

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



“ INVESTIGACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS FRACCIONES DE LOS EXTRACTOS DE CINCO ESPECIES VEGETALES MEDIANTE EL BIOENSAYO DE Artemia salina ”

Trabajo de Graduación Presentado por:

IRMA IVETTE CASTRO ALVARENGA

MISHTI MATALI CORDOVA FLAMENCO

Para optar al Grado de:

LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

Septiembre de 2003.

San Salvador, El Salvador, Centro América



©2004, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

DRA. MARIA ISABEL RODRÍGUEZ

SECRETARIO GENERAL

LIC. LIDIA MARGARITA MUÑOZ VELA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. MARÍA ISABEL RAMOS DE RODAS

SECRETARIO

LIC. ANA ARELY CÁCERES MAGAÑA

ASESOR:

LIC. RINA ANTONIETA TOLEDO MENDOZA

JURADO:

LIC. NORMA ELIZABETH ZELAYA

LIC. REINA MARIBEL GALDAMEZ

LIC. RITA EVELYN ROQUE

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por guiarme y permitirme concluir con éxito la meta trazada al inicio de mi carrera a nivel superior.

A mis padres por darme la vida y a los miembros de mi familia por su apoyo a lo largo de mi carrera.

A todas las personas que me han apoyado en algunos momentos que lo necesite, de manera leal y desinteresada.

A mi compañera de tesis por compartir conmigo el esfuerzo y sacrificio que empleamos a lo largo de nuestra investigación.

Mishti

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO: Por su infinito amor y su maravillosa bondad, por estar siempre conmigo, por ser mi guía y mi fortaleza en todo momento.

A MIS AMADOS PADRES: Saúl Antonio Castro Alvarado e Irma Leonor Alvarenga de Castro, por su amor, cariño, comprensión y sacrificio.

A MIS HERMANOS: Ernesto Antonio y Ricardo Alfredo por su cariño y apoyo en todo momento.

A MIS TIOS (AS), PRIMOS (AS), por todo el cariño que me han brindado.

A MIS AMIGOS, por haberme apoyado siempre, compartiendo su amistad.

A MI COMPAÑERA: Mishti Matali Córdova Flamenco, por su compañerismo y sacrificio en la realización del trabajo.

Y a todas las personas que de una o de otra forma me brindaron su cariño, apoyo y colaboración para la finalización de este trabajo.

Ivette.

AGRADECIMIENTOS:

A nuestro Asesor por su guía y orientación a lo largo de nuestro trabajo de investigación; ayudándonos de esta manera a concluir con éxito todos los objetivos que nos trazamos al inicio de todo este proceso que lleva impreso el esfuerzo en conjunto de nosotras y ella.

A nuestro jurado Lic. Norma Elizabeth Zelaya, Lic. Reina Maribel Galdámez y Lic. Rita Evelyn Roque; Por evaluar nuestro trabajo de investigación; dedicando para ello parte de su tiempo y esfuerzo, para lograr la culminación de nuestra investigación de forma exitosa.

Agradecimiento a la Asociación de Promotores Comunales Salvadoreños; por creer en nuestro proyecto y brindarnos el financiamiento necesario para llevarlo a cabo; permitiendo de esta manera que se genere un aporte en esta área de investigación.

Mishti e Ivette.

INDICE

Pág.

OBJETIVOS

RESUMEN

INTRODUCCION

CAPITULO I. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.

1. MONOGRAFÍAS DE LAS ESPECIES VEGETALES.

- | | |
|--|----|
| 1.1. Annona diversifolia. (Anona). | 7 |
| 1.2. Rauwolfia tetraphyla. (Amatillo). | 10 |
| 1.3. Yucca elephantipes. (Izote). | 12 |
| 1.4. Mammea americana. (Mamey). | 14 |
| 1.5. Jatropha curcas. (Tempate). | 16 |

2.GENERALIDADES DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

- | | |
|---|----|
| (<u>Artemia salina</u>) | 18 |
| 2.1. Parámetros críticos para una eclosión optima . | 21 |
| 2.2. Ciclo de Vida. | 21 |
| 2.3. Sistema de Reproducción. | 22 |

CAPITULO II. PARTE EXPERIMENTAL.

- | | |
|------------------------------|----|
| 1. RECURSOS MATERIALES. | 29 |
| 2. METODOLOGÍA. | 33 |
| 2.1. Revisión bibliográfica. | 38 |

2.2. Recolección del material vegetal.	
2.3. Preparación de los extractos.	
2.4. Fraccionamiento de los extractos.	
2.5. Pruebas Fitoquímicas.	
2.6. Bioensayo con <u>Artemia salina</u> .	
2.6.1. Preparación del medio de cultivo.	45
2.6.2. Preparación de Nauplios.	45
2.6.3. Preparación de la Muestra.	46
2.6.4. Preparación de solución Blanco.	47
2.6.5. Ensayo.	47
2.6.6. Cálculo de la Concentración Letal Media (LC ₅₀).	49

CAPITULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

1. Tablas y Gráficas obtenidas a Concentración de 500 ppm e Interpretación de Resultados de las especies vegetales en estudio.

1.1 Annona diversifolia (Anona).	52
1.2 Rauwolfia tetraphyla (Amatillo)	65
1.3 Mammea americana (Mamey)	77
1.4 Jatrophas curcas (Tempate)	90
1.5 Yucca elephantipes (Izote)	103
2. Interpretación de Gráficas.	115

CAPITULO IV : CONCLUSIONES.	117
CAPITULO V. RECOMENDACIONES.	120
BIBLIOGRAFÍA.	124
ANEXOS.	
Anexo I. Glosario	
Anexo II. <u>Artemia salina</u> .	
Anexo III Preparación de reactivos de Pruebas Fitoquímicas.	
Anexo IV. Calculos de obtención del porcentaje de mortalidad de <u>Artemia</u> <u>salina</u> .	
Anexo V. Cristalería y Equipo .	
Anexo VI. Esquema del microplato utilizado en el bioensayo.	

OBJETIVOS.

1. Objetivo General.

- 1.1 Investigar la actividad citotóxica a las fracciones de los extractos de cinco especies vegetales mediante el bioensayo de Artemia salina.

2. Objetivos específicos.

- 2.1 Obtener los cinco extractos vegetales por el método de maceración de acuerdo a la selección previa.
- 2.2 Separar las diferentes fracciones de los extractos de cinco especies vegetales haciendo uso de las técnicas cromatográficas.
- 2.3 Determinar la actividad citotóxica de las diferentes fracciones a concentración de 500 y 250 p.p.m.
- 2.4 Dar a conocer la presencia de metabolitos secundarios en las fracciones activas de cinco extractos vegetales mediante el ensayo fotoquímico preliminar.
- 2.5 Obtener la concentración letal media (LC_{50}) de las veinticinco fracciones de los cinco extractos en estudio.

RESUMEN.

La presente investigación tiene como objetivo determinar la actividad citotóxica de las fracciones de los extractos de los siguientes vegetales : *Annona diversifolia* (Anona) *Yucca elephantipes* (Izote), *Mammea americana* (Mamey), *Rauwolfia tetraphylla* (Amatillo), *Jatropha curcas* (Tempate); haciendo uso del bioensayo con *Artemia salina* mediante el método de los micropozos.

Se obtuvieron las diferentes fracciones haciendo uso de cinco disolventes de diversas polaridades (n-Hexano, Diclorometano, Cloroformo, Acetato de Etilo, Metanol). Dando como resultado cinco fracciones de cada planta y un total de veinticinco fracciones . Se determinó el grado de toxicidad que cada una de ellas presentaba sobre *Artemia salina* trabajándose a concentraciones de 500 ppm (partes por millón).

Para lograr interpretar los resultados experimentales se hizo uso de un programa de computadora llamado “ Probit “ , en el cual se introdujeron los valores de concentración con los respectivos porcentajes de mortalidad de *Artemia salina*, obteniéndose así valores y gráficos para la concentración letal media (LC_{50}) .

Según la bibliografía consultada se considera citotóxico todo extracto vegetal que presenta un LC_{50} menor de 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Dentro de los resultados obtenidos a partir del bioensayo todos los valores de LC_{50} fueron menor de los 1000 $\mu\text{g/ml}$, lo que muestra la toxicidad.

Asi tenemos que : Anona en n-hexano, en diclorometano, en cloroformo, en metanol, como Amatillo en n-hexano, en acetato de etilo, en metanol, asi como Izote en diclorometano, mataron el 100% de Artemia salina (poblacion en estudio).Mientras que las demas fracciones dieron un LC₅₀ que no superaba los 58.38 ug/ml.

Razon por la cual no se recomienda la utilizacion interna de estas especies vegetales.

INTRODUCCION.

En nuestro país el uso de plantas medicinales es una práctica muy frecuente en toda la población ,llegando hasta el grado de la ingestión de muchas especies vegetales sin tener ningún conocimiento científico.

Es por esto que surgen Trabajos de Investigación con la finalidad de obtener un mayor conocimiento acerca del uso adecuado de las especies vegetales y sobre todo de su toxicidad.

En investigaciones anteriormente realizadas se han demostrado que los extractos de especies vegetales como la anona (*Annona diversifolia*), el amatillo (*Rauwolfia tetraphyla*), el izote (*Yucca elephantipes*), el mamey (*Mammea americana*) y el tempate (*Jatropha curcas*) , presentan un elevado grado de toxicidad sobre *Artemia salina*, estos datos estan expresados como la totalidad de los componentes químicos presentes en los extractos, por tal razón se vió la necesidad de investigar que fracciones de los extractos crudos eran los responsables de esa actividad, es por esto que dichos extractos fueron sometidos a fraccionamientos mediante técnicas cromatográficas en columna; utilizando para ello cinco disolventes de diferentes polaridades haciéndolos pasar primero los nopolares (n-hexano, diclorometano), los de mediana polaridad cloroformo y acetato de tilo y finalizando con el polar (metanol), tomándose como base para su clasificación las constantes dieléctricas de cada uno de ellos ya que a mayor polaridad mayor constante dielectrica cada una de las veinticinco fracciones fueron sometidas al ensayo con *Artemia salina* y luego se investigaron los metabolitos secundarios presentes en las fracciones activas. El presente trabajo forma parte del macroproyecto “Búsqueda de Bioactividad en extractos de la flora salvadoreña mediante bioensayos simples”. En el cual intervienen la sección de Investigación

Aplicada y Tesis Profesionales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, con el programa de Ciencia y Tecnología (CYTED) y bajo el financiamiento de la Asociación de Promotores Comunales Salvadoreños (APROCSAL) en la que se investigan las actividades biológicas de diferentes extractos de plantas medicinales utilizadas por la población salvadoreña.

Capitulo I

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

MONOGRAFÍAS DE LAS ESPECIES
VEGETALES

1.1 Annona diversifolia

FAMILIA : Annonaceae.

NOMBRE COMUN : Anona blanca, Anona rosada.

DISTRIBUCIÓN Y HABITAT : Nativa del Sur de México hasta El Salvador.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Es un árbol frutal que no sobrepasa los 10 metros de altura , cuyos frutos pueden obtenerse desde el mes de Julio hasta Septiembre, ya que es ese tiempo donde se obtiene la mayor cosecha .

Hojas: son oblongas, los pedúnculos son opuestos a las hojas, presenta una corola de tres pétalos , cáliz pequeño, con tres dientes cóncavos.

Flores: son solitarias con sépalos redondo-trianguares, son hermafroditas con periantio trímero ; androceo con seis a muchos estambres. Gineceo apocárpico con ovarios superos.

Fruto: es un tubérculo, con forma exterior redonda y un poco apiñada.

Posee en su interior una pulpa blanquecina-rosacea, la cual es cremosa, aromática y muy dulce. Contiene además un gran número de semillas.

Semillas : son pequeñas, oblongo-ovoides, coriáceas, lisas con endosperma agrietado.

CLIMA.

La anona es propia de regiones tropicales y crece mejor en areas donde hay una estación seca, larga y seguida por precipitación .

ANÁLISIS QUÍMICO.

El análisis de las hojas demostró tener: sesquiterpenlactonas , flavonoides , triterpenos, y taninos.

La corteza contiene flavonoides , sesquiterpenlactonas y taninos.

La semilla contiene una elevada concentración de acetogeninas , dentro de las cuales se encuentra asimicina , polisacáridos heterogéneos , galactomosa y ácidos grasos libres.



ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Los extractos etanólicos de hojas y corteza produjeron inhibición en las cepas de Escherichia coli. Los extractos etanólicos a concentraciones de 500 ppm fueron sumamente tóxicos para los peces, que murieron en las primeras 12 horas.

ACTIVIDAD TOXICOLÓGICA.

La presencia de Sesquiterpenlactonas y Saponinas en las semillas de anona le atribuyen una elevada toxicidad, por lo que no se conoce su utilización por vía interna ; La revisión de literatura no dio referencias sobre la toxicidad de esta especie en sus otros órganos.

ACTIVIDAD TERAPÉUTICA.

Las propiedades que posee esta especie vegetal aún no han sido ampliamente estudiadas, pues no se encuentra información bibliográfica alguna.

USOS MEDICINALES ATRIBUIDOS.

Es utilizado para la diarrea, ya que la fruta verde es muy astringente. La raíz puesta a cocción y tomada como agua de tiempo puede ser utilizada como anticonvulsivante , antiespasmódico, relajante, y como antiinflamatorio, debido a la presencia de un compuesto curariforme.

1.2. Rauwolfia tetraphyla

FAMILIA : Apocinaceae

NOMBRE COMUN : Amatillo.

HABITAT: El amatillo se puede encontrar en diferentes regiones que van desde México, Centroamérica, El Caribe y el Norte de Sudamérica . Se puede encontrar en forma de maleza o como matorrales en campos abandonados.



DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Es un arbusto semileñoso , ramificado, con abundante latex.

Hojas: que van de 3-5 verticilos, delgadas, oblongas a anchamente ovado-elípticas .

Flores: Inflorescencia condensada, pocas flores glabras, corola muy pequeña, estambres insertos a la mitad de la corola.

Frutos: color rojo que se ennegrecen al madurar.

ANÁLISIS QUÍMICO.

El tamizaje fitoquímico de la planta completa indica la presencia de alcaloides, glicósidos cardiotónicos ,taninos y triterpenos .Contiene múltiples alcaloides : ajmalicina, ajmalina, aricina, carpagina, chalchupina, deserpidina, heterofilina , isoreserpina, raujemidina , reserpina , reserpina, rauwolscina , tetrafilician, tetrafilina.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Estudios antibacterianos demuestran que los extractos acuosos y etanólicos de la planta completa son inactivos contra E . coli y S . aureus .Estudios antifungicos demuestran que la tintura de hoja no presenta actividad contra hongos patógenos (A. Flavus, E. Floccosum, M. gypseum, T. Rubrum.) a 200 mg/ml.

ACTIVIDAD TOXICOLOGICA.

Los extractos de las hojas de amatillo presentaron elevada toxicidad debido a la presencia de Alcaloides y Taninos , por lo que no se recomienda usarlo por vía interna.

ACTIVIDAD TERAPEUTICA.

Las propiedades que posee esta especie vegetal aún no han sido ampliamente estudiadas pues no se encuentra información bibliográfica alguna.

USOS MEDICINALES ATRIBUIDOS.

La infusión de hojas se usa para tratar disentería y malaria. A la hoja, tallo, corteza y raíz se le atribuyen propiedades febrifugas y sedantes. El cocimiento de hojas y tallo se usa para curar úlceras, sarna, sífilis y otras enfermedades cutáneas , la ceniza de la planta quemada se aplica en las heridas para evitar infecciones; la decocción de la raíz se usa para bajar la hipertensión y tratar afecciones orales. A la Sabia o látex se le atribuye propiedad diurética, emética y expectorante.

1.3. Yucca elephantipes

FAMILIA: Agaveceae.

NOMBRE COMUN: Izote

HABITAT: Se puede encontrar entre la región de México y América Central.



DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Planta arborea, de 3-10 metros de alto.

Tallo: en forma de columna , con pocas ramas cortas y densas.

Hojas: son largas, angostas y en forma de lanzas ó puñal, terminan en aguijón , son duras y firmes; y van apretadas en torno al tallo.

Flores: son de color blanco crema, en forma de campana, y en racimos.

Frutos: carnosos, en forma de capsula ó baya , con semillas comprimidas .

ANÁLISIS FITOQUÍMICO.

Contiene un esteroide llamado esmilagenina y saponina. Las hojas contienen alcaloides, taninos, triterpenos, glicósidos saponínicos ; la corteza contiene taninos, triterpenos, glicósidos saponínicos y la raíz solamente contiene glicósidos saponínicos .Las flores contienen ácido ascórbico, niacina, y tiamina .



ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Los extractos acuosos y etanólicos de hojas, corteza y raíz no tuvieron actividad inhibitoria para E. coli , y S. Aureus .

ACTIVIDAD TOXICOLOGICA.

Las hojas de izote presentan un alto contenido de Glicósidos Saponinicos, Alcaloides y Taninos por lo que se demuestra su toxicidad, por lo que no se recomienda usarla internamente.

ACTIVIDAD TERAPEUTICA.

Las propiedades que posee esta especie vegetal aún no han sido ampliamente estudiadas pues no se encuentra información bibliográfica alguna.

USOS MEDICINALES ATRIBUIDOS.

Las candelillas de izote en infusión son utilizadas para acelerar el parto, despertar el apetito, artritis, tos, diabetes, asma, dolor de oídos, hervor de pecho, catarro y malestar general. En la medicina moderna la infusión de las flores es utilizada como un tónico estomacal y se valoran para acción diurética .

1.4. Mammea americana.

FAMILIA: Clusiaceae.

NOMBRE COMUN: Mamey.

DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA: Originaria de América del Sur y las Antillas, es actualmente pantropical.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Árbol de hasta 25 metros de altura.

Hojas: de elípticas a elíptico-ovados, de 8-16 cm, las venas muy apretadas, redondeadas en el ápice.

Flores: son solitarias; cáliz de 8-10mm ; pétalos blancos, obovados, de hasta 2 cm.

Fruta: Drupa globosa, apiculada, de 5 a 8 cm de diámetro.

ANÁLISIS QUÍMICO:

La semilla de mamey contiene saponinas, flavonoides, taninos, sesquiterpenlactonas, alcaloides .



ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Los extractos acuosos y etanólicos de hoja, corteza y raíz de la planta completa , no tuvieron actividad inhibitoria en las cepas de E. coli y S. aureus.

ACTIVIDAD TOXICOLOGICA.

No se conoce toxicidad alguna del árbol en general para el humano y animales de sangre caliente excepto de las semillas ya que estas son veneno para peces y aves.

ACTIVIDAD TERAPEUTICA.

Aún no se han realizado estudios científicos de la actividad terapéutica que esta especie vegetal pueda tener.

USOS MEDICINALES ATRIBUIDOS.

La semilla pulverizada en aceite de coco se aprovecha para la lucha contra los piojos.

La semilla molida y en emulsión con agua son usadas para el control de pulgas en perros y piojos en humanos, ácaros y algunas enfermedades del humano como llagas externas en la piel.

1.5. Jatropha curcas.

FAMILIA: Euphorbiaceae.

NOMBRE COMUN: Tempate.

DISTRIBUCION Y HABITAT: Nativa de México y Centroamérica ; Naturalizada en Sudamérica, el Caribe y el viejo mundo.



DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Árbol pequeño de madera suave, hasta 6 metros de altura, con ramas esparcidas y ramitas gruesas; contiene una savia traslúcida, amarillenta .

Hojas: son deciduas, alternas ó en grupos terminales densos, ovadas, acorazonadas en la base, de 3-5 lóbulos, 6-35 cm de ancho, en estambres de 3-6.5 cm de largo.

Flores: son amarillentas, acampanadas, 6 mm de ancho; masculinas y femeninas juntas en grupos.

Fruto: son cápsulas ovales, lisas, de 2.5-4 cm de largo, verde al principio, negro al final, y al secarse dejan libres de 2-3 semillas.

Semillas: son oblongas, negras de 2 cm de largo y 1 cm de grueso .

ANÁLISIS QUÍMICO.

El ensayo fitoquímico de las hojas de tempate indica la presencia de flavonoides, de taninos, alcaloides. Las hojas contienen α -amirina; una mezcla de β -sitosterol, stigmasterol y campesterol, isovitexina y vitexina, jatrofina y diterpenoides. Las semillas contienen hasta un 40% de un aceite purgante color amarillo, semisecante, que contiene los ésteres de los ácidos palmítico, esteárico, linoleico, oleico, mirístico y araquidónico, ácidos orgánicos, sacarosa, rafinosa, glucosa, fructosa y galactosa.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Estudios antibacterianos demuestran que los extractos etanolicos a diferentes concentraciones no presentaron inhibición frente a las cepas de Escherichia coli.

ACTIVIDAD TOXICOLOGICA.

Su toxicidad es elevada debido a la presencia de Alcaloides , Flavonoides y Taninos.

Por lo que no se recomienda la ingestión de los preparados a base de la planta en general.

La presencia en la semilla de la curcina, una albúmina tóxica termolábil, es la responsable de su elevada toxicidad.

USOS MEDICINALES ATRIBUIDOS.

El látex de tallo y hojas recién cortadas es ligeramente rubefaciente y antiséptico este se aplica tópicamente en la región afectada para el tratamiento de gingivitis, heridas, fracturas, hemorroides, hemorragias, herpes, llagas, picaduras de insectos, quemaduras, úlceras; La infusión de hojas y tallo se utiliza para hacer gárgaras y enjuagues para las infecciones bucales. El aceite de la semilla triturada se usa para tratar fracturas, gota y dolor de muelas, y quemaduras. A la infusión de hojas y corteza se les atribuyen propiedades catárticas, desinflamantes, estupefacientes, narcóticas.

2. GENERALIDADES DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACION

(Artemia salina.)

La Artemia salina es un organismo propio de aguas salobres e hipersalinas de todo el mundo. Es utilizada como alimento de los estadios post-larvarios de muchas especies de peces y crustáceos marinos; y forma parte del planeta de las aguas continentales salobres.(17)

Taxonomía.

Phyllum: Artrópoda

Subphyllum: Crustáceos

Clase: Branquiopoda

Orden: Anostraca

Familia: Artemiidae

Genero: Artemia

Especie: salina

Ecología y Distribución Natural.

La Artemia salina se desarrolla perfectamente en agua de mar y algunas cepas geográficas han tenido que adaptarse a condiciones extremas de temperatura (la cual oscila entre los 6-35 °c) y a la composición iónica de aguas ricas en cloruros, sulfatos y carbonatos, y es por esto que se asegura que estos animales poseen el sistema osmoregulatorio más eficiente en todo el reino animal, además son capaces de sintetizar eficazmente pigmentos respiratorios (hemoglobina) logrando con esto hacer frente a los bajos niveles de oxígeno disueltos en

ambientes hipersalinos. Estos crustáceos tienen la capacidad de producir quistes en fase de latencia, cuando las condiciones ambientales ponen en peligro la supervivencia de la especie. Estos quistes son los que permiten la distribución mundial de la *Artemia*, y tanto el viento, como las aves acuáticas son considerados como los vectores naturales que permiten esta dispersión; aunque en tiempos recientes ha sido el hombre el responsable de algunos transplantes en Sudamérica y Australia, con la finalidad de producir mejoras en la industria salinera.

Descripción Anatómica.

La *Artemia salina* en su estado I posee tres pares de apéndices: el primer par de antenas con función sensorial, el segundo par de antenas con función locomotora y filtradora y las mandíbulas para la toma de los alimentos.

Estos crustáceos en sus inicios poseen apéndices lobulares pares (en región torácica) que se diferenciarán después en toracópodos. Se les desarrollan ojos complejos laterales a ambos lados del ojo naupliar. Del estado X en adelante se producen tantos cambios morfológicos como funcionales, así se tiene que las antenas pierden su función locomotriz y se transforman en elementos de diferenciación sexual. Los futuros machos desarrollan unos apéndices curvados y prensiles, en tanto que las antenas de las hembras degeneran en apéndices sensoriales.

Los adultos se caracterizan por un cuerpo alargado con dos ojos complejos pedunculados, un aparato digestivo lineal, unas anténulas sensoriales y once pares de toracópodos funcionales.

