	≤ 50	≤ 100
Moderadamente tóxica	≤ 500	≤ 150

Fuente: Ladron J & Moya V (1995). Toxicología Médica Clínica y Laboral. Madrid McGraw-Hill Interamerican pag 13

Tabla 2.5.9.3. Clasificación toxicidad según CYTED

I	Extremadamente tóxico	1-10 µg/ml
II	Altamente tóxico	10-100 µg/ml
III	Moderadamente tóxico	100-500 µg/ml
IV	Ligeramente tóxico	500-1000 µg/ml
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500 µg/ml
VI	Relativamente inocuo	> 1500 µg/ml

Recuperado el 06 de junio del 2014 de: www.revistasjdc.com

2.6. MÉTODO DE MILLER Y TAINTER 1944 (Turner):

Este método es probablemente el más generalmente útil para calcular cualquier valor de DI_{50} . Para ello se utiliza un papel especial de coordenada, el papel de logaritmo-Probit, que se grafican en el eje de las X los valores de Probit o el % corregido y en el eje de las Y sería el log de las concentraciones en ppm. El correspondiente valor de Probit para los porcentajes debe ser encontrado en una tabla de Probit.

La teoría de Probit es discutida en libros estadísticos. Esencialmente, la transformación Probit efectúa un estiramiento de los finales de la curva de sigmoidea, formada al trazar la respuesta quantal contra el logaritmo-de-dosis, de modo que la curva sigmoidea se haga una línea recta.

Para calcular el error estándar de la DI_{50} , Miller y Tainter propusieron la siguiente formula:

$$\text{Ec.1ES } DI_{50} = \frac{2s}{\sqrt{2n}}$$

Donde $2s$ vendrá dada por la diferencia entre los valores de los log dosis correspondiente a los Probit 4 y 6 y n es el número total de animales utilizados en cada grupo.

2.7. MÉTODO GRÁFICO (Castilo, 2004):

Se puede utilizar el método gráfico para estimar el DI_{50} . De forma similar, se parte de los datos obtenidos en las pruebas de toxicidad aguda, y utilizando papel logarítmico se grafican en el eje de las X las concentraciones (ppm) y en el eje de las Y el porcentaje de mortalidad.

Se colocan los puntos de los porcentajes de mortalidad observados (en escala lineal) en función de las concentraciones probadas (en escala logarítmica); se conectan los puntos obtenidos más cercanos al 50% del efecto observado, o sea, a la mayor concentración que no causa efecto tóxico y a la menor concentración que causa efecto tóxico.

A partir de la recta trazada, se obtiene el punto de corte correspondiente al 50% del efecto observado. Este valor corresponde a la DI_{50} del estímulo o agente estudiado (Hubert, 1980 y 1995; Finney, 1978).

2.8. MODELO MATEMÁTICO

Se realizará un muestreo aleatorio simple, ya que este se emplea en casos en los que se dispone de poca información previa acerca de las características de la población a medir (Mostacedo & Fredericksen, 2000).

El modelo para determinar el número de muestra según el modelo matemático es el siguiente:

$$\text{Ec.2n} = \frac{t^2 \times CV^2}{E^2 + \frac{t^2 \times CV^2}{N}}$$

Donde:

n= número de unidades muestréales.

E= error con el que se quiere obtener los valores de un determinado parámetro.

t= valor que se obtiene de las tablas de "t" de Student, generalmente se usa $t = 0.05$.

N= total de unidades muestrales en toda la población.

CV= coeficiente de variación; para obtener este valor es necesario hacer un muestreo piloto.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS

III. HIPÓTESIS

La *Anthurium cubense* es una planta utilizada para fines medicinales que posee metabolitos secundarios capaces de ejercer un efecto antibiótico en los seres humanos, los cuales pueden ser detectados a través de un tamizaje fitoquímico, cuya actividad biológica puede ser estimada a través de Bioensayo en *Artemia salina*.

CAPÍTULO IV

DISEÑO METODOLÓGICO

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. DESCRIPCIÓN DEL ÁMBITO DE ESTUDIO

El tamizaje fitoquímico fue realizado en el Pabellón 3, departamento de Química en el Laboratorio de Cromatografía, y el Bioensayo en *Artemia salina* fue llevado a cabo en el Pabellón 50, departamento de Biología en el Laboratorio 1, ambos ubicados en la Facultad de Ciencias e Ingenierías de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN-Managua, durante el periodo comprendido entre Febrero-Junio 2015.

4.2. TIPO DE ESTUDIO

El presente de estudio según Hernández es de tipo experimental, exploratorio y descriptivo. Experimental ya que se manipulan deliberadamente una o más variables independientes, para analizar las consecuencias de esa manipulación sobre una o más variables dependientes, dentro de una situación de control para el investigador. Exploratorios por que se realizan cuando el objetivo a examinar, un tema, problema de investigación son poco estudiados, o del cual se tienen muchas dudas y no se ha abordado antes. Descriptivos puesto que buscan especificar las propiedades, las características y los perfiles de personas, grupos, comunidades, procesos, objetos o cualquier otro fenómeno que se someta a un análisis. (Hernandez R. S., 2006)

4.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

4.3.1. Población

22 plantas seleccionadas aleatoriamente según el modelo matemático

4.3.2. Muestra

10 gramos de raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense*.

4.3.3. Criterios de Inclusión

- Longitud de las raíces de la especie vegetal *Anthurium cubense* que midan 10 a 15 cm.
- Raíces de la especie vegetal *Anthurium cubense* sanas, aparentemente sin presencia de manchas o se miren enfermas.

4.3.4. Criterios de Exclusión

- Longitud de las raíces de la especie vegetal *Anthurium cubense* que no midan 10 a 15 cm.
- Raíces de la especie vegetal *Anthurium cubense* que no estén sanas, que presente manchas o estén enfermas.

4.4. VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN

4.4.1. Variables Independientes

- Extractos etéreo
- Extracto metanol-agua

4.4.2. Variables Dependientes

Metabolitos secundarios

Toxicidad

4.4.3. Operacionalización de variables

Variables Independientes	Definición de variables	Indicadores	Categorías
Extracto Etéreo	Extracto de una muestra obtenida con un solvente etéreo.	Presencia de principios activos	Coloración y precipitación característica
Extracto Metanol-Agua	Extracto de una muestra obtenido de la combinación de un solvente metanolicos y un solvente acuoso	Presencia de principios activos	
Variables Dependientes	Definición de Variables	Indicadores	Categoría
Metabolitos Secundarios	Compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros	Alcaloides Esteriodes Cumarinas Saponinas Fenoles	Coloración
Toxicidad	Capacidad de una sustancia para producir un efecto nocivo sobre un organismo.	Nauplios vivos y Nauplios muertos	% de mortalidad

Elaboración propia

4.5. MATERIAL Y MÉTODO

4.5.1. Fuentes de información

- Revistas de Artículos Científicos
- Libros.

4.5.2. Materiales para procesar datos

- Sistema operativo Windows 7, versión ultimate.
- Microsoft Excel 2010
- Microsoft Word 2010
- Tablas
- Diagramas

4.5.3. Método o métodos a utilizar

- Para la realización del muestreo: Modelo Matemático.
- Para elaborar el Tamizaje Fitoquímico: Método planteado por Hinojosa Dávalos et al: Biotecnia / XV (2): 53-60 (2013).
- Para el montaje del Bioensayo: Protocolo planteado por Solis et al. (Planta Med, 1993, 59: 250 – 252).
- Para calcular el DL₅₀: Método de Miller y Tainter y el método gráfico.

4.5.3.1. Modelo Matemático para la obtención de la Muestra

Con el fin de poder obtener el número de muestra a tomar en el estudio, se necesitó hacer un estudio piloto, ya que era necesario calcular algunas variables, que desconocemos. Para esto se determinó el número total de unidades muestrales, en una área de estudio que tenía forma rectangular y que se dividió en 41 unidades o sitios de muestreo.

El área donde se realizó el muestreo fue en el sendero Peña Inculca un bosque trópico seco cubierto por una enorme cantidad de piedras volcánicas, ubicado en la comunidad de Tilgüe, municipio de Altigracia, junto a la Playa Santo Domingo. Su nombre se debe a que el lugar es incultivable, por tanta piedra lanzada por el volcán Concepción en ancestrales erupciones.

El sendero cuenta con un área específica donde tiene cultivado a la *Anthurium cubense* que seleccionaron de manera aleatoria, como planta de *Anthurium cubense* se encontraba sembrada alrededor de la oficina del sendero, el espacio que ocupa la oficina no se toma en cuenta como unidad muestral, por eso en la figura 8 hay unos cuadros color anaranjado, para diferenciarlo, con las unidades muestrales a tomar.

Figura 4.5.3.1.1. Cuadro representativo de las muestras para el estudio piloto

-----20mt-----

<u>1</u>	2	<u>3</u>	4	5	6	7	8	<u>9</u>	10
11	<u>12</u>	13				14	15	<u>16</u>	17
18	<u>19</u>	20				21	22	23	<u>24</u>
<u>25</u>	26	27				28	<u>29</u>	30	31
32	33	34	35	<u>36</u>	37	38	39	40	41

En la figura 8 se observa el cuadro representativo de la muestras que es una forma de seleccionar aleatoriamente las unidades muestrales del total de unidades en una población; en este caso se seleccionaron 10 unidades muestrales (números con negrita y subrayados). Cada número se refiere a una unidad muestral.

Después de la realización del muestreo aleatorio en la sendero se procedió a elaborar la tabla 4. Donde se describe que los unidades muestrales seleccionadas son 1, 3, 9, 12, 16, 19, 24, 25 y 29 además de los números de plantas correspondiente para cada una de estas 10 unidades muestrales que se elevaron al cuadro como lo describe el método

Tabla 4.5.3.1.1. Datos de números de las plantas para las 10 unidades muestrales seleccionadas

Unidades muestrales	Nº de plantas	Cuadrados de las plantas
1	2	4
3	1	1
9	0	0
12	1	1
16	0	0
19	2	4
24	2	4
25	1	1
29	0	0
36	1	1
	= 11	16

Posteriormente, se realizó un muestreo piloto que tuvo 10 réplicas ($n = 10$). Se supone que el número total de plantas en este muestreo es de 11. Entonces utilizando la fórmula del promedio se pudo calcular que es de:

$$\text{Ec.2} \quad \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n xi}{n} = \frac{11}{10} = 1.1$$

Luego se calculó la desviación estándar mediante la fórmula:

$$\text{Ec. 3} \quad s = \sqrt{\frac{\sum v^2 - \frac{(\sum V)^2}{n}}{n-1}}$$

Donde $V^2 =$ sumatoria de los cuadrados de las plantas (16)

$$s = \sqrt{\frac{16 - \frac{(11)^2}{10}}{10-1}} = 0.658$$

El coeficiente de variación es igual a:

$$\text{Ec.4} \quad CV = \frac{S*100}{X} = \frac{0.658*100}{1.1} = 59.84 = 60$$

El valor de error con que quiere obtener las muestras generalmente es del 20%. El valor de t en este caso tuvo 9 grados de libertad y para un intervalo de confianza de 95 % y un contraste de 2 colas.

El cálculo del número de muestras sería:

Ec.5
$$n = \frac{t^2 \times CV^2}{E^2 + \frac{t^2 \times CV^2}{N}} = \frac{2.262^2 \times 60^2}{20^2 + \frac{2.262^2 \times 60^2}{41}} = 21.68 \cong 22 \text{ plantas}$$

Una vez determinado el número de unidades muestrales se debió seleccionar las unidades restantes, en este caso, faltaría por seleccionar 12 unidades para completar el número de unidades muestrales, hay que recordar que anteriormente se ya había calculado solo 10 unidades muestrales.

Figura 4.5.3.1.2. Cuadro representativo de la muestras

-----20mt-----

<u>1</u>	2	<u>3</u>	4	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	8	<u>9</u>	10
11	<u>12</u>	13				<u>14</u>	<u>15</u>	<u>16</u>	17
18	<u>19</u>	<u>20</u>				21	<u>22</u>	<u>23</u>	<u>24</u>
<u>25</u>	26	<u>27</u>				<u>28</u>	<u>29</u>	30	31
<u>32</u>	33	<u>34</u>	<u>35</u>	<u>36</u>	37	38	<u>39</u>	40	<u>41</u>

Como resultado final nuestras unidades muestrales a tomar fueron: 1, 5, 6, 7, 9, 12, 14, 15, 16, 19, 20, 22, 24, 25, 27, 28, 29, 32, 34, 35, 36, 39, y 41.

Luego determinar las unidades muestrales, se recolectó de cada una de ellas aproximadamente 10grammos para completar los 100 grammos necesarios para realización del tamizaje fitoquímico.

4.5.3.2. Tratamiento de la muestra

Para la realización de la marcha analítica, primero se procedió con una limpieza de las raíces de la especie vegetal *Anthurium cubense*, se calculó el % de humedad, haciendo uso del horno porque generalmente es el más adecuado ya que permite un control de temperatura, de humedad ambiental y del tiempo que dura la operación, para evitar así algunas alteraciones en nuestros resultados, que pueden ser la acción de enzimas, crecimiento de bacterias u hongos y otros posibles cambios (p. ej. oxidación).

El % de humedad siguió el siguiente proceso, para iniciar se colocaron por 24 horas 11 capsulas de porcelanas, conteniendo cada una aproximadamente 10 gramos de muestra, en un horno a temperatura de 60°C. Posteriormente se pesaron cada capsula de porcelana y se anotó su peso, siguiendo el método se colocaron nuevamente en el horno esta vez por 1 hora a la misma temperatura para su posterior pesaje, esto se realizó tres veces consecutivas.

Por todo lo mencionado anteriormente se dispuso a la realización de los cálculos, se procedió a calcular el promedio de las masa de las capsulas vacías, al igual que la masa de la raíz para luego obtener el peso por diferencia y así obtener el % de humedad como se describe en la tabla 5.

Como se observa la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense* tiene un promedio de porcentaje de humedad del 91.85 % lo que indica que esta planta absorbe demasiada humedad y se debe de tener un cuidado especial al realizar el pre-tratamiento de la misma con el propósito de evitar una posible contaminación o alteración de datos.

La muestra se sometió a un proceso de pre-tratamiento el cual consistió en descontaminación, eliminando partículas ajenas a la muestra con una brocha; disminución del tamaño de la muestra, cortándolas en trozos de 1 cm de largo aproximadamente con ayuda de una pinza de acero inoxidable, secado en horno a una temperatura de 60°C durante un periodo de tiempo de 24 horas, hasta lograr peso constante, homogenización de la muestra, con ayuda de un y almacenamiento en recipientes de plástico estériles, a una temperatura de 4°C en un lugar oscuro para evitar el deterioro de la muestra.

4.5.3.3. Preparación de Reactivos y Soluciones para la realización del Tamizaje Fitoquímico.

Primero se preparó una solución de Cloruro férrico para determinación de fenoles.

Que consistió en pesar 4.1560 g de FeCl_3 en un vidrio de reloj, posteriormente se disolvió con agua destilada en un matraz de 50 ml y se aforo.

$\% \text{ m/ v} = \text{masa de soluto (g)} / \text{volumen de disolución (100 mL de disolución)} * 100$

$$\text{Ec.6} \quad \% \text{ m/ v} = \frac{4.1560 \text{ gFeCl}_3}{50 \text{ ml}} * 100 = 8.32 \% \text{ FeCl}_3$$

Se utilizó la fórmula de del porcentaje como se describe en el método de cloruro férrico para obtener un porcentaje de 8.32 % de FeCl_3 .

Segundo de realizo la Solución de Hidróxido de sodio al 0.06 g/ ml.

Se pesaron 3.0192 g de NaOH en un vidrio de reloj, se disolvió con agua destilada en un matraz de 50 ml y se aforo.

Para poder obtener la solución de NaOH al 0.06 g/ ml se realizó una regla de tres como se observa a continuación:

Por cada 0.06 g NaOH ————— hay 1 ml de agua destilada
X ————— 50 ml de agua destilada

$$\text{Ec.7} \quad X = \frac{0.06 \text{ g NaOH} * 50 \text{ ml } H_2O}{1 \text{ ml } H_2O} = 3 \text{ g de NaOH}$$

Como resultado se obtiene que para poder tener una solución de Hidróxido de sodio al 0.06 g/ ml se tiene que pesar 3 g de NaOH.

Reactivo de Dragendorff.

Se preparó mezclando 8.0010 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico al 30% con una solución de 27.247 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua destilada. Se dejó en reposo por 24 horas, se decantó y se afora a 100 ml.

Para obtener el ácido nítrico al 30 % se utilizó la siguiente formula ya que el ácido nítrico que se utilizo estaba a 65 %.

$$\begin{aligned} \text{Ec.8} \quad C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ (65\%) (V_1) &= (30\%) (100 \text{ ml}) \\ V_1 &= \frac{C_2 V_2}{C_1} = \frac{(30\%) (100 \text{ ml})}{65\%} = 46.15 \text{ ml HNO}_3 \end{aligned}$$

4.5.3.4. Tamizaje Fitoquímico: Hinojosa Dávalos et al: Biotecnia / XV (2): 53-60 (2013).

- 1- Se pesaron 10 gramos de la muestra homogenizada y se agregaron 20 ml de la mezcla agua-metanol (1:10) y 20 ml de éter de petróleo en un erlenmeyer tapado y aislado de la luz.
- 2- Se colocó la mezcla en un agitador de reversa agimatic Rev-E a 200 rpm y a una temperatura de 50°C durante una hora.
- 3- El sobrenadante se colocó en un embudo de separación para obtener dos fases; metanol-agua y la fase oleosa (etérea), para la identificación de fenoles, saponinas, alcaloides, esteroides y cumarinas (Galindo et al., 1989; García et al., 2003; Alcaráz-López, 2009; García et al., 2009; Sánchez et al., 2010).

Determinación de Fenoles: A partir del extracto metanol-agua, se realizó la prueba de identificación cualitativa para fenoles por colorimetría, para la cual se utilizó el método de cloruro férrico (FeCl_3). Se colocaron 2 ml del extracto metanol-agua en un tubo de ensayo y se añadieron de 2 a 3 gotas de cloruro férrico para su identificación, un cambio de coloración a azul oscuro indica la presencia de fenoles o taninos pirogálicos y un cambio de color a verde oscuro indica la presencia de fenoles o taninos del tipo catecol.

Prueba rápida para cumarinas: A partir del extracto metanol-agua, se realizó una dilución siguiendo la proporción 9:1 de extracto:agua. Se colocaron 2 ml de dicha solución en un tubo de vidrio con tapa, colocando una tira de papel filtro dentro del tubo, previamente empapado de una solución alcalina de NaOH (0.06g/ml). Sin tocar el extracto dentro del tubo, se tapó y se llevó a calentar en un mechero bunsen hasta desprendimiento de vapores. Las cumarinas se acumulan en el papel filtro. Después se llevó el papel filtro bajo lámpara UV. Si se observan puntos fluorescentes la muestra se considera positiva (Galindo et al., 2003; Sánchez et al., 2010).

Identificación de Saponinas: Se utilizó el ensayo de espuma. Se diluyó el extracto 9:1 tomando un 1 ml del extracto metanol-agua más 9 ml de agua destilada, colocándolo en tubo de ensayo de vidrio con tapa. Se agitó vigorosamente durante 30 segundos con la mano, se dejó reposar 15 min. Si la altura de la espuma es < 5 mm la prueba se considera negativa, 5-10 mm argumenta un contenido moderado de saponinas y una altura > 15 mm se le atribuye un alto contenido de saponinas.

Ensayo para alcaloides (Prueba de Dragendorff): Se tomaron 3 ml de la solución metanol-agua, y se colocó en una capsula de porcelana y se le añadieron 4 gotas de amoníaco, después de llevarlo a sequedad se adicionaron 3 gotas de ácido acético y una gota de agua destilada, posteriormente se colocaron 3 gotas de esta solución en un papel filtro y se cubrió con gotas del reactivo de Dragendorff. Un cambio de naranja a rojo o rosado, sugiere la presencia de alcaloides (Galindo et al., 1989; García et al., 2003).