El macho posee un par de piezas prensiles musculadas muy características en la región cefálica; mientras que en la parte posterior del tórax se pueden observar un par de penes. La hembra de Artemia no posee apéndices distintivos en la región cefálica, pero puede reconocerse fácilmente por el saco de puesta o útero que está situado inmediatamente detrás del undécimo par de toracópodos. (17)

Ventajas de la Artemia salina como alimento.

-Pequeño tamaño: adultos de 8-13 mm de longitud.

-Elevado contenido en proteínas: nauplios de 50-60 %; adultos de 40-50%.

-Reproducción por medio de quistes durables que toleran la desecación y pueden ser activados en cualquier momento bajo condiciones adecuadas.

2.1. Parámetros críticos para una eclosión óptima .

Temperatura: esta debe encontrarse entre los 26-28°C, ya que por debajo de los 26°C la eclosión es lenta , y arriba de los 28°C el metabolismo de los quistes se detiene irreversiblemente . Lo recomendable es mantener una temperatura constante en el medio de eclosión para obtener así una producción máxima de nauplios en estado I.

Salinidad: Preferentemente se usa agua de mar para la eclosión de los quistes. Pero si la solución de eclosión se prepara , debe de controlarse que la salinidad se encuentre a los 32.5gr/L. La salinidad de los medios de eclosión puede ser fácilmente controlada haciendo uso de un salinómetro.

Oxígeno: debe de mantenerse por encima de 2mg/ml, y debe tomarse en cuenta el tamaño del tanque y la densidad de los quistes incubados.

2.2.Ciclo de Vida.

Cistos: Es un huevecillo de aproximadamente 200-300 micras de diámetro; puede mantenerse inactivo por algún tiempo hasta obtenerse sus condiciones optimas .Una vez puesto en agua de mar , los quistes bicóncavos se hidratan tomando forma esférica y el embrión recobra su metabolismo reversible interrumpido. Tras unas 24 horas, la membrana externa de los quistes se rompe y aparece el embrión rodeado de la membrana de eclosión.

Nauplios: Inmediatamente después de la ruptura de la membrana de eclosión. Sale el nauplio el cual mide aproximadamente 0.4 a 0.5 mm y pesa aproximadamente 0.002 a 0.003 mg.

Juveniles: Son larvas pequeñas que miden aproximadamente de 2-4 mm, las cuales nadan libremente. Poseen un tracto digestivo funcional, un abdomen alargado y muchos apéndices bien diferenciados.

Adultos: Estos miden de 8-10 mm y presentan once pares de teracópodos muy bien diferenciados con antenuelas sensoriales, un par de ojos laterales y tracto digestivo completo.

2.3. Sistema de Reproducción.

La pre-cópula de los adultos se inicia cuando el macho sujeta a la hembra entre el útero y el último par de toracópodos con sus antenas curvadas. Las parejas pueden nadar de esta forma durante largo tiempo en lo que se conoce como

posición de monta, para lo cual mueven sus toracópodos de forma sincrónica .

La cópula es un rápido acto reflejo: la parte ventral del macho se dobla hacia delante y uno de los penes se introduce en la abertura del útero, fertilizando los huevos.

Después de esta fertilización se presentan dos alternativas:

- Si las condiciones ambientales son favorables se inicia el metabolismo embrionario, desarrollándose los nauplios nadadores que luego son depositados por la hembra.

A esto se le llama Reproducción Ovovivípara.

-Si las condiciones ambientales son adversas, las glándulas del útero de la hembra secretan una sustancia color café que enquistan los embriones o cistos, los cuales entran en un estado de latencia y son liberados en forma de quistes , llamándosele a este proceso Reproducción Ovípara .

En *Artemia salina* se producen 15 estadios, creciendo de nauplio a adulto en solo 8 días y reproduciéndose a razón de 50-300 nauplios o cistos cada 4 ó 6 días, teniendo un período de vida de varios meses.

3. GENERALIDADES DE LOS BIOENSAYOS.

3.1. Concepto.

Todos los procedimientos de pruebas realizadas en unidades moleculares o células sencillas y en organismos más complejos con el objetivo de reconocer e investigar la existencia de nuevas sustancias de origen natural capaz de ejercer efectos biológicos principalmente de tipo citotóxico, antitumoral o anticancerígeno son denominados bioensayos.(14)

3.2. Clasificación.

3.2.1. Bioensayo in vitro.

En el área del cáncer los bioensayos in vitro son todas aquellas pruebas en las que los blancos de experimentación lo constituyen cultivos celulares y/o unidades moleculares y cuya finalidad es el descubrimiento de nuevas drogas que sirvan de opción en el tratamiento de dicha enfermedad.(14)

Los bioensayos in vitro se clasifican en dos grupos :

Ensayos celulares : El blanco de experimentación es cualquiera de las unidades que forman parte de la célula o línea celular que está siendo ensayado (membrana celular, mitocondrias, núcleo, etc. (14)

Ensayo molecular : El blanco son unidades subcelulares simples con ADN o ARN.(14)

3.2.2. Bioensayo in vivo.

Los bioensayos in vivo son definidos como las pruebas que tienen como blanco de experimentación organismos de animales que presentan similitud con las células

humanas, por lo que pueden predecir la actividad citotóxica de nuevas drogas descubiertas.

3.3 Relación bioensayos in vitro-bioensayos in vivo.

Las pruebas in vitro por sí solas son insuficientes para las evaluaciones globales de toxicidad debido a la importancia de las interacciones entre células, entre células y tejidos, entre órganos con sistemas morfofuncionales corporales que solo se pueden conseguir en modelos animales. Por otro lado, los bioensayos in vivo ciertamente predicen la habilidad de las drogas para destruir células pero no predicen exclusivamente la destrucción de células cancerígenas sino que indican un amplio rango de efectos farmacológicos, es así que los bioensayos in vitro son complementarios de los bioensayos in vivo y los bioensayos in vivo se complementan con los bioensayos in vitro.(14).

3.4. Bioensayos in vivo utilizando Artemia salina.

Muchos investigadores extranjeros recomiendan el bioensayo de mortalidad de Artemia salina para el estudio de la actividad biológica en cuanto a citotoxicidad de extractos y metabolitos vegetales por presentar correlación con los resultados obtenidos utilizando líneas celulares humanas de carcinoma nasofaríngeo, hepático, de pecho y adenocarcinoma de colon y porque según experiencias de laboratorio no dan resultados falsos positivos, además de ser un método rápido, económico, conveniente y digno de confianza.

Anderson y Suffness en 1991 luego de ensayar diez de los agentes activos anticancerígenos de mayor prescripción en el Instituto Nacional del Cáncer de Maryland (Estados Unidos de América) sobre líneas celulares cancerígenas humanas, correlacionan los resultados con los resultados obtenidos mediante el bioensayo de

mortalidad de Artemia salina , la inhibición del crecimiento tumoral en discos de papa y la proliferación del Lemna minor y concluyen: “El bioensayo de mortalidad de Artemia salina resulta ser superior o igualmente exacto que el bioensayo en el que se utilizan líneas celulares tumorales humanas” (14)

3.5. Bioensayo de Mortalidad de Artemia salina por el método de micropozos.

Artemia salina ha sido utilizada desde los años 60's en varios bioensayos tales como: análisis de residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos, toxinas dinoflageladas, compuestos derivados de la morfina, toxicidad de aceites dispersantes, etc., pero para investigar extractos o metabolitos vegetales no fueron utilizadas sino hasta principios de la década de los 90's. Todos estos bioensayos eran practicados en tubos, haciéndose un método tedioso por la enorme cantidad de tubos utilizados al estudiar diferentes concentraciones y realizar los ensayos

por triplicado. En vista de lo anterior, Pablo Solis en 1992 realizó bioensayos de mortalidad de Artemia salina utilizando el método conocido hasta esa fecha y un nuevo método llamado: “ Método de los Micropozos ”, por utilizar una placa con un número determinado de micropozos que da mayor comodidad al realizar las diluciones de las muestras y la posterior lectura de resultados. Al finalizar el bioensayo , Solis concluye: “ El bioensayo de citotoxicidad por el método de los micropozos usando Artemia salina es igualmente exacto que el método de los tubos y por lo tanto el método de los micropozos puede ser utilizado para ensayar extractos o metabolitos vegetales que no requieran activación metabólica humana”.(20)

Capitulo II

PARTE EXPERIMENTAL

1. RECURSOS MATERIALES.

ESPECIES VEGETALES

<u>Nombre Científico</u>	<u>Nombre Común</u>	<u>Organo utilizado</u>
Annona diversifolia	Anona	Semillas
Rauwolfia tetraphyla	Amatillo	Hojas
Yucca elephantipes	Izote	Hojas
Mammea americana	Mamey	Semillas
Jatropha curcas	Tempate	Hojas y tallo

REACTIVOS Y DISOLVENTES.

n-Hexano

Diclorometano

Cloroformo

Acetato de Etilo

Metanol

Dimetilsulfoxido DMSO

Agua destilada

Agua de bromo

Anhidrido acético

Benceno

Clorhidrato férrico 1% en KOH

Etanol 90 grados

Reactivo de Baljet

Reactivo de Borntrager

Reactivo de Dragendorff

Reactivos de Kedde

Reactivo de Keller

Reactivo de Killiani

Reactivo de Legal

Reactivo de Mayer

Reactivo de Wagner

Solución de Clorhidrato de Quinina 1 %

Solución de Cloruro Férrico 1%

Solución de Cloruro de Hidroxilamina

Solución de Dicromato de Potasio 5%

Solución de Gelatina 5%

Solución de sulfato de atropina 1%

Sub – Acetato de Plomo TS

Sulfato de Cobre (250ug/ml)

Sal de mar.

Laminas de Magnesio

ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.

Nauplios de Artemia salina.

MEDIO DE CULTIVO

Medio agua de mar

CRISTALERIA Y MATERIALES.

Balones fondo redondo de 250 ml.

Beakers de 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml.

Probeta de 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml.

Agitadores.

Espátula y Micro espátula

Termómetro

Jeringa

Columna cromatografica y Silica gel.

Micro pipeta de 100 μ l, 200 μ l.

Malla de asbesto.

Micro pipeta de ocho canales.

Pecera de vidrio.

Algodón

EQUIPO

- Balanza Analítica, Marca : METTLER, Modelo 45, Serie : 126576.
- Balanza Granataria, Marca : Ohaus, Modelo 1, Serie : 800.
- Lampara, Marca : General Elektrik, Modelo SK-891, Serie : 367469.
- Micropipeta, Marca : Wheaton,
Capacidad : 100 ul, Serie :851206.
Capacidad : 10 ul, Serie :851221.
- Motor, Marca : Elite Air Pump, Modelo : 802, Serie : A-802.
- Oxigenador de pecera.
- Baño de María.
- Equipo de Reflujo.
- Estereoscopio, Marca : Swift, Modelo : MZ 816, Serie : 892086.
- Hot- Plate, Marca : Thermolyne, Modelo : HPA 1915B,
Serie : 64920366581
- Salinometro, Marca : Aquarium, Hydrometer with thermometer.
Serie : Tem 9324
- Valvulas de cinco salidas, Marca : Penn play, Serie : VN-5,
Modelo : Lok-Tite.
- Rota vapor
- Estufa

2. 2. METODOLOGÍA.

2.1. Revisión Bibliografica .

2.2. Recolección de material vegetal y tratamiento previo a la extracción.

-Recolección de los organos de interes de la planta, cuidando que no se encuentren dañadas y/o infectadas por insectos o plagas.(Cuadro N° 1)

-Limpieza de aquellos residuos de tierra con agua de chorro y luego agua desmineralizada.

-Secar a la sombra para eliminar el agua de lavado sobre papel.

-Fraccionar la planta recolectada.

2.3. Preparación de los Extractos.

Para la obtención de los extractos utilizar 3 kilogramos de órganos frescos de las especies vegetales .

Colocar las piezas pequeñas de cada especie vegetal por separado en un balón con capacidad para 5 litros, agregar etanol al 70% hasta cubrirlos ,reflujar en un aparato para reflujo provisto de camisa térmica y termostato por 8 horas a una temperatura de 70°C. Filtrar el extracto etanólico obtenido a través de un embudo de vidrio provisto de algodón para que el extracto etanólico quede libre de partículas extrañas. Concentrar en un rotavapor a una temperatura de 40°C y a 90 revoluciones por minuto (rpm) hasta recuperar la mayoría del solvente y el extracto tome una consistencia viscosa. Colocar el extracto obtenido (50 gr) en una capsula de porcelana, cubrir con papel glacil y guardar en un lugar fresco.