Identificación de Esteroides: Se utilizó la prueba de Lieberman-Buchard. Se partió del extracto oleoso (etéreo). Se tomó 1 ml y se colocó en un crisol, posterior a su volatilización en campana se adicionaron 4-5 gotas de cloroformo al crisol, se mezclaron bien y se repartieron mediante goteo a 4 tubos de vidrio con tapa. Posteriormente se agregaron 2 gotas de anhídrido acético a cada tubo. Estando todos los tubos tapados para evitar la evaporación de los solventes y bajo campana, se les agregó una gota de ácido sulfúrico a solo 3 de los tubos para que uno de ellos sirviera como control negativo.

Una coloración azul o verde indica la presencia de esteroides; rojo rosado o violeta, indica la presencia de Triterpenos y amarillo pálido, indica la presencia de esteroides o Triterpenos saturados (Galindo et al., 1989; García et al., 2003).

4.5.3.5. Bioensayo en Artemia salina según el protocolo Solis et al. (Planta Med, 1993, 59: 250 – 252)

Los huevos se incuban en agua salina artificial. Después de 48 horas a 22-29°C, se colectan los nauplios de la parte iluminada de un recipiente dividido. Las muestras se preparan disolviendo 1mg/ml en agua salina artificial. Los extractos insolubles se disuelven en 50µl de DMSO, antes de añadir el agua salina.

Se realizan disoluciones seriales en microplatos de 96 pozos, en triplicados con 100 µl de la muestra. Se hacen disoluciones sucesivas obteniéndose concentraciones que van de 200 ppm a 1000 ppm. Se añade a cada pozo una suspensión de 10-15 nauplios (100µl). Los microplatos se incuban de 22-29°C por 24 horas.

Se examinan los microplatos con una lupa y se cuenta el número de nauplios muertos. Se añade metanol (50 µl) a cada pozo, después de 30 minutos. Se cuenta el número total de muertos. Se calculan los valores de DL₅₀ con el análisis de datos, utilizando Microsoft Excel u otro Software.

También existen otras vías para tratar la información cuantitativa derivada de una serie de pruebas biológicas tales como el método de Reed-Muench, este es el más conveniente. Este método asume que un animal que sobrevive a una alta dosis también sobrevive a una dosis baja y que el animal que muere a ciertas dosis bajas, también muere a dosis altas. De modo que la información de cualquier grupo puede ser adicionada a otro grupo dentro del rango de las dosis probadas.

Para la preparación del Bioensayo se siguen los siguientes pasos:

Preparación del Agua de mar:

Recolección de agua clara de mar libre de arena

El agua de mar utilizada es natural, se obtuvo del balneario de poneloya y posteriormente se procedió a filtrar.

Esterilización del Agua a 100°C por 30 minutos.

El agua de mar se transfirió a un beaker de 1000 ml, se hizo hervir por 30 minutos para esterilizarla, posteriormente se dejó enfriar.

Refrigerar hasta el momento de uso.

Preparación de la Muestra

Preparación del blanco.

600 µL de Agua de mar previamente esterilizada.

Preparación del patrón (5 H₂O.CuSO₄)

Se pesaron 0.025 g de Sulfato de Cobre II pentahidratado en un vidrio de reloj, se disolvieron en 100 ml de agua destilada.

Preparación de la Muestra

Los 10 mg raíces se coció en un Beacker de 250 ml, durante 15 minutos con agua destilada en un plato caliente. Luego se filtró, se transfirieron 2000 µL a un tubo de ensayo agregando 50 µL de Dimetilsufólxido y 1950 µL de agua de mar previamente esterilizada. Obteniendo un extracto en proporción 2:2.

Incubación

Se pesaron 2.0195 g de huevecillos de Artemia salinas y se le agrego al beaker, se burbujeó la mezcla con ayuda de un bomba de aire para acuario, durante 24 horas aproximadamente, a una temperatura de 28 a 30 °C

Montaje del ensayo de Artemia Salina

En un plato de 96 micropozos de 300 µL, se colocó 100 µL de agua de mar, excepto en la línea A.

En los pozos A₁, A₂ y A₃ se adiciono 200 µL de la solución blanco (50 µL de DMSO en 950 µL de agua de mar). En los pozos A₄, A₅ y A₆ se adiciono 200 µL de una solución patrón de CuSO₄ · 5 H₂O (259 µL /ml). En los pozos A₇, A₈ y A₉ se adiciono 200 µL de la solución de extracto (1000 µL /mg).

Usando una pipeta de 200 µL, se removi6 100 µL de la solución y se colocó en la línea B, mezclando por succiones repetidas la solución. Repitiendo este procedimiento hasta llegar al final del plato. Al finalizarlo los 100 µL de solución restante se descarta. Nota: si la concentración inicial de las muestra fue de 1000 µL /mg, la línea A tendrá una concentración de 500 µL /mg, la línea B y así sucesivamente.

Se adicionó 100 µL de la suspensión de nauplios a cada pozo con una cantidad de 25 a 36 animales.

Se incubo a temperatura ambiente durante 24hrs, luego se contaron los nauplios muertos usando una lupa y se anotó en un cuadro simulando la placa de 96 pozos. Se adiciona 50 µL de metanol a todos los pozos con la ayuda de la pipeta, se dejó reposar unos 20 minutos, procediendo al conteo de todos los pozos, el número total de nauplios.

4.5.3.6. Equipos y Reactivos

Materiales, Equipos y Reactivos utilizados en Tamizaje Fitoquímico

Materiales	Equipos	Reactivos
Cápsula de porcelana	Balanza Analítica	Metanol
Espátula	Horno	Agua destilada
Pinza de acero inoxidable	Agitador Agimatic REV-E	Éter de petróleo
Brocha		Cloruro Férrico
Tamiz N° 40	Mechero bunsen	Fenol
Beaker 100 ml	Lámpara UV-visible	Amoníaco
Probeta 10 ml		Ácido acético
Erlenmeyer 500 ml		R. Dragendorff
Tubo de Ensayo		R. Lieberman-buchard
Gradilla		Cloroformo
Matraz volumétrico 250 ml		Anhídrido acético
Matraz volumétrico 100 ml		Ácido sulfúrico
Embudo separador 250 ml		Hidróxido de sodio
Termómetro		Yoduro de potasio
Agitador de vidrio		Nitrato de bismuto penta-hidratado
Vidrio de Reloj		

Materiales, Equipos y Reactivos para el Bioensayo con *Artemia salina*

Materiales	Reactivos	Equipos
Tubo de ensayo	Dimetil-Sulfóxido (DMSO)	Balanza Analítica
Balón de 100 ml	Sulfato de cobre	Placa con 96 micropozos
Beaker 1000ml	Metanol	Plato Caliente
Espátula	Agua destilada	
Gradilla Metálica	Agua de mar	
Platos Petri	Alcohol 96 0	
Pipetas de 200 μ L	Huevecillos de Artemia salina liofilizados	

CAPÍTULO V

ORGANIZACIÓN Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS

V. ORGANIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Tabla 5.1. Resultados del tamizaje fitoquímico en la raíces de la especie vegetal *Anthurium cubense* en el extracto metanol-agua.

Metabolito	Extracto Metanólicos - Acuoso	Extracto etéreo
Fenoles	(--)	
Cumarinas	(++)	
Saponinas	(--)	
Alcaloides	(++)	
Esteroides		(++)

Los espacios en blanco significan que esos ensayos no se le realizaron al extracto.

El signo (++) significa que se obtuvo una respuesta positiva para ese metabolito en el extracto.

El signo (--) significa que se obtuvo una respuesta negativa para ese metabolito en el extracto.

5.1. ANÁLISIS DEL TAMIZAJE FITOQUIMICO

Al analizar los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico realizados en los extractos metanol – agua y etereo de las raíces *Anthurium cubense*, se comprueba la presencia de los metabolitos secundarios para los grupos Cumarinas, Alcaloides y Esteroide con una respuestas positivas mediante una reacción de colorimetría lo que justifica la alta utilidad, atribuida a dicha planta en la cura de diversas afecciones.

Se confirmó la presencia de 3 de los 5 grupos tomados en cuenta en el tamizaje fitoquímico propuesto por (Hinojosa D. , 2013) los cuales se observan en la tabla 7 con una simbología (++) indicando la presencia de estos metabolitos, que son las Cumarinas, que poseen acción anticoagulante, antibacterial, antibiótico (Hinojosa D. , 2013) los Alcaloides los cuales son muy usados en medicina para tratar problemas mentales y calmar el dolor (Hinojosa D. , 2013) .

Los Esteroides a los cuales se les han atribuido efectos analgésicos e inhibidores del crecimiento de bacterias (Hinojosa D. , 2013).

Para la prueba de fenoles realizada en el extracto metanol – agua, no presento la reacción colorimétrica que indica el protocolo es por ello que en la tabla 7 donde se observan los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico, el grupo de Fenoles aparece con la simbología (--), por lo que tiene relación con los estudios realizados anteriormente sobre la planta, que evidenciaron que *Anthurium cubense*, presenta una capacidad antioxidante mínima.

Para las Saponinas, la prueba se realizó en el extracto metanol–agua dando una respuesta negativa en el ensayo de espuma. Se conoce que tienen tres propiedades distintivas que son: sabor amargo, potentes surfactantes y producen hemólisis sobre los eritrocitos.

Es por eso que en la tabla 7 se indica para la prueba de Saponinas una simbología (-) indicando la no presencia de estos metabolitos secundarios en nuestra unidad de análisis. La mayoría de metabolitos secundarios se identificaron fundamentalmente en el extracto metanol - agua, lo que justifica por qué su uso en los procesos de extracción que se les realiza a las plantas ya que la mayoría de estos metabolitos secundarios es solubles a disolventes orgánicos específicos.

Aunque se confirmó la presencia de Cumarinas, Alcaloides y Esteroides aún se desconoce cuál de estos principio activo es al que se le atribuye, sus propiedades farmacológicas, pues para conocer esto se necesitan más estudios, para determinar cuál es el principio activo al que se le atribuye dicha actividad, y no se pueden comparar con resultados de otros estudios, ya que es primera vez que se realiza el tamizaje en la raíz de esta planta.

5.2. DATOS OBTENIDOS DURANTE EL BIOENSAYO CON *Artemia salina*.

El último de nuestros objetivos era la determinación de la DL₅₀ mediante la aplicación del bioensayo en *Artemia salina*, obteniendo los datos expuestos en la tabla 8, tabla 9 y tabla 10.