2.4. Fraccionamiento de los extractos.

2.4.1.Preparación de los extractos para la Columna Cromatográfica : 50 gramos del extracto concentrado se mezclan con 15 gramos de silica gel para columna , hasta obtener una mezcla homogénea .

2.4.2.Preparación de la columna cromatográfica : Una columna cromatografica de 70 cm de longitud, de un diámetro de 3.5 cm aproximadamente, previamente lavada y sin restos de agua se le coloca una torunda de algodón y se rellena con 60-70 gramos de silica gel de columna, a la cual es incorporada en la parte superior la mezcla anteriormente preparada del extracto.(2.4.1).

2.4.3.Elución de la columna cromatográfica: de acuerdo a las polaridades de los disolventes de menor a mayor , se eluye la columna haciendo pasar 1½ litro de los disolventes de la manera siguiente: n-hexano, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo y metanol, constituyendo cada uno de estos una fracción .Realizándose esto con el extracto de cada planta.

2.4.4. Concentrar las fracciones obtenidas en el Rotavapor a una temperatura de 40 °c y presión controlada hasta obtener un residuo , el cual se colocó en una estufa a 40°c durante una hora para eliminar los residuos de disolventes que pudieran haber quedado.

Sellar y guardar hasta la realización del bioensayo.

PRINCIPIOS ACTIVOS FORMADOS EN LAS PLANTAS.

La variedad de componentes o principios activos que posee la planta está comprendida dentro de los llamados **Metabolitos**, éstos son formados a partir de la fotosíntesis, y pueden clasificarse en **Primarios** y **Secundarios**.

METABOLITOS PRIMARIOS.

Están universalmente distribuidos y participan en la actividad celular de plantas, son necesarios para su reproducción y crecimiento ya que sin los metabolitos, la planta no podría desempeñar sus funciones.

Los metabolitos primarios tales como: productos de cadena respiratoria, el ciclo de los ácidos grasos y de aminoácidos esenciales por sí mismos son de escasa importancia en la fitoterapia. En ciertos casos sin embargo su acumulación y la forma de acumulación puede ser de interés, así todas las plantas verdes que se exponen a la luz producen almidón como producto de las primeras reacciones de la fotosíntesis y según la forma que tenga en cada planta será de valor taxonómico.

METABOLITOS SECUNDARIOS.

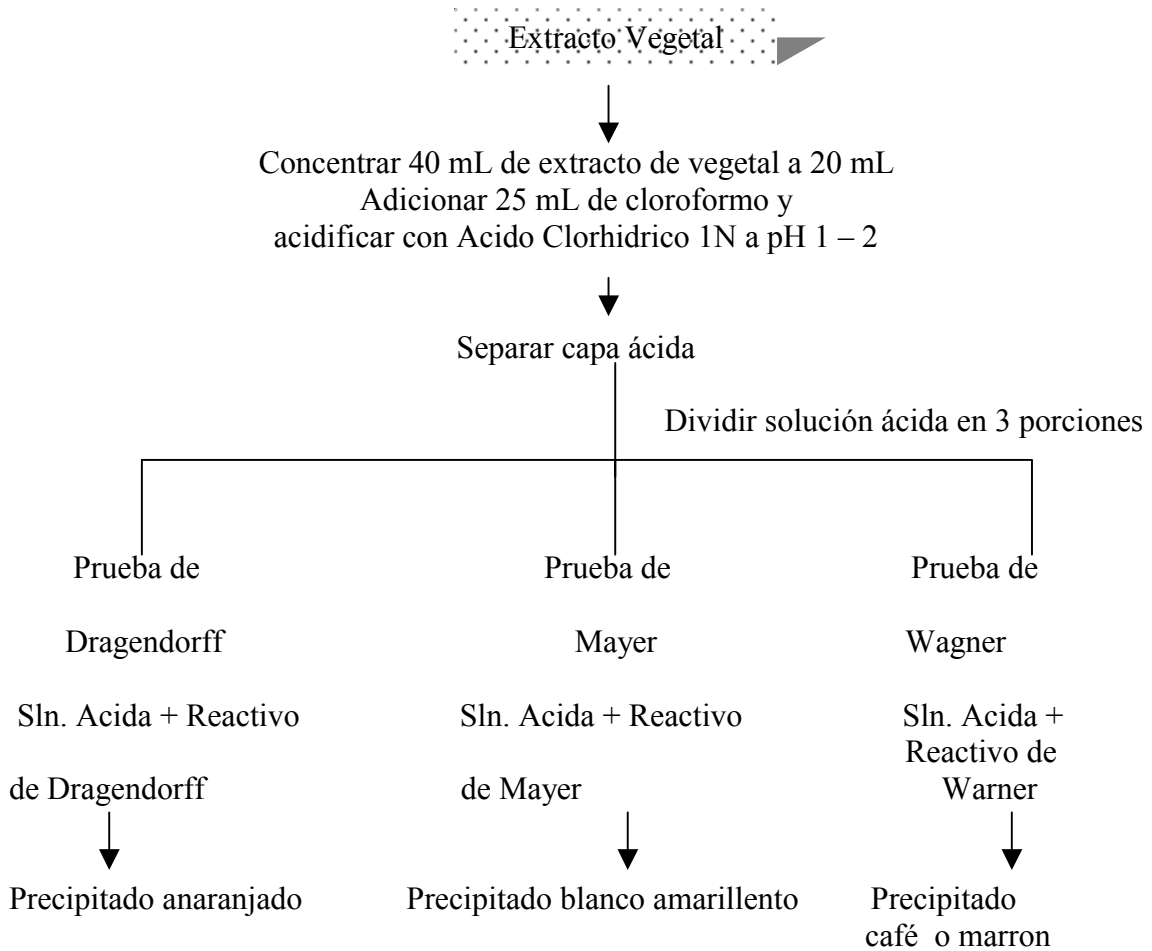
Son aquellos metabolitos que no están necesariamente relacionados con el metabolismo esencial de la célula, su producción depende de los ciclos metabólicos fundamentales de los tejidos vivos a partir de la biogénesis o rutas biogénicas: ácido shikímico, acetogeninas y ácido mevalónico, las cuales originan cada una de ellas a los diferentes metabolitos secundarios.

Como característica de estos metabolitos secundarios tenemos :

- La planta no los necesita para su supervivencia.
- Cada planta tiene sus propios metabolitos secundarios específicos razón por la cual también cada planta tiene usos medicinales diferentes.
- Poseen actividad biológica, fisiológica o farmacológica en el hombre y animales.
- Son de ayuda al taxónomo o farmacognosta para su clasificación y quimiotaxonomía.
- Los metabolitos secundarios se reservan en diferentes órganos de la planta como ejemplos de estos tenemos: Alcaloides, taninos, glicósidos cardiotónicos, flavonoides, sesquiterpenlactonas, etc.

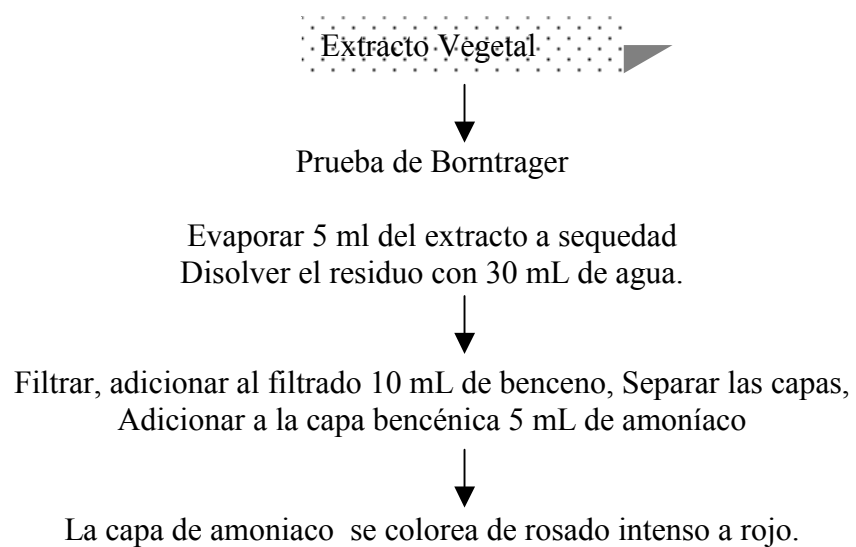
PRUEBAS FITOQUIMICAS .

2.5.1. Ensayos para determinar alcaloides



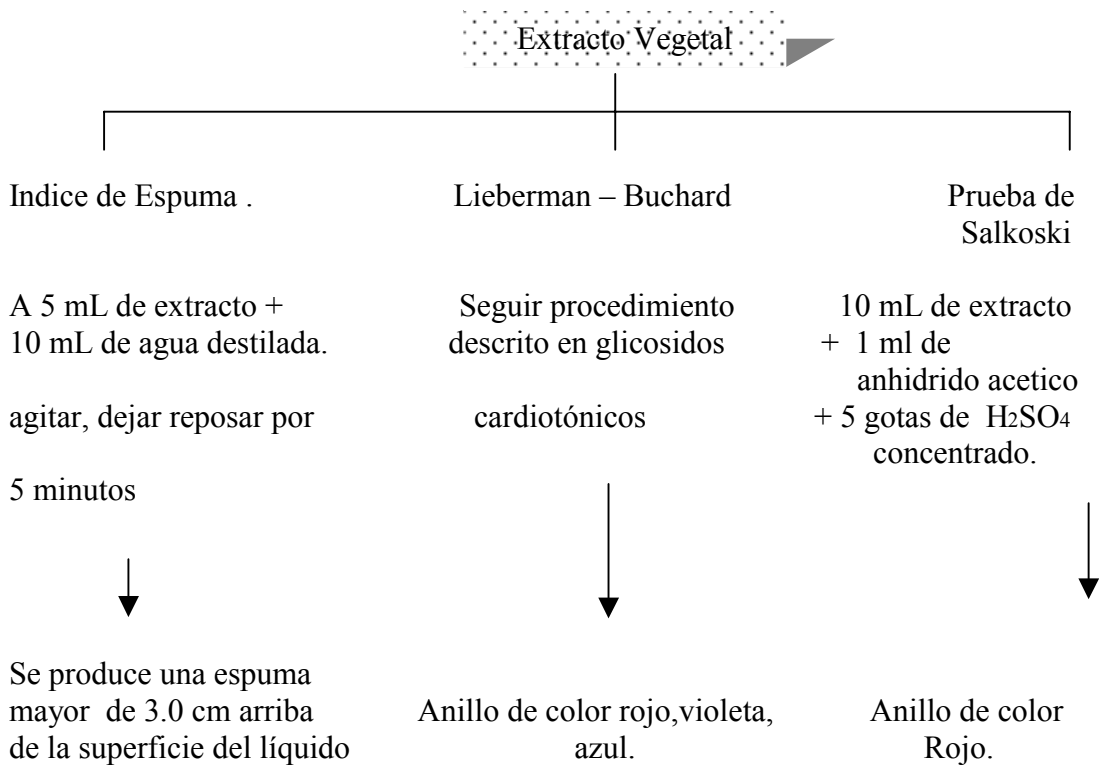
Los alcaloides son compuestos formados por Nitrogeno el cual reacciona con los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner, formando complejo de precipitación coloreados.

2.5.2. Ensayos para determinar antraquinonas.



Las antraquinonas tienen como estructura base el antraceno, al cual en el anillo B se sitúan dos carbonilos en posición para.
Estos reaccionan con el amoníaco mediante reacción oxidoreducción formando un complejo coloreado.

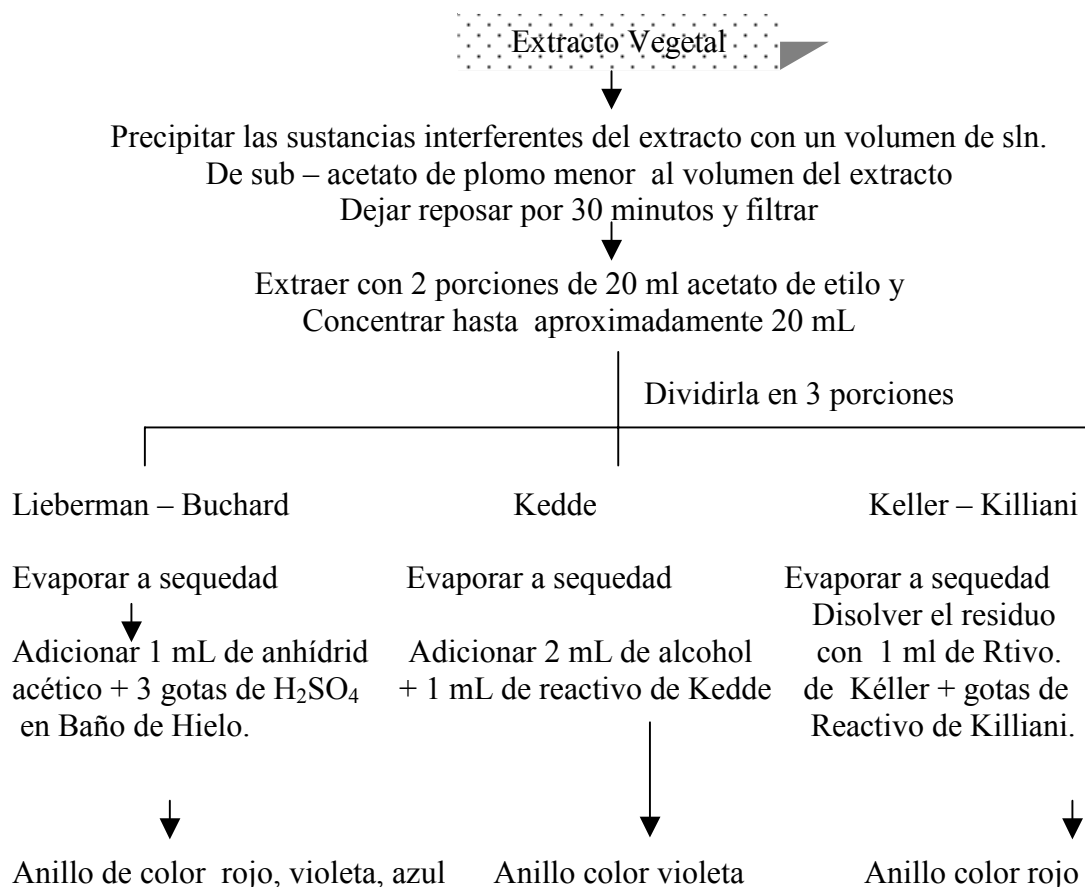
2.5.3. Ensayos para determinar glicósidos saponínicos



Las saponinas en contacto con el agua disminuyen la tension superficial formando espuma caracteristica que debe perdurar por lo menos durante 15 minutos para considerarse positivo.

La prueba de Lieberman Buchard y Salkoski identifican la presencia del anillo esteroidal de los glicosidos saponinicos dando diferentes formaciones de anillos de color según sea la prueba.

2.5.4. Ensayos para determinar glicósidos cardiotónicos

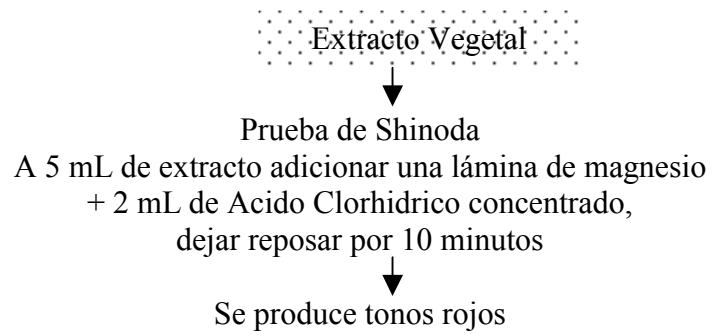


La prueba de Lieberman-Buchard identifica el anillo esteroidal presente en el glicosido, forma complejos coloreados.

Kedde identifica el anillo lactónico ya sea bifodienólico o cardenolido, los reactivos reaccionan con la lactona insaturada formando complejos coloreados.

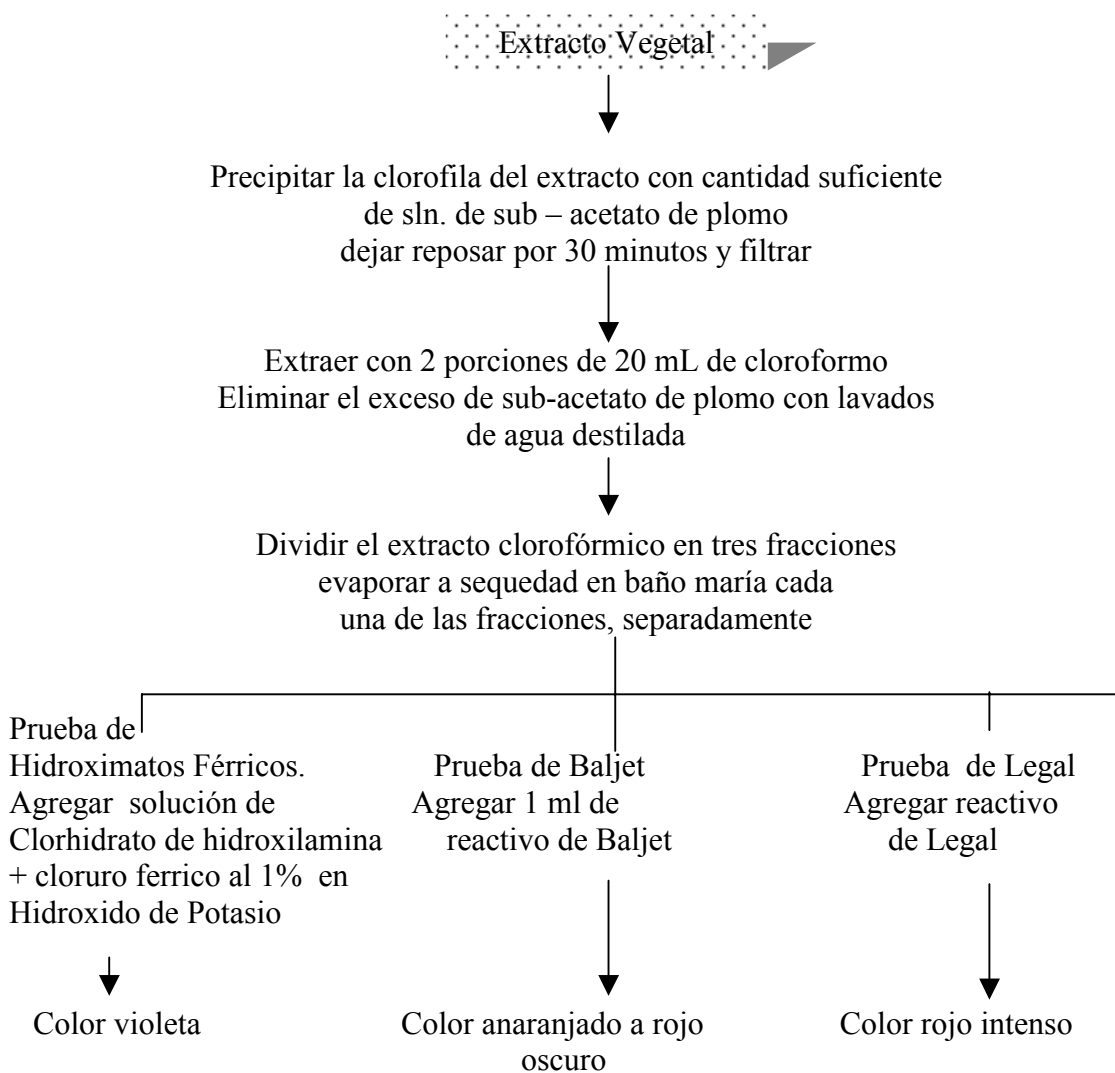
Kéller- Killiani identifica el desoxiazúcar del glicosido cardiotónico dando como resultado un anillo de color rojo con los reactivos de la prueba debido a la formación del complejo.

2.5.5. Ensayos para determinar flavonoides



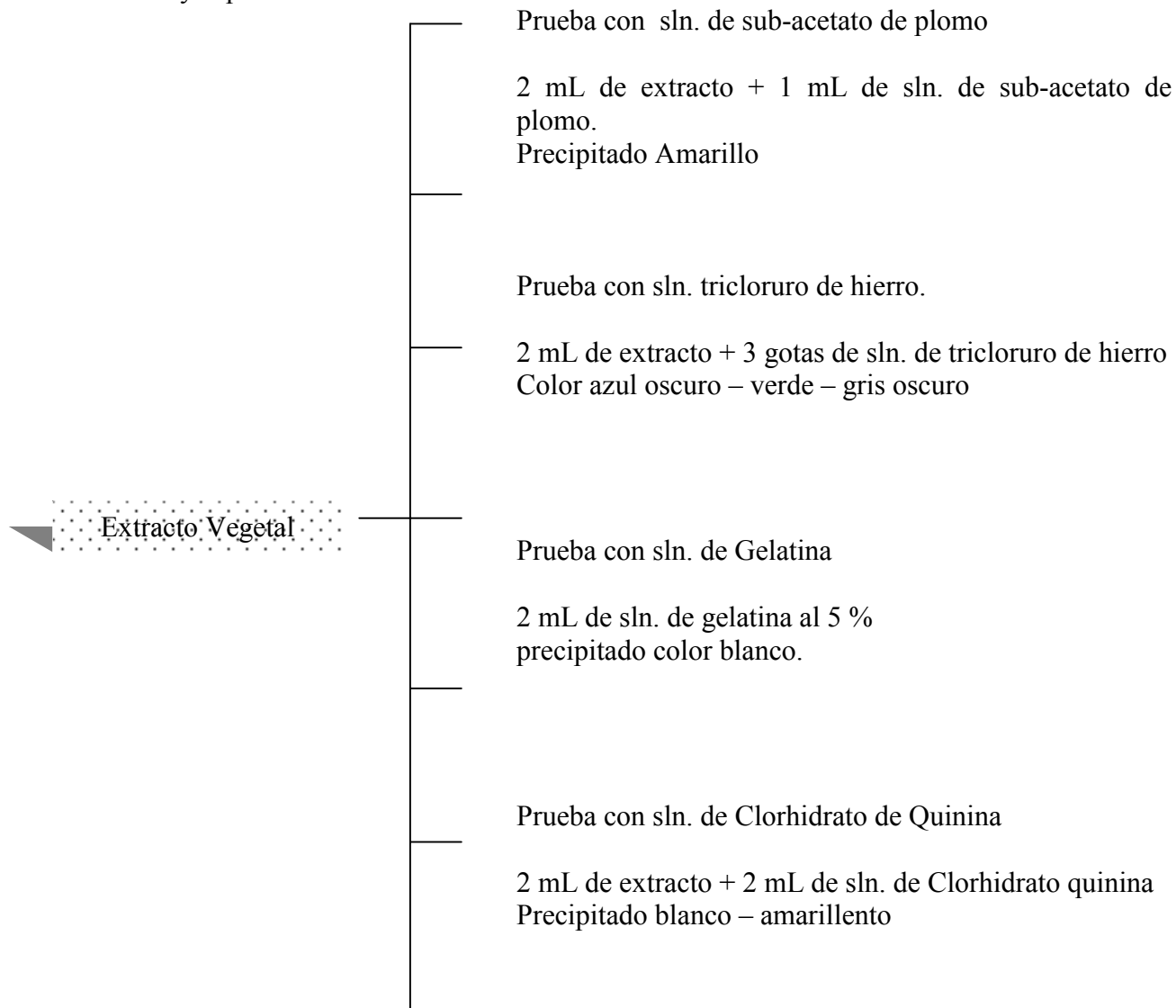
Los flavonoides presentes en las plantas reaccionan con el magnesio metálico y el ácido clorhídrico concentrado formando el clorhidrato de cianidina, que es un complejo de color rojo.

2.5.6. Ensayos para determinar sesquiterpenlactonas



Las tres pruebas actúan e identifican a la lactona insaturada de las sesquiterpenlactonas presentes en el extracto, formando complejos coloreados cuyo color es de acuerdo a cada prueba.