Tabla 5.2.1. Conteo de Nauplios Vivos

		Blanco			Toxico			Extracto Cocido		
	[]	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	500	1	2	5	1	1	1	0	0	0
B	250	5	4	5	1	0	3	5	4	5
C	125	3	7	4	5	2	4	6	7	7
D	62.5	5	8	5	3	9	6	7	3	8
E	31.25	6	7	6	5	8	8	4	10	9
F	15.62	8	9	5	8	11	10	9	8	13
G	7.81	8	8	7	8	10	11	10	9	11
H	3.9	12	10	9	8	11	14	11	13	11

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 5.2.1. se observa la cantidad de nauplios vivos después de 24 horas de exposición al blanco en las columnas 1,2,3, sustancia de referencia (CuSO₄.5H₂O) en las columnas 4,5,6 y muestra de la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense* en las columnas 7,8,9. Esta tabla tiene de referencia la manera del montaje del bioensayo ubicada en la placa de 96 micropozos. A una concentración de 500 ppm se observa que en las tres filas correspondientes del extracto de la especie vegetal *Anthurium cubense* la supervivencia nauplios es de 0 mientras que las filas a una concentración de 3.9 la supervivencia de nauplios fue de 12.

Tabla 5.2.2. Conteo de Nauplios Muertos

		Blanco			Tóxico			Extracto Cocido		
	[]	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	500	25	21	16	25	21	22	24	18	19
B	250	15	13	18	18	17	16	18	18	16
C	125	15	18	17	17	19	17	12	15	17
D	62.5	17	15	17	13	17	15	14	9	14
E	31.25	15	16	14	12	14	15	14	16	10
F	15.62	13	13	15	15	11	15	13	11	15
G	7.81	15	11	10	11	13	13	10	12	10
H	3.9	14	12	11	12	8	10	11	11	9

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 5.2.2. se realizó el mismo tipo de conteo, obteniendo el número de nauplios que murieron luego de los 20 minutos de exposición al metanol que se le adiciono a cada micropozo, al finalizar el bioensayo.

Tabla 5.2.3. Conteo total Nauplios después de la exposición de 24 horas

		Blanco			Toxico			Extracto Cocido		
	[]	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	500	26	23	21	26	22	23	24	18	19
B	250	20	17	23	19	17	19	23	22	21
C	125	19	25	21	22	21	21	20	22	24
D	62.5	22	23	22	16	26	21	21	12	22
E	31.25	23	23	20	17	22	23	18	26	19
F	15.62	21	22	20	23	22	25	22	18	28
G	7.81	23	19	17	19	23	24	20	21	21
H	3.9	26	22	20	20	19	24	22	23	19

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 5.2.3. se aprecia el número total que se utilizaron de nauplios para la realización de montaje del bioensayo, estos datos se obtuvieron sumando las tabla 8 y tabla 9 mostradas anteriormente.

Elaboración de tabla y gráfica:

En la tabla 5.2.4. se describe las concentraciones utilizadas en la prueba, así mismo el número de organismos afectados, el número de organismos vivos y un porcentaje de Mortalidad calculado.

Tabla 5.2.4. Resultados de las dosis letales del extracto cocido de la *Anthurium cubense* para la determinación de la DL₅₀ en *Artemia salinas* (n =21)

	Dosis ppm	Log Dosis	Total de vivos	Total de muertos	Total de Nauplios	Ac. Vivos	Ac. Muertos	% de M
A	500	2.69	0	20	20	0	111	100
B	250	2.39	5	17	22	5	91	77
C	125	2.09	7	15	22	12	74	68
D	62.5	1.79	6	12	18	18	59	67
E	31.25	1.49	8	13	21	26	47	62
F	15.62	1.19	10	13	23	36	34	56
G	7.81	0.89	10	11	21	46	21	52
H	3.9	0.59	12	10	22	58	10	45

De las tablas 5.2.1, 5.2.2, y 5.2.3. Se obtiene la tabla número 5.2.4. Con los resultados del bioensayo con *Artemia salina* después de 24 horas de exposición.

La tabla 5.2.4. presenta ocho columnas divididas en: concentración en partes por millón (ppm) que van de 500 a 3.9 ppm, el logaritmo de la dosis de 2.69 a 0.59, nauplios vivos estos datos se obtienen de la tabla 5.2.1. que son la media de las tres filas por cada sustancia de prueba, como nuestro interés eran las del extracto de la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense* tomamos solamente las filas 7, 8,9. Así a una concentración de 500 ppm se obtiene que el número de nauplios vivos sea 0 y que a una concentración de 3.9 ppm el número de nauplios vivos sea de 12.

En la siguiente columna es nauplios muertos, al igual que para nauplios vivos se toman de referencia las filas 7, 8, 9 de la tabla 9 y sacando una media entre ellas se obtiene que a una concentración de 500 ppm el número de nauplios muertos es de 20 y a una concentración de 3.9 ppm el número de nauplios muertos es de 10.

Los acumulados vivos se calcula sumando el número total de vivos de arriba hacia abajo, en cambio los acumulados muertos se calcula sumando el total de muertos de abajo hacia arriba y el porcentaje de mortalidad se obtiene dividiendo el total muertos entre total de nauplios utilizados en el bioensayo y este resultado se multiplica por 100.

A continuación, se transformó el porcentaje de 100% de animales muertos a un valor Probit conocido % corregido (Tabla 5.2.5.) utilizando el método de Finney (Tabla 5.2.6.); porque el método de Miller y Tainter plantea que para los porcentaje de muertos 0 y 100 %, tienen que corregirse, con valores de Probit, utilizando la fórmula propuesta por ellos:

Para el 0% muerto:

$$\text{Ec. 9} \qquad 100(0.25/n)$$

Para 100% muertos:

$$\text{Ec.10} \qquad 100(n-0.25/n)$$

Como en el bioensayo la cantidad de *Artemia salinas* vario para cada grupo, se calculo el promedio de *Artemia* utilizadas durante la práctica, obteniendo un valor para n= 21.

Sustituyendo los datos para el 100

$$100 * \left(\frac{21-0.25}{21} \right) = 98.80$$

En el caso del 0% no es necesario calcularlo, ya que no se obtuvo porcentaje de mortalidad de este valor y no hubo necesidad de modificarlo, eso si hay que recordar que nuestro trabajo las disoluciones llegaron hasta 3.9 ppm tiendo un porcentaje de mortalidad apenas del 45%, cifra muy alejada a un porcentaje de mortalidad del 0 lo que indica que tendríamos que diluir aún más nuestra concentración del extracto para poder conseguir ese % de mortalidad.

Tabla 5.2.5. Resultados ya corregidos

	Dosis ppm	Log Dosis	Total de vivos	Total de muertos	Total de Nauplios	Ac. Vivos	Ac. Muertos	% de M	% Corregido	Probit
A	500	2.69	0	20	20	0	111	100	98.80	7.05
B	250	2.39	5	17	22	5	91	77	77	5.74
C	125	2.09	7	15	22	12	74	68	68	5.47
D	62.5	1.79	6	12	18	18	59	67	67	5.41
E	31.25	1.49	8	13	21	26	47	62	62	5.28
F	15.62	1.19	10	13	23	36	34	56	56	5.15
G	7.81	0.89	10	11	21	46	21	52	52	5.05
H	3.9	0.59	12	10	22	58	10	45	45	4.87

*% de M es el porcentaje de Mortalidad

* Fórmula para % Corregido 0 y 100 se da en el texto.

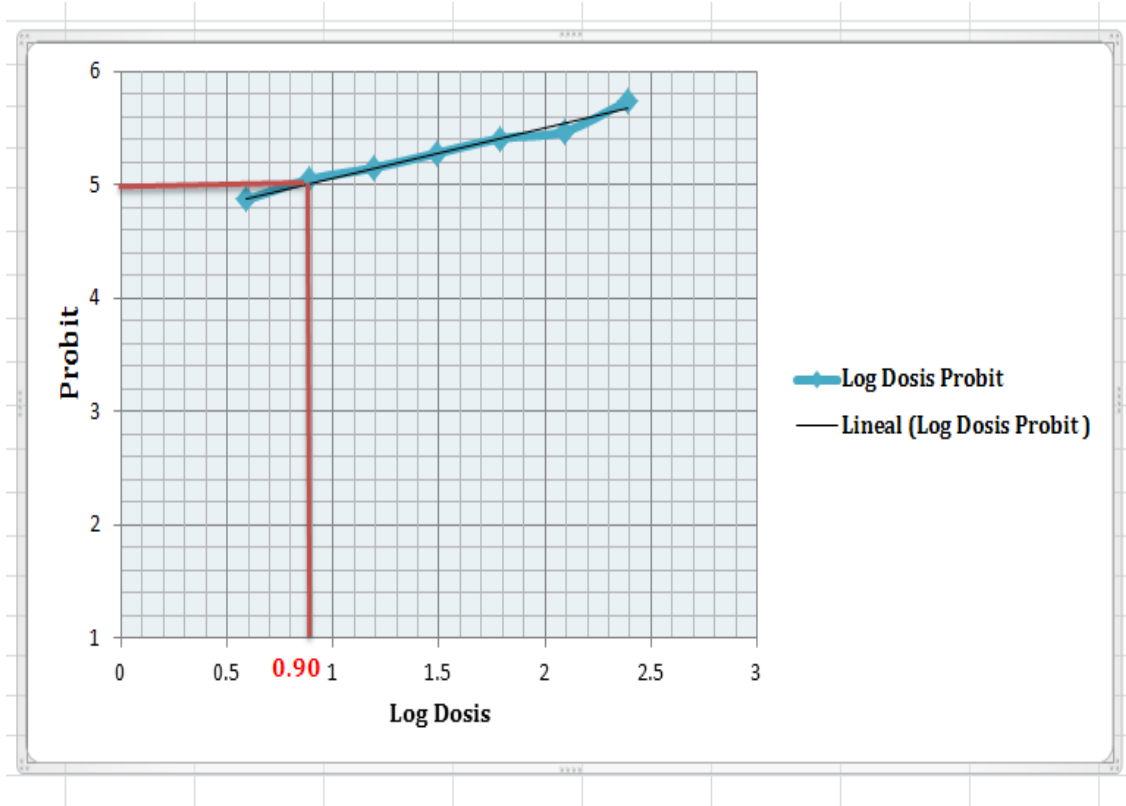
Tabla 5.2.6. Transformación de porcentajes de mortalidad a Probit

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

Fuente: Recuperado el 22 de mayo del 2015 <http://ayubmed.edu.pk/JAMC/PAST/21-3/Randhawa.pdf>

Luego de tener nuestros datos corregidos se realizó la gráfica 1. Tomando en cuenta las concentraciones consecutivas que producen un efecto observado entre 0 y 100%, pero se hace una excepción con los valores de 0 y 100. Luego se ajusta la recta a través de los puntos graficados, teniendo en cuenta principalmente el que se encuentran en el Probit 5.