2.5.7. Ensayos para determinar Taninos.



Los taninos son polifenoles , es decir que sus moléculas poseen muchos grupos OH fenolicos los cuales reaccionan con los reactivos de cada prueba formando complejos de precipitación coloreados, ademas precipitan con las proteínas (Prueba de Gelatina), y precipitan con soluciones de alcaloides (clorhidrato de quinina).

2.6 Bioensayo con Artemia salina.

A cada una de las fracciones obtenidas se le realizará el bioensayo de Artemia salina por triplicado según el protocolo siguiente:

2.6.1. **Preparación del medio de cultivo (Agua de Mar):**

a) Pesar 30 g de sal de mar (Sigma Chem. Co.) y disolver en medio litro de agua destilada.

b) Pesar 6 mg de levadura y disolver en 20 ml de agua destilada, calentar si es necesario.

c) Mezclar ambas soluciones y aforar hasta un litro con agua destilada.

2.6.2. **Preparación de los nauplios:**

a) En un recipiente limpio colocar alrededor de 200 ml de agua de mar (a temperatura ambiente) y aproximadamente 100 mg de huevecillos.

b) Oxigenar la mezcla con ayuda de una bomba de aire para acuario, durante 30 horas aproximadamente a una temperatura de 22 a 29 grados Celcius.

c) Al cabo de 30 horas separar los nauplios de los huevecillos, quitándoles el burbujeo y dejando que los naupilos se reúnan en una esquina del recipiente debido a su movimiento fototrópico.

d) Remover los nauplios con la ayuda de una pipeta y colocarlos en un recipiente con agua de mar fresca, previamente oxigenada.

e) Repetir esta operación en el caso que se hayan traspasado muchos huevecillos. Este paso asegura la edad o estadio de los nauplios utilizados en

el ensayo. f) Luego alrededor de 18 horas del paso (b) ó 48 horas del paso (a), colocar una cantidad de nauplios en un vaso químico de 100 ml con aproximadamente 50 ml de agua fresca de mar y previamente burbujeada, continuar burbujeando de forma tal que los naupilos formen una suspensión homogénea. Con

la ayuda de una fuente de luz y una micropipeta, fijada a 100 μ l, contar cuantos naupilos, son recogidos, se recomienda de los naupilos no excedan de 15 ni sean menores de 10.

2.6.3. Preparación de las muestras

Para cada una de las fracciones de los extractos de las cinco especies vegetales se preparan dos muestras a las concentraciones de 500 p.p.m. y 250 p.p.m., obteniéndose cincuenta muestras en total a las cuales se les realizó el bioensayo.

a) Preparación de la muestra a 500 μ g/ml.

Pesar 12.5 mg de las fracciones de los extractos de las especies vegetales y disolver en 1.25 ml de dimetilsulfoxido, pasar a un balon volumetrico de 25 ml y adicionar agua de mar, llevar a volumen.

b) Preparación de las muestra de 250 μ g/ml.

De la muestra a 500 p.p.m. tomar una alícuota de 5ml, colocar en un balon Volumetrico de 10 ml y llevar a volumen con agua de mar.

2.6.4. Preparación de la Solución blanco: se prepara adicionando 50 ul de Dimetilsulfóxido (DMSO) en 950 ul de agua destilada.

2.6.5. Ensayo

a) En un plato de 96 micropozos, de 300 ul, colocar 100 ul de agua de mar, excepto en la línea A.(ver anexo IV)

b) En los pozos A1, A2, y A3 colocar 200 ul de solución blanco (50 ul de Dimetilsulfóxido [DMSO] en 950 ul de agua de mar).

En los pozos A4, A5, y A6 colocar 200 ul de una solución patrón de Sulfato de Cobre CuSO₄ (250 ug/ml)

En los pozos A7, A8 y A9 colocar 200 ul de una solución de muestra, en los pozos A10, A11 y A12 colocar la segunda muestra.

c) Usando una pipeta de 8 canales a lo largo de la línea A (pozos del A1 al A8), remover 100ul de la solución y colocarla en la línea B, mezclado por succiones repetidas de la solución.

d) Remover 100 ul de está línea y colocarla en la línea C y mezclar, repetir este procedimiento hasta el final del plato.

Al final quedarán 100 ul de solución que se debe descartar.

e) Repetir este procedimiento para las columnas 9 a 12. Ahora todos los micropozos contienen 100 ul de solución.

f) Adicionar 100 ul de la suspensión contenida entre 10 y 15 nauplios a todos los pozos.

g) Tapar el plato e incubar a 22 – 29 grados Celcius durante 24 horas.

Lectura de resultados:

a) Luego de 24 horas se contará los nauplios usando un estereoscopio . Anotar este número en cada casilla de un cuadro simulando el microplato.

b) Adicionar 100 ul de metanol a todos los micropozos con la ayuda de una pipeta de 8 canales, dejar reposar por unos 20 minutos.

Este paso se realiza para matar los nauplios aún vivos, ya que es demasiado difícil contar los nauplios que estan vivos por la rapidez de su movimiento.

Contar en todos los pozos el total de nauplios y anotarlos en su respectiva casilla.

2.6.6 .Cálculos de la Concentración Letal Media (LC50)

Sumar el numero de nauplios muertos en los tres pozos de la misma concentración de una misma muestra. Sumar el numero total de nauplios en los tres pozos de la misma concentración de una misma muestra.

Dividir el numero de nauplios muertos entre el numero total de nauplios. El resultado de la division multiplicado por cien es el porcentaje de mortalidad de Artemia salina para esa concentración de la muestra.

Fórmula:

$$\% \text{ de mortalidad de } \underline{\text{Artemia salina}} = \frac{\sum \text{nauplios muertos}}{\sum \text{total de nauplios}} \times 100$$

Se repitió el bioensayo para cada muestra tres veces, para comprobar la repetitividad de los resultados, utilizando el mismo procedimiento con los datos obtenidos.

Los datos obtenidos se introducen en una microcomputadora la cuál estará equipada por un programa llamado "probitis" el cual expresará como la concentración letal media de un experimento en triplicado. También es muy preciso utilizar regresión lineal, graficando el porcentaje de muertos versus el logaritmo de la concentración. Estos datos son los que el programa "probitis" dá directamente.

Capítulo III

RESULTADOS

Y

ANÁLISIS DE RESULTADOS

ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO.

CUADRO No. I

ESPECIE VEGETAL		ORGANO RECOLECTADO	LUGAR DE RECOLECCION
NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN		
<u>Jatropha curcas</u>	Tempate	Hojas y Tallo	LosNaranjos, Sonsonate
<u>Rauwolfia tetraphyla</u>	Amatillo	Hojas	Km 17, Carretera al Puerto de la Libertad.
<u>Annona diversifolia</u>	Anona	Semillas	Mercado Central, San Salvador
<u>Mammea americana</u>	Mamey	Semillas	Mercado Central, San Salvador.
<u>Yucca elephantipes</u>	Izote	Hojas y Tallo	Los Naranjos Sonsonate

1.1 *Annona diversifolia* (Anona)

RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS REALIZADAS A LA ANONA EN DIFERENTES SOLVENTES.

Cuadro N° 2

PRUEBA SOLVENTE	SESQUITERPENLACTONAS			RESULTADOS
	LEGAL	BALJET	HIDROXILAMINA	
n-Hexano	+	+	+	Positivo
Diclorometano	+	+	+	Positivo
Cloroformo	+	+	+	Positivo
Acetato de Etilo	+	+	+	Positivo
Metanol	+	+	+	Positivo

Cuadro N° 3

PRUEBA SOLVENTE	ALCALOIDES			RESULTADOS
	WAGNER	MEYER	DRAGENDORFF	
n-Hexano	+	+	+	Positivo
Diclorometano	-	-	-	Negativo
Cloroformo	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	+	+	+	Positivo
Metanol	+	+	+	Positivo

RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS REALIZADAS A LA ANONA EN DIFERENTES SOLVENTES.

Cuadro N° 4

PRUEBA SOLVENTE	FLAVONOIDES		ANTRAQUINONAS	
	SHINODA	RESULTADOS	BORNTRAGER	RESULTADOS
n-Hexano	-	Negativo	-	Negativo
Diclorometano	-	Negativo	-	Negativo
Cloroformo	-	Negativo	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	Negativo	-	Negativo
Metanol	-	Negativo	-	Negativo

Cuadro N° 5

PRUEBA SOLVENTE	TANINOS				
	FeCl ₃	SUBACETATO DE PLOMO	GELATINA	QUININA	RESULTADOS
n-Hexano	-	-	-	-	Negativo
Diclorometano	+	-	+	+	Positivo
Cloroformo	+	+	+	+	Negativo
Acetato de Etilo	+	+	+	+	Negativo
Metanol	+	+	+	+	Positivo

RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS REALIZADAS A LA ANONA EN DIFERENTES SOLVENTES.

Cuadro N° 6

PRUEBA SOLVENTE	SAPONINAS			
	LIEBERMAN BUCHARD	SALKOWSKI	PBA. DE ESPUMA	RESULTADOS
n-Hexano	+	+	+	Positivo
Diclorometano	+	+	+	Positivo
Cloroformo	+	+	+	Positivo
Acetato de Etilo	+	+	+	Positivo
Metanol	+	+	+	Positivo

Cuadro N° 7

PRUEBA SOLVENTE	CARDIOTONICOS				
	KEDDE	LEGAL	KÉLLER KELLIANI	LIEBERMAN BUCHARD	RESULTADOS
n-Hexano	-	-	-	-	Negativo
Diclorometano	-	-	-	-	Negativo
Cloroformo	-	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-	-	Negativo
Metanol	-	-	-	-	Negativo

CUADRO RESUMEN DE COMPONENTES QUÍMICOS IDENTIFICADOS EN LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO DE Annona diversifolia.

Cuadro N° 8

ANONA	
n- Hexano	Alcaloides, Sesquiterpenlactonas, Saponinas.
Diclorometano	Sesquiterpenlactonas, Taninos, Saponinas.
Cloroformo	Taninos, Sesquiterpenlactonas, Saponinas.
Acetato de Etilo	Taninos, Alcaloides, Sesquiterpenlactonas, Saponinas.
Metanol	Sesquiterpenlactonas, Taninos, Alcaloides, Saponinas.

Resumen de los porcentajes de mortalidad promedio de Anona diversifolia (Anona).

Cuadro No. 9.

Concentraciones (Ug/ml)	2 PORCENTAJE DE MORTALIDAD PROMEDIO				
	<i>Anona diversifolia</i> (Anona)				
	n-hexano	Diclorometano	Cloroformo	Acetato de etilo	Metanol
500	100	100	100	100	100
250	100	100	100	100	100
125	100	100	100	100	100
62.5	100	100	100	93.3	100
31.25	100	100	100	86.66	100
15.62	100	100	100	86.66	100
7.81	93.33	96.66	93.33	76.66	100
3.91	83.33	93.3	86.66	60.0	100