Gráfica 1. Log de la Dosis vs Probits



En la grafica1. Se observa que para el Probit 5 el log de la dosis es 0.90 siendo su antilogaritmo 7.94 ppm, según la literatura, al obtener este valor, corresponderá a la DL₅₀; es decir que la dosis capaz de matar a la mitad de *Artemia* es de 7.94 ppm.

Para calcular el Error Estándar (SE) del DL₅₀ se utiliza la fórmula:

Ec.10
$$SE DL_{50} = \frac{2s}{\sqrt{2n}}$$

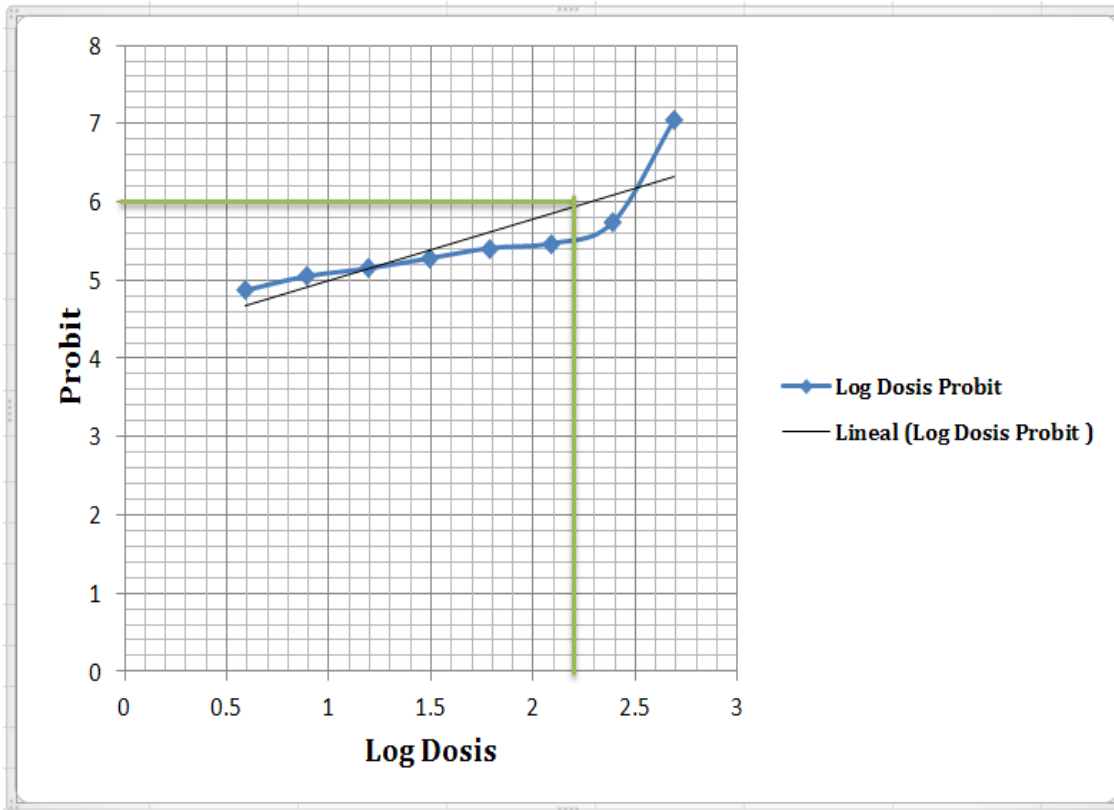
Utilizando nuestros datos en la fórmula:

$$SE DL_{50} = \frac{\log Dl_{84} - \log Dl_{16}}{\sqrt{2(21)}}$$

Donde los Probit de 84 y 16 se obtiene de la Tabla 5.2.5. que son 5,99 y 4,01 (aproximadamente 6 y 4), respectivamente.

Los valores de log- Dosis para los Probit 6 y 4 se obtienen a partir de la grafica2.

Gráfica 2. Log- Dosis para Probit 6



Como se observa el grafica nuestros los datos no llegan a Probit menor que 4, en la gráfica solo se calculó el valor de Probit 6 que es de 2.2 y su antilogaritmo es 158.48 ppm.

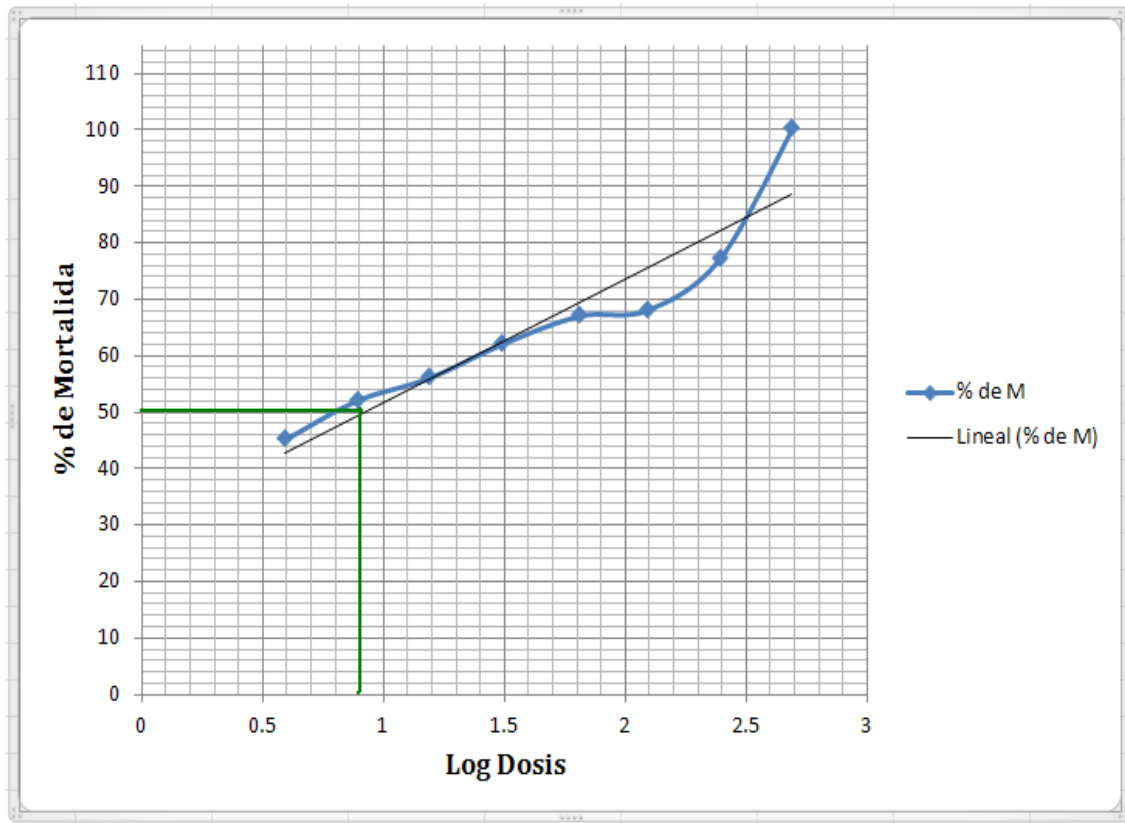
$$SE DL_{50} = \frac{158.48}{\sqrt{2(21)}} = 5.33$$

El log de la dosis correspondiente para 50% del Probit 5 es 0.90, calculado anteriormente; por lo tanto el DL₅₀ del extracto cocido de la raíces de la *Anthurium cubense* cuando se administra en *Artemia salinas* es 7.94 ± 5.33 con un intervalo confianza del 95% de 2.61 a 13.27 ppm.

Al conocer la DL₅₀ es preciso también conocer el comportamiento que existe entre la concentración de la dosis ocupada en el bioensayo en relación con la respuesta que se tuvo en los nauplios, ya que al incrementar la dosis suele aumentar la intensidad (o gravedad) del efecto, a lo que nos lleva a la elaboración de la gráfica 3, que se realizó mediante el método grafico tomando en cuenta los valores de la mortalidad y el Logaritmo de las dosis.

Conociendo la relación dosis-respuesta nos permitirá establecer experimentalmente que el extracto de la raíces cosida de la *Anthurium cubense* causa efectivamente la muerte total de los nauplios.