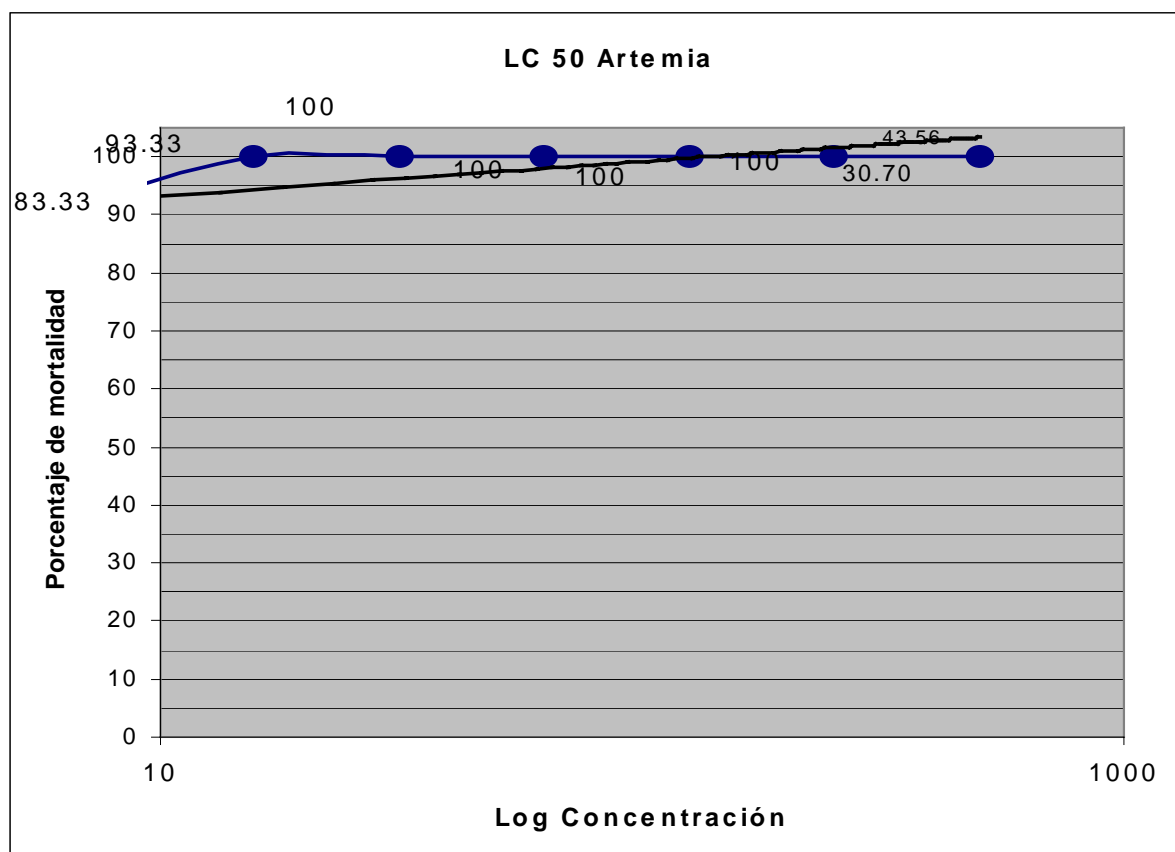
Después de haber realizado el fraccionamiento y eliminado el disolvente , se procedió a efectuar el bioensayo con Artemia salina , obteniéndose el porcentaje de mortalidad debido a los metabolitos que fueron arrastrados y que se encontraban presentes en la fracción del extracto de acuerdo a la polaridad y afinidad que mostraban con el disolvente, obteniéndose para cada caso los resultados arriba mostrados dependiendo de la concentración del extracto.

Calculos de LC50 Para Artemia salina
Anona diversifolia
(anona en n-hexano)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	100	2.096910013
62.5	100	1.795880017
31.25	100	1.494850022
15.62	100	1.19368103
7.81	93.33	0.892651034
3.9	83.33	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
No valor numerico	No valor numerico	No valor numerico

Grafica No.1



* No se obtuvo valor numérico para "r" (coeficiente de correlación al igual que para la LC50, debido a que el método utilizado es aplicable cuando una concentración produce la muerte a la mitad de la población y no al 100% como en este caso.

Calculos

de LC50 Para Artemia salina

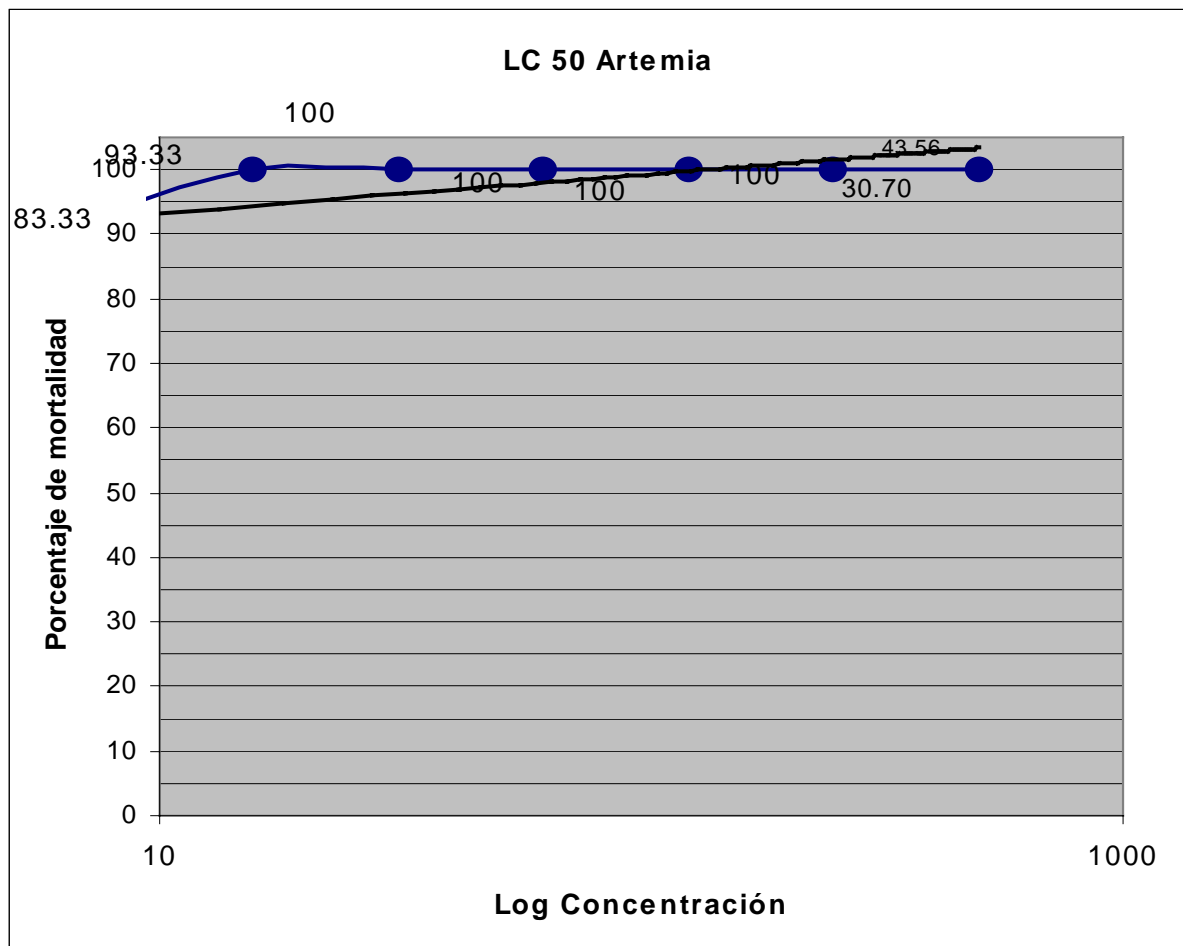
Anona diversifolia

(anona en diclorometano)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	100	2.096910013
62.5	100	1.795880017
31.25	100	1.494850022
15.62	100	1.19368103
7.81	96.66	0.892651034
3.9	93.33	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
No valor numerico	No valor numerico	No valor numerico

Grafica No.2



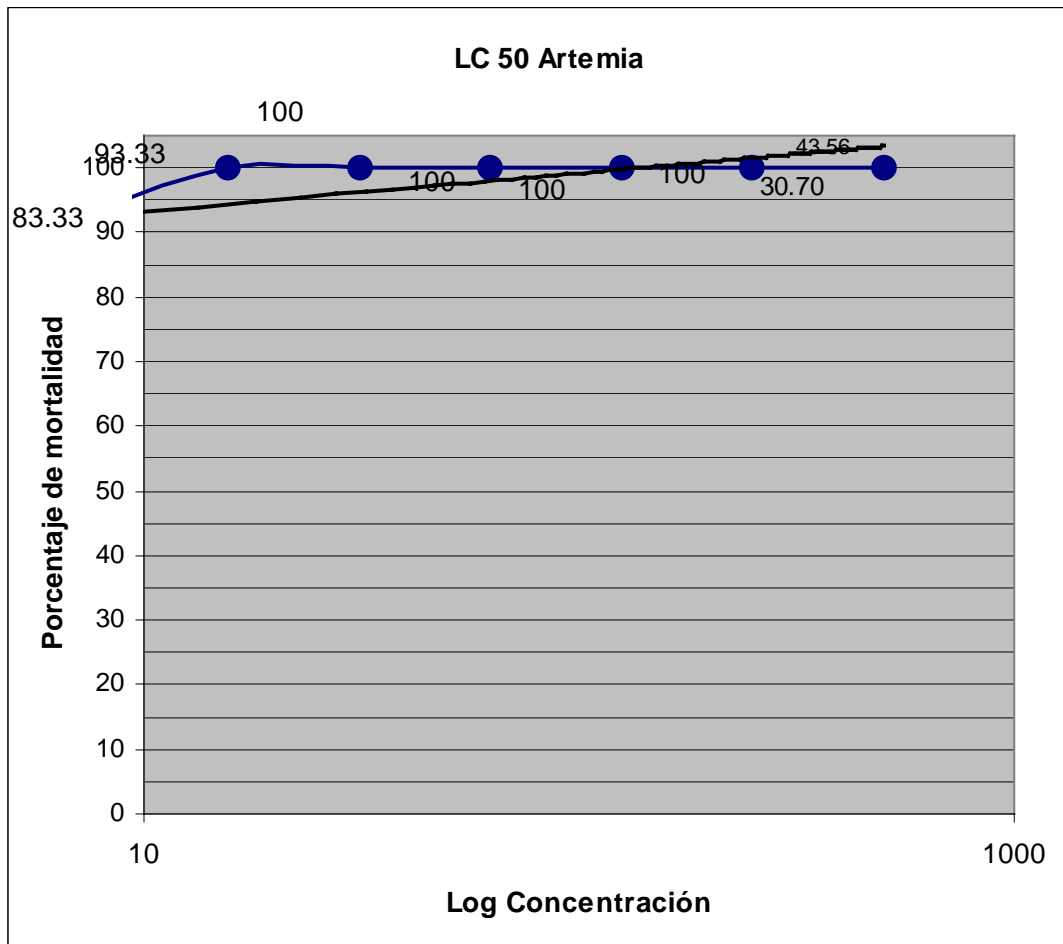
* No se obtuvo valor número para "r" (coeficiente de correlación al igual que para la LC50, debido a que el método utilizado es aplicable cuando una concentración produce la muerte a la mitad de la población y no al 100% como en este caso.

Calculos de LC50 Para Artemia salina
Anona diversifolia
(anona en cloroformo)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	100	2.096910013
62.5	100	1.795880017
31.25	100	1.494850022
15.62	100	1.19368103
7.81	93.33	0.892651034
3.9	86.66	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
No valor numerico	No valor numerico	No valor numerico

Grafica No.3*



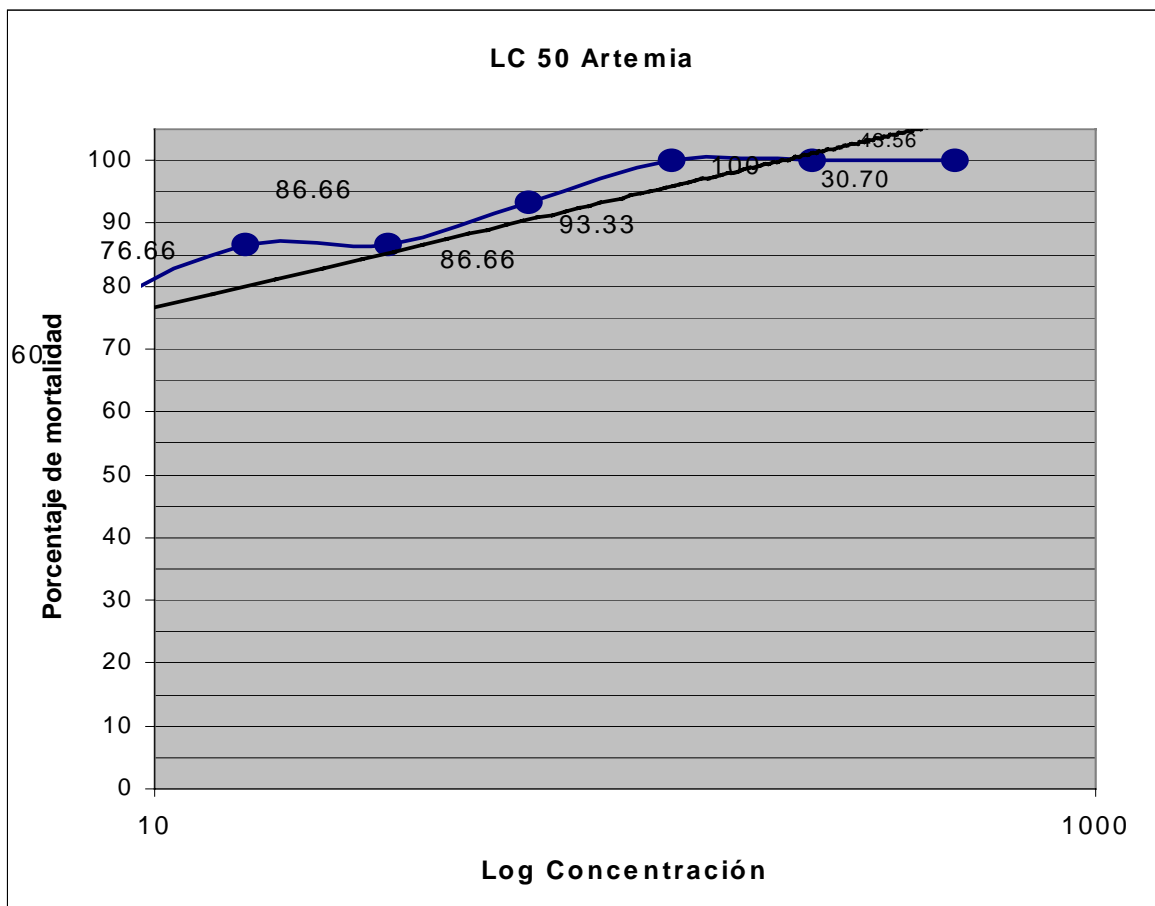
No se obtuvo valor número para "r" (coeficiente de correlación al igual que para la LC50, debido a que el método utilizado es aplicable cuando una concentración produce la muerte a la mitad de la población y no al 100% como en este caso.