Grafica 3. Relación Dosis - Respuesta



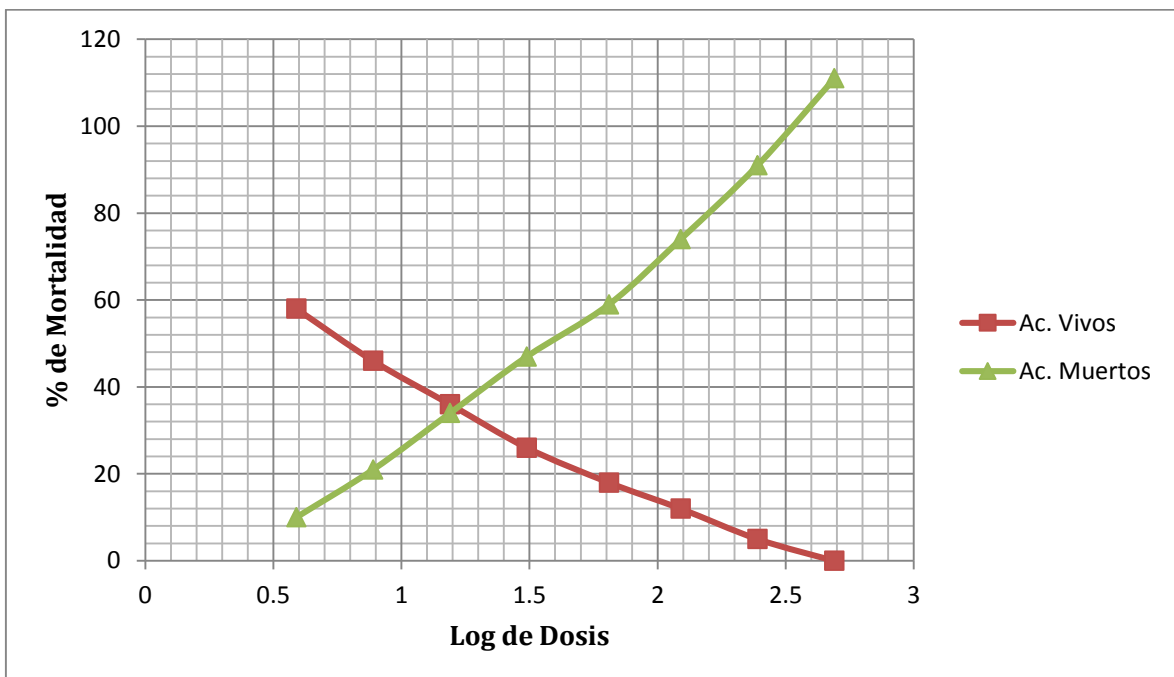
Se puede observar en la gráfica 3 como la línea se va desplazando para la derecha, lo que indica que el porcentaje de mortalidad va aumentando con respecto a la concentración, ya que se demuestra que a la dosis más alta del extracto (2.69) el porcentaje de mortalidad es 100 %.

También permite definir la menor dosis que causa un determinado efecto, siendo 3.9 las dosis más baja y es capaz de causar un porcentaje de mortalidad del 45 %. Además al trazar la línea de Probit se puede apreciar como esta cruza en 0.90 ppm, valor que nos dio al calcularlo con el método de Miller y Tainter cuyo antilogaritmo es 7.94.

En la gráfica 4. Se aprecia que los acumulados vivos van disminuyendo notablemente a medida que va incrementado la concentración del extracto; un comportamiento contrario se observa en los acumulados muertos van aumentando a medida que la concentración se incrementa, llegando al punto de superar los 100% nauplios muertos.

Esta grafica se realiza para conocer el comportamiento individual de nauplios vivos y muertos en relación a la concentración y poder comprar uno con otro.

Grafica 4. Acumulados Vivos y Muertos vs Log de la Dosis



CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- 1- Se lograron obtener los extractos metanólicos-agua y etéreo gracias al método planteado por Hinojosa Dávalos et al. Biotecnia.
- 2- A través de los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico de la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense*, se logró comprobar la presencia de metabolitos secundarios tales como Cumarinas, Alcaloides y Esteroides.
- 3- La DL_{50} de la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense*, obtenida a través de los resultados del bioensayo en *Artemia salina* es de 7.94 ppm.
- 4- Según escala de toxicidad planteada por el Programa iberoamericano de ciencias y tecnologías para el desarrollo CYTED, la DL_{50} de la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense* esta en escala de extremadamente tóxico.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

- 1- Aunque la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense* resulte poseer metabolitos secundarios comprobados en este trabajo, se recomienda el uso moderado de la misma debido a que se necesita de más estudios para poder establecer límites en la dosificación y así evitar alguna intoxicación.
- 2- Realizar pruebas analíticas más específicas y selectivas para determinar que grupos de las Cumarinas, Alcaloides y Esteroides son los encargados de ejercer el efecto farmacológico en la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense*.
- 3- Fomentar la elaboración de estudios a plantas que son utilizadas comúnmente por la población nicaragüense y que aún no se conocen sus propiedades medicinales o su grado de toxicidad.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Anthura. (09/10/07). Directrices para el cultivo de Anthurium en maceta . *IMAC*, 07.
- Antocianinas, B. d. (2013). *jugo verde*. Recuperado el enero de 08 de 2015, de <http://www.jugoverde.net/beneficios-de-las-antocianinas.html>
- botanica online*. (s.f.). Recuperado el 14 de agosto de 2014, de <http://www.botanical-online.com/medicinalestaninos.htm>
- Castilo, G. (2004). Ensayos toxicologicos y metodos de evaluacion del agua,. *Instituto Mexicano de tecnologia del Agua.*, 109.
- Croat, T. (s.f.). *The Exotic Rainforest*. Recuperado el 15 de 06 de 2014, de Anthurium <http://www.exoticrainforest.com/Anthurium%20cubense%20pc.html>
- cruz, p. (2005). *toxicologia* . madrid: m.
- Ensayos de Cultivos de virus* . (s.f.). Recuperado el 03 de 06 de 2014, de Tema 7mod:
<https://docs.google.com/presentation/d/1hd1kiT4erl0hn52mnl9oFtUVEC4G4ZQBksYgUBWzFdw/edit?pli=1#slide=id.i108>
- Fernández, G. (28 de 05 de 2012). *Extracción*. Recuperado el 18 de 06 de 2014, de Extracción: <http://www.quimicaorganica.net/extraccion.html>
- Flavonoides. (1 de agosto de 2011). *Terapia Natural*. Recuperado el 13 de noviembre de 2014, de <http://terapias-naturales-personales.blogspot.com/2011/08/flavonoides-caracteristicas-de-los.html>
- Flores, J., Canto, G., & Flores, A. (28 de septiembre de 2000). *Plantas de la flora yucatanence que provoca alguna toxicidad en el humano*. Recuperado el 24 de enero de 2015, de <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb011222.pdf>
- Galindo, W., Rosales, M., Murgueitio, E., & Larranhondo, J. (s.f.). *Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarratón*. Recuperado el 22 de enero de 2015, de <http://www.lrrd.org/lrrd1/1/mauricio.htm>
- Gonzales, S., Pino, O., Herrera, R., Valenciaga, N., Fortes, D., & Sanchez, Y. (2011). Potencialidades de los polvos de Lonchocarpus punctatus en el control de Sitophilus zeamais. *Revista Cubana de Ciencias Agricola*, 89. Obtenido de

Potencialidades de los polvos de *Lonchocarpus punctatus* en el control de *Sitophilus zeamais*.

Goseelin, R. &. (1981). *Clinical Toxicology of Commercial Products*. Baltimore: William & Wilkins.

Gutierrez, J. &. (1 de abril de 2001). *Fundamentos de ciencias toxicológicas*. Recuperado el 03 de 04 de 2014, de http://books.google.com.ni/books?id=EwQk094_IKcC&printsec=frontcover&dq=fundamentos+de+la+toxicologia&hl=es&sa=X&ei=8wZpU9roKs7MsQSz4D4Dw&ved=0CCsQ6AEwAA#v=onepage&q=fundamentos%20de%20la%20toxicologia&f=true

Hernandez, L. (16 de abril de 2004). *Reserva científica del departamento de fitotecnia*. Recuperado el 15 de 10 de 2014, de <http://ediciones.inca.edu.cu/anteriores/pdf/2004/4/CT25402.pdf>

Hernandez, R. S. (2006). *Metodología de investigación*. Iztapalapa. Mexico D. F.: McGRAWHILLIINTERAMERICMA.

Hinojosa, D. (2013). SCREENING FITOQUÍMICO Y CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA DE HOJAS DE *Tithonia tubaeformis*. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud BIOTECNIA*, 54-55.

Hinojosa, J., Gutierrez, M., Siller, F., Rodriguez, A., Morales, J., & Guerrero. (2013). Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *tithonia tubaeformis*. *biotecnia*, 53-60.

Isoflavonas. (s.f.). *Isoflavonesinfo*. Recuperado el 09 de enero de 2015, de <http://www.isoflavones.info/es/isoflavonas.php>

Ladron, J. (1995). *Toxicología Medica Clinica y Laboral*. Madrid: Mc Graw- Hill Interamericana.

Lock, O. (s.f.). *Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios*. Recuperado el 02 de septiembre de 2014, de Manual de fitoterapia : <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap4.pdf>

Lopez, J. G. (2001). *Fundamentos de Ciencias toxicológicas*. Madrid.

Medicinales, P. (2000). *Academia.edu*. Recuperado el 10 de noviembre de 2014, de http://www.academia.edu/9357285/PLANTAS_MEDICINALES

- Mostacedo, F. (2000). *Manual de metodo basico de muestreo y analisis en ecologia vegetal*. bolivia: el paris.
- Natureduca. (s.f.). *Plantas Medicinales* . Recuperado el 19 de noviembre de 2014, de http://www.natureduca.com/med_sustanc_alcaloides.php
- Nutrifacts. (08 de agosto de 2011). *todo sobre la vitaminas y mas*. Recuperado el 20 de julio de 2014, de <http://www.nutrifacts.org/esp/carotenoides/carotenoides/introduccion/>
- Pino, O. (2010). Ensayo de Artemia. *Revsita de proteccion vegetal*.
- Quercetina. (10 de Abril de 2010). *IQB*. Recuperado el 11 de noviembre de 10, de <http://www.iqb.es/monografia/fichas/ficha103.htm>
- Repetto, M. (1997). *Toxicologia Fundamental*. Madrid: Ediciones Diaz Santos.
- Serrano, R. G. (2003). *Introduccion al Analisis de datos experimentales*. Universitat Jaume.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnologia de productos fitoterapeuticos*. Santafe de Bogota: Roberto Pinzon.
- Taninos. (s.f.). *RDNATTURAL*. Recuperado el 14 de agosto de 2014, de <http://www.rdnattural.es/blog/taninos/>
- Toca, S. (s.f.). *Herbolari*. Recuperado el 11 de enero de 2015 , de porque curan las plantas : <http://www.herbolarilaneu.com/index.php/monograficos/388-monografico-7-por-que-curan-las-plantas-metabolitos-secundarios>
- Turner, R. (1965). Screening Methods in Pharmacology. En R. Turner, *Screening Methods in Pharmacology* (págs. 61-62). Nueva York and London: Academia Press Inc.
- Valle, C. (s.f.). *METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS*. Recuperado el 11 de enero de 2015, de Psicostasia: http://www.psicostasia.com/nueva/psicostasia/?page_id=13
- Vasconcellos, D. (s.f.). *Alimentos Funcionales. Conceptos y Beneficios Para la Salud*. Recuperado el 10 de noviembre de 2014, de http://www.madrimasd.org/cienciaysociedad/ateneo/dossier/alimentos_funcionales/worldfoodscience/alimentosfuncionales.htm

Villar, A. M. (s.f.). *Manual de Fitoterapia*:. Recuperado el 05 de mayo de 2014, de Farmacología de la Plantas Medicinales:
<http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap5.pdf>

ANEXOS

ANEXOS

LUGAR DE MUESTREO



FORMA DE UBICACIÓN DE LAS PLANTAS





COSTADO IZQUIERDO DEL LUGAR DE MUESTREO



COSTADO DERECHO DEL LUGAR DEMUESTREO



LIMPIEZA DE LA MUESTRA



REDUCCIÓN DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA



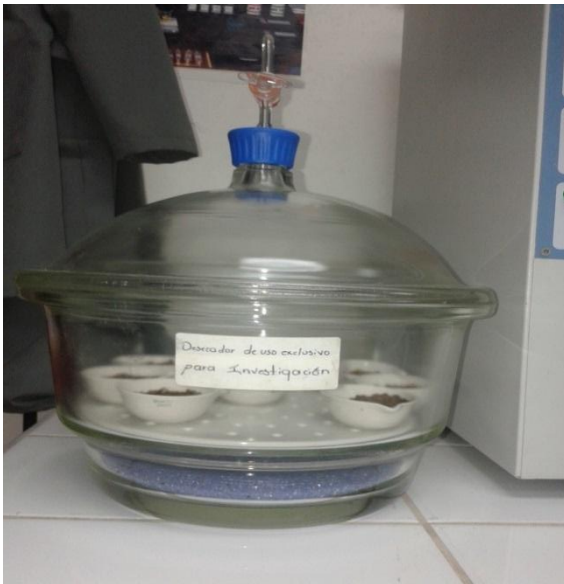
ALMACENAMIENTO E LA MUESTRA



SECADO DE LA MUESTRA



ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA SECA

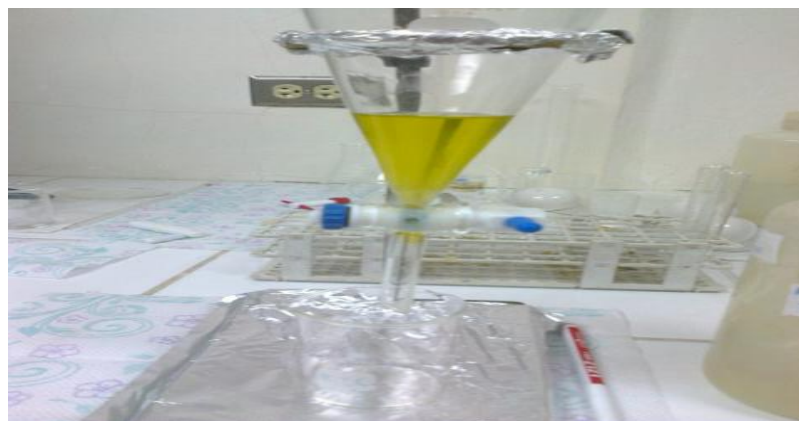


ELABORACION DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

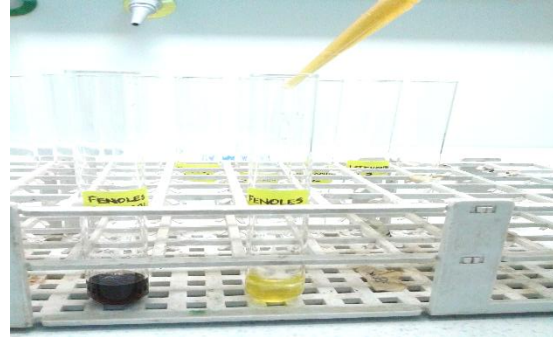


OBTENCION DE LOS EXTRACTOS

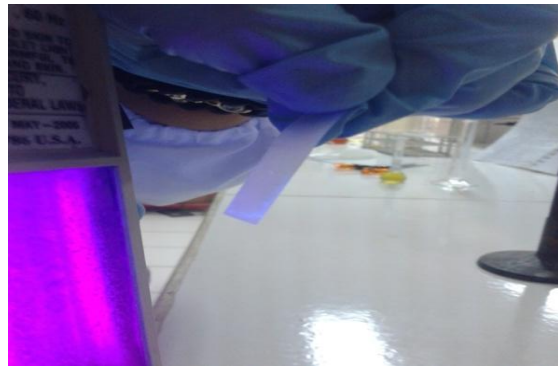
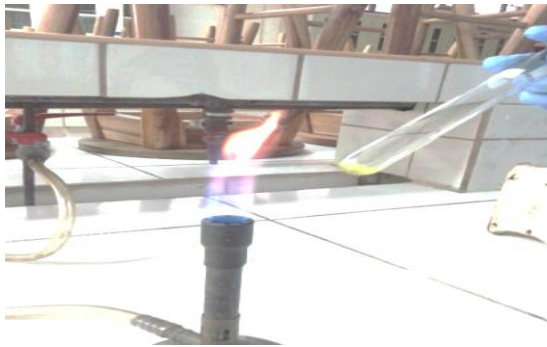


DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

DETERMINACIÓN DE FENOLES (- -)



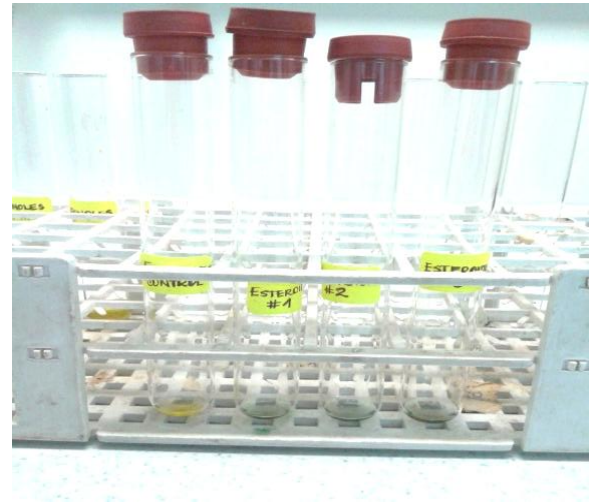
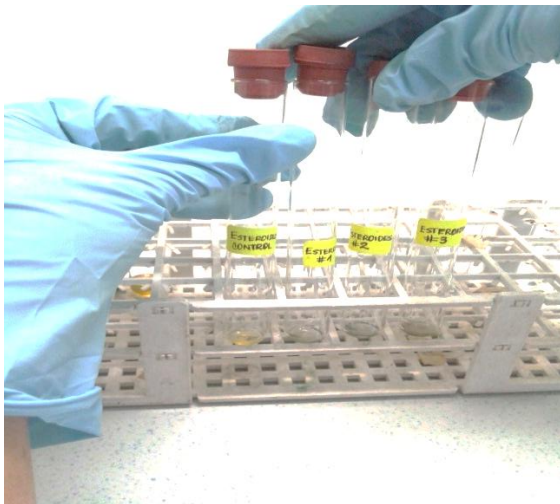
DETERMINACIÓN DE CUMARINAS (+ +)



DETERMINACIÓN DE SAPONINAS (- -)



DETERMINACIÓN DE ESTEROIDES (+ +)



DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES (+ +)



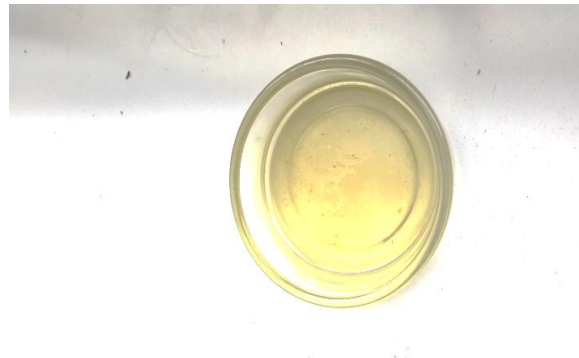
ESTERILIZACIÓN DEL AGUA DE MAR



SULFATO PENTAHIDRATADO



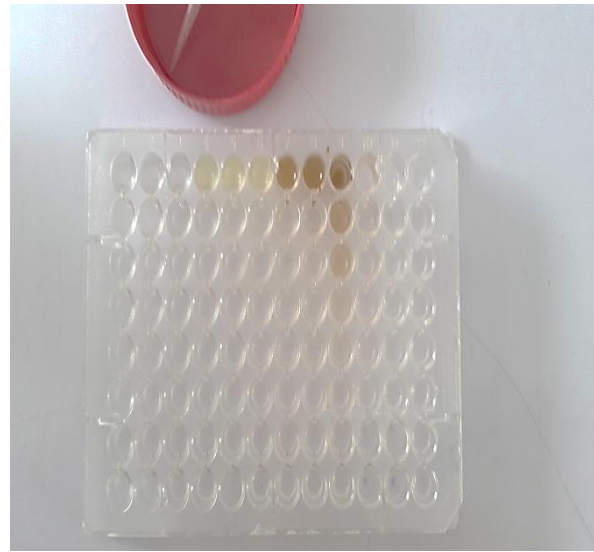
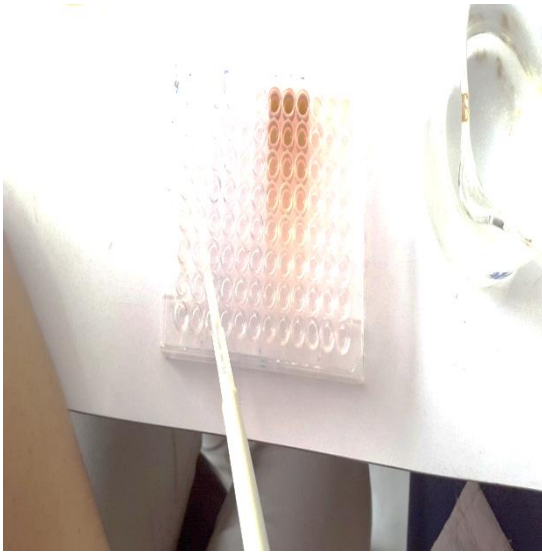
EXTRACTO DE LA RAÍCES



INCUBACIÓN DE ARETEMI SALINA



DILUCIONES



CÁLCULOS

Determinar el contenido de humedad a partir de la pérdida de peso de la muestra.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} * 100$$

Donde:

P₁ = peso inicial de la muestra en g

P₂ = peso final de la muestra en g

Para la realización de los cálculos se procedió a sacar el promedio de las masa de las capsulas vacías, al igual que la masa de la raíz para luego restarlas y así obtener el peso de la muestra final.

1) P₁ = 10.0263 g
P₂ = 1.1338 g

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0203 - 1.1338}{10.0203} * 100 = 88.69$$

2) P₁ = 10.1091 g
P₂ = 1.0919 g

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.1091 - 1.0919}{10.1091} * 100 = 89.19$$

3) P₁ = 10.0492 g
P₂ = 1.0461 g

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0492 - 1.0461}{10.0492} * 100 = 89.59$$

4) $P_1 = 10.0844 \text{ g}$
 $P_2 = 1.1022 \text{ g}$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0844 - 1.1022}{10.0844} * 100 = 89.07$$

5) $P_1 = 10.0200 \text{ g}$
 $P_2 = 1.1639 \text{ g}$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0200 - 1.1639}{10.0200} * 100 = 88.38$$

6) $P_1 = 10.0814 \text{ g}$
 $P_2 = 1.0725 \text{ g}$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0814 - 1.0725}{10.0814} * 100 = 89.36$$

7) $P_1 = 10.0830 \text{ g}$
 $P_2 = 1.0515 \text{ g}$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0830 - 1.0515}{10.0830} * 100 = 89.57$$

8) $P_1 = 10.0343 \text{ g}$
 $P_2 = 1.0960 \text{ g}$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0343 - 1.0960}{10.0343} * 100 = 89.07$$

9) $P_1 = 10.0026 \text{ g}$
 $P_2 = 1.0340 \text{ g}$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0026 - 1.0340}{10.0026} * 100 = 89.66$$

$$10) P_1 = 10.0689\text{g}$$

$$P_2 = 1.1452\text{g}$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0689 - 1.1452}{10.0689} * 100 = 88.62$$

$$11) P_1 = 10.0695\text{g}$$

$$P_2 = 1.0294\text{g}$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0695 - 1.0294}{10.0695} * 100 = 89.77$$

$$12) P_1 = 10.0754\text{g}$$

$$P_2 = 1.0597\text{g}$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0754 - 1.0597}{10.0754} * 100 = 89.48$$

$$13) P_1 = 10.0607\text{g}$$

$$P_2 = 1.0357\text{g}$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0607 - 1.0357}{10.0607} * 100 = 89.70$$

$$14) P_1 = 10.1002\text{g}$$

$$P_2 = 1.1244\text{g}$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.1002 - 1.1244}{10.1002} * 100 = 88.86$$

$$P_1 = 10.0602\text{g}$$

$$P_2 = 1.0859\text{g}$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0602 - 1.0859}{10.0602} * 100 = 89.20$$

$$15) P_1 = 10.0715\text{g}$$

$$P_2 = 1.1122\text{g}$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0715 - 1.1122}{10.0715} * 100 = 88.95$$

$$16) P_1 = 10.1102\text{g}$$

$$P_2 = 1.0945\text{g}$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.1102 - 1.0945}{10.1102} * 100 = 89.17$$

$$17) P_1 = 10.1011\text{g}$$

$$P_2 = 1.1311\text{g}$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.1011 - 1.1311}{10.1011} * 100 = 88.80$$

$$18) P_1 = 10.0508\text{g}$$

$$P_2 = 1.1138\text{g}$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0508 - 1.1138}{10.0508} * 100 = 88.91$$

$$19)P_1 = 10.0389g$$

$$P_2 = 1.0623g$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0389 - 1.0623}{10.0389} * 100 = 89.41$$

$$20)P_1 = 10.1038g$$

$$P_2 = 1.0962g$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.1038 - 1.0962}{10.1038} * 100 = 89.15$$

$$21)P_1 = 10.0678g$$

$$P_2 = 1.0948g$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.0678 - 1.0948}{10.0678} * 100 = 89.12$$

$$22)P_1 = 10.1732g$$

$$P_2 = 1.0994g$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.1732 - 1.0994}{10.1732} * 100 = 89.19$$

$$23)P_1 = 10.1193g$$

$$P_2 = 1.0938g$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.1193 - 1.0938}{10.1193} * 100 = 89.19$$

$$24)P_1 = 10.1129g$$

$$P_2 = 1.0969g$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.1129 - 1.0969}{10.1129} * 100 = 89.15$$

25) $P_1 = 10.2341\text{g}$

$P_2 = 1.1093\text{g}$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.2341 - 1.1093}{10.2341} * 100 = 89.16$$

26) $P_1 = 10.2599\text{g}$

$P_2 = 1.0998\text{g}$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.2599 - 1.0998}{10.2599} * 100 = 89.28$$

27) $P_1 = 10.2457\text{g}$

$P_2 = 1.1068\text{g}$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.2457 - 1.1068}{10.2457} * 100 = 89.19$$

28) $P_1 = 10.3590\text{g}$

$P_2 = 1.0818\text{g}$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.3590 - 1.0818}{10.3590} * 100 = 89.55$$

29) $P_1 = 10.2005\text{g}$

$P_2 = 1.0882\text{g}$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.2005 - 1.0882}{10.2005} * 100 = 89.33$$

30) $P_1 = 10.1478\text{g}$

$P_2 = 1.1430\text{g}$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.1478 - 1.1430}{10.1478} * 100 = 88.73$$

$$31) P_1 = 10.2818\text{g}$$

$$P_2 = 1.0579\text{g}$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.2818 - 1.0579}{10.2818} * 100 = 89.71$$

$$32) P_1 = 10.2292\text{g}$$

$$P_2 = 1.1774\text{g}$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10.2292 - 1.1774}{10.2292} * 100 = 88.48$$

Tabla 5. Control de masas de las cápsulas y raíces antes y después del proceso de secado

Código	MCV 1	MCV 2	MCV 3	M. Raíces	MRS 1	MRS 2	MRS 3	% Humedad
MT 1	27.0398	27.0399	27.0397	10.023	28.1736	28.1737	28.1736	88.69
MT 2	26.2363	26.2365	26.2365	10.1091	27.3285	27.3286	27.3283	89.19
MT 3	26.4069	26.4068	26.4065	10.0492	27.4528	27.4530	27.4526	89.59
MT 4	28.2478	28.2471	28.2471	10.0844	29.3495	29.3493	29.3497	89.07
MT 5	27.7433	27.7430	27.4433	10.0200	28.8074	28.8071	28.8070	88.38
MT 6	27.4272	27.4273	27.4274	10.0814	28.4997	28.5000	28.4998	89.36
MT 7	26.9978	26.9977	26.9979	10.0830	28.057	28.0359	28.055	89.57
MT 8	28.9795	28.9794	28.9793	10.0343	30.0752	30.0756	30.0754	89.07
MT 9	26.4762	26.4760	26.4762	10.0026	27.5100	27.5103	27.5101	89.66
MT 10	26.4451	26.4450	26.4449	10.0689	27.5901	27.5904	27.5902	88.62
MT 11	27.9094	27.9093	27.9091	10.0695	28.925	28.9630	28.928	89.77

Fuente: Elaboración propia

Código	MCV 1	MCV 2	MCV 3	M. Raíces	MRS 1	MRS 2	MRS 3	% Humedad
MT 12	28.9325	28.9324	28.9326	10.0754	29.9923	29.9924	29.9921	89.48
MT 13	2.5642	26.5641	26.5640	10.0607	27.5996	27.6000	27.5999	89.70
MT 14	28.2437	28.2435	28.2438	10.0676	27.9030	27.9032	27.9030	88.86
MT 15	27.9239	27.4237	27.4291	10.0602	28.4514	28.4517	28.4515	89.20
MT 16	29.2591	29.2591	29.2587	10.0715	30.3712	30.3713	30.3710	88.95
MT 17	28.9356	28.9359	28.9358	10.1102	30.0301	30.0303	30.0303	89.17
MT 18	26.5825	26.5824	28.5823	10.1011	27.7135	27.7137	27.7133	88.80
MT 19	25.8418	25.8414	25.8415	10.0508	26.9552	26.9555	26.9553	88.91
MT 20	29.7523	29.7525	29.7524	10.0389	30.8148	30.8149	30.8146	88.41
MT 21	28.6636	28.6634	26.6638	10.1038	27.7597	29.7600	29.7598	89.15
MT 22	26.8472	26.8470	26.8469	10.0678	27.9418	27.9420	27.9417	89.12

Código	MCV 1	MCV 2	MCV 3	M. Raíces	MRS 1	MRS 2	MRS 3	% Humedad
MT 23	27.0512	27.0510	27.0512	10.1732	28.0455	28.0460	28.0452	89.19
MT 24	25.8517	25.8515	25.8518	10.1193	26.7901	26.7899	26.7899	89.19
MT 25	29.2860	29.2858	29.2856	10.1129	30.2550	30.2550	30.2548	89.15
MT 26	27.5185	27.5186	28.5325	10.2341	28.5326	28.5324	28.5325	89.16
MT 27	27.0416	27.0416	28.0417	10.2599	28.0406	28.0404	28.0402	89.28
MT 28	27.2619	28.2618	28.2617	10.2457	29.2685	29.2688	29.2687	89.19
MT 29	29.2615	29.2616	29.2613	10.3590	30.0805	30.0803	30.0801	89.55
MT 30	27.1136	29.1133	29.1135	10.2005	29.9992	29.9990	29.9899	89.33
MT 31	26.0020	26.0022	26.0019	10.1478	27.4328	27.4325	27.4326	89.73
MT 32	26.4849	26.4847	26.4848	10.2818	27.0638	27.0639	27.0636	88.71
MT 33	28.0942	28.80944	28.0944	10.2292	29.8684	29.8682	29.8684	88.48

Fuente: Elaboración propia

MCV = Masa de capsula vacía

MRS= Masa de raíz seca