Calculos de LC50 Para Artemia salina
 Anona diversifolia
(anona en acetato de etilo)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	100	2.096910013
62.5	93.33	1.795880017
31.25	86.66	1.494850022
15.62	86.66	1.19368103
7.81	76.66	0.892651034
3.9	60	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.774596669	-2.11525333	0.00766914

Grafica No.4

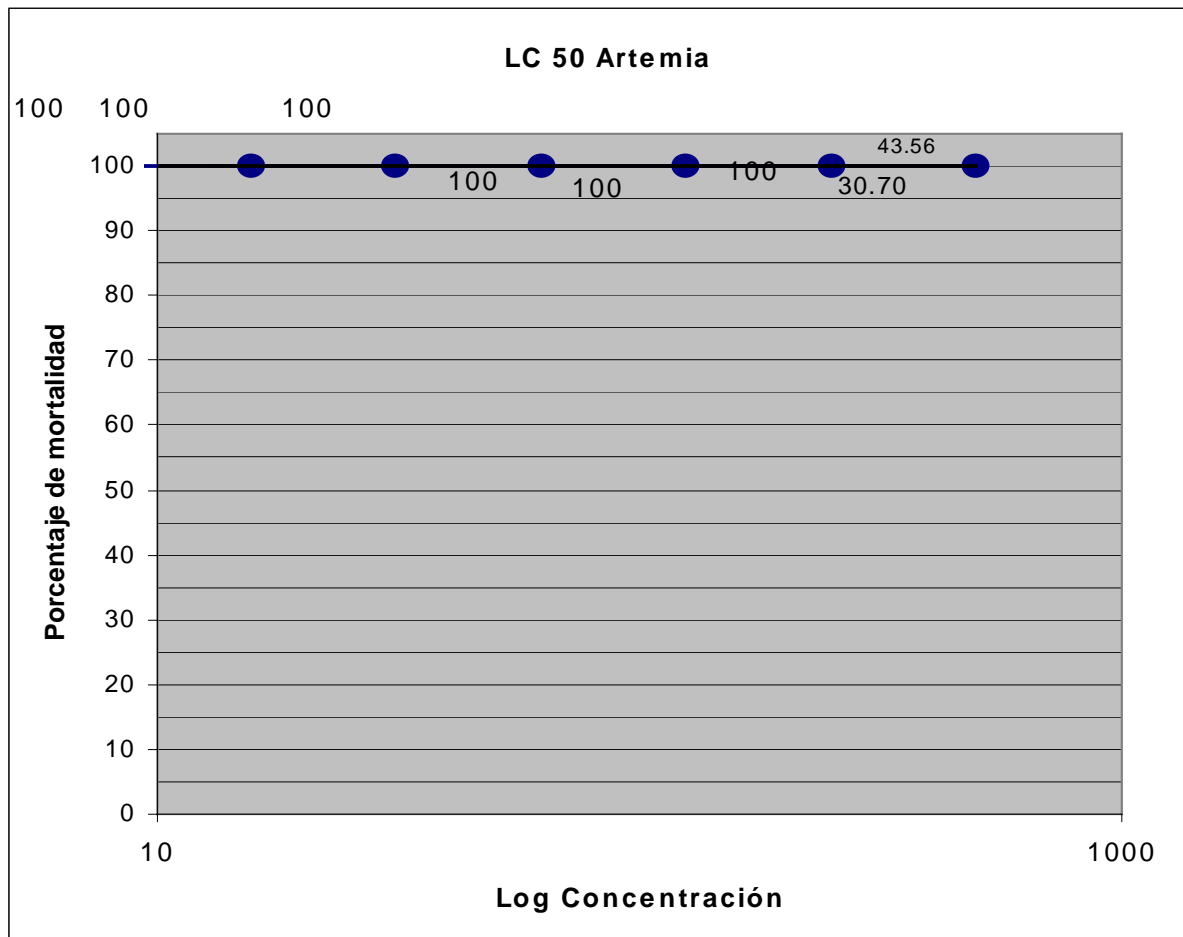


Calculos de LC50 Para Artemia salina
Anona diversifolia
(anona en metanol)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	100	2.096910013
62.5	100	1.795880017
31.25	100	1.494850022
15.62	100	1.19368103
7.81	100	0.892651034
3.9	100	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
No valor numerico	No valor numerico	No valor numerico

Grafica No. 5



*No se obtuvo un valor numerico para "r" (coeficiente de correlación), al igual que para LC50, debido a que el método utilizado es aplicable cuando una concentración produce la muerte a la mitad de la población y no el 100% como este caso.

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS DE
Annona diversifolia.
(Anona)

De acuerdo a resultados obtenidos previamente del extracto bruto de anona, este mostró una concentración letal media (LC50) alta de citotoxicidad contra Artemia salina. Con este antecedente se procedió a efectuar el fraccionamiento de los extractos para encontrar la fracción activa del extracto.-

Luego de efectuar el bioensayo con cada uno de ellos (estos se realizó también con las otras cuatro plantas) , según se observa en el cuadro No.9 las fracciones de n-hexano , diclorometano y cloroformo mostraron similitud en el ensayo ya que a concentraciones de 15.62 Ug/ml murieron el 100% de nauplios , en la de acetato de etilo fue hasta 125 Ug/ml que se logró el 100% de mortalidad y en metanos mostró 100% de mortalidad a todas las concentraciones siendo esta la más activa que las anteriores.

Cada una de las fracciones presenta una polaridad diferente y de acuerdo a la afinidad de polaridad con los componentes químicos así serán los metabolitos secundarios presentes en cada fracción.

Según el cuadro resumen No. 8 del análisis fitoquímico preliminar se puede observar que los metabolitos secundarios presentes son : Alcaloides, sesquiterpenlactonas, saponinas, taninos ; encontrándose en casi todas las fracciones.

En la fracción de diclorometano se identificaron sesquiterpenlactonas taninos y saponinas, los cuales podrían ser los responsables de la actividad mostrada ante Artemia salina.

En las fracciones de n-hexano - cloroformo y acetato de etilo no se identificaron metabolitos secundarios, pero en n-hexano y cloroformo mostraron mortalidad del 100% de 15.62 Ug/ml y en acetato de etilo a 125 Ug/ml.

La fracción metanolica es la mayor polaridad considerándose que sus componentes químicos también son polares y en esta fracción es donde se obtuvo la mayor mortalidad del 100% a todas las concentraciones ensayadas por lo que se considera la más activa. Aquí se identificaron sesquiterpenlactonas y taninos, a quienes se les considera ser los responsables de dicha actividad.-

Según las gráficas solo la fracción de acetato de etilo mostro dato de LC50 el cual se encuentra muy abajo de los 1000 ug/ml, por lo que se considera también activo.

1.2. Rauwolfia tetraphyla (Amatillo)

RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS REALIZADAS A LAS FRACCIONES DE AMATILLO EN DIFERENTES DISOLVENTES .

Cuadro N° 10

PRUEBA SOLVENTE	SESQUITERPENLACTONAS			RESULTADOS
	LEGAL	BALJET	HIDROXILAMINA	
n-Hexano	-	-	+	Negativo
Diclorometano	+	+	+	Positivo
Cloroformo	+	+	+	Positivo
Acetato de Etilo	+	+	+	Positivo
Metanol	+	+	+	Positivo

Cuadro N° 11

PRUEBA SOLVENTE	ALCALOIDES			RESULTADOS
	WAGNER	MEYER	DRAGENDORF	
n-Hexano	-	-	-	Negativo
Diclorometano	+	+	+	Positivo
Cloroformo	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	+	+	+	Positivo
Metanol	-	-	-	Negativo

RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS REALIZADAS A LAS FRACCIONES DE AMATILLO EN DIFERENTES DISOLVENTES.

Cuadro N° 12

PRUEBAS SOLVENTE	FLAVONOIDES		ANTRAQUINONAS	
	SHINODA	RESULTADOS	BORNTRAGER	RESULTADOS
n-Hexano	-	Negativo	-	Negativo
Diclorometano	-	Negativo	-	Negativo
Cloroformo	-	Negativo	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	Negativo	-	Negativo
Metanol	-	Negativo	-	Negativo

Cuadro N° 13

PRUEBA SOLVENTE	TANINOS				
	FeCl ₃	SUBACETATO DE PLOMO	GELATINA	QUININA	RESULTADOS
n-Hexano	-	-	-	-	Negativo
Diclorometano	+	-	-	-	Negativo
Cloroformo	-	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-	-	Negativo
Metanol	+	+	+	+	Positivo

RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS REALIZADAS A LAS FRACCIONES DE AMATILLO EN DIFERENTES DISOLVENTES .

Cuadro N° 14

PRUEBA SOLVENTE	SAPONINAS			
	LIEBERMAN BUCHARD	SALKOWSKI	PRUEBA DE ESPUMA	RESULTADOS
n-Hexano	-	-	-	Negativo
Diclorometano	-	-	-	Negativo
Cloroformo	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-	Negativo
Metanol	-	-	-	Negativo

Cuadro N° 15

PRUEBA SOLVENTE	GLICOSIDOS CARDIOTONICOS				
	KEDDE	LEGAL	KÉLLER KELLIANI	LIEBERMAN BUCHARD	RESULTADOS
n-Hexano	-	-	-	-	Negativo
Diclorometano	-	-	-	-	Negativo
Cloroformo	-	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-	-	Negativo
Metanol	-	-	-	-	Negativo

CUADRO RESUMEN DE COMPONENTES QUÍMICOS IDENTIFICADOS EN LAS
FRACCIONES DE EXTRACTO DE Rauwolfia tetraphylla.

Cuadro N° 16

AMATILLO	
n-Hexano	No se logró identificar ningún metabolito secundario.
Diclorometano	Sesquiterpenlactonas, Alcaloides.
Cloroformo	Sesquiterpenlactonas.
Acetato de Etilo	Sesquiterpenlactonas , Alcaloides.
Metanol	Sesquiterpenlactonas, Taninos.

Resumen de los porcentajes de mortalidad promedio de *Rauwolfia tetraphila* (Amatillo).

Cuadro No. 17

Concentraciones (Ug/ml)	PORCENTAJE DE MORTALIDAD PROMEDIO				
	<i>Rauwolfia tetraphila</i> (Amatillo)				
	n-hexano	Diclorometano	Cloroformo	Acetato de etilo	Metanol
500	100	100	83.33	100	100
250	100	100	68.33	100	100
125	100	86.66	68.33	100	100
62.5	100	75.0	58.33	100	100
31.25	95.0	66.66	55.0	100	100
15.62	81.66	60.0	51.66	100	91.66
7.81	65.0	48.33	46.66	68.33	68.33
3.9	55.0	45.0	45.0	66.66	56.66

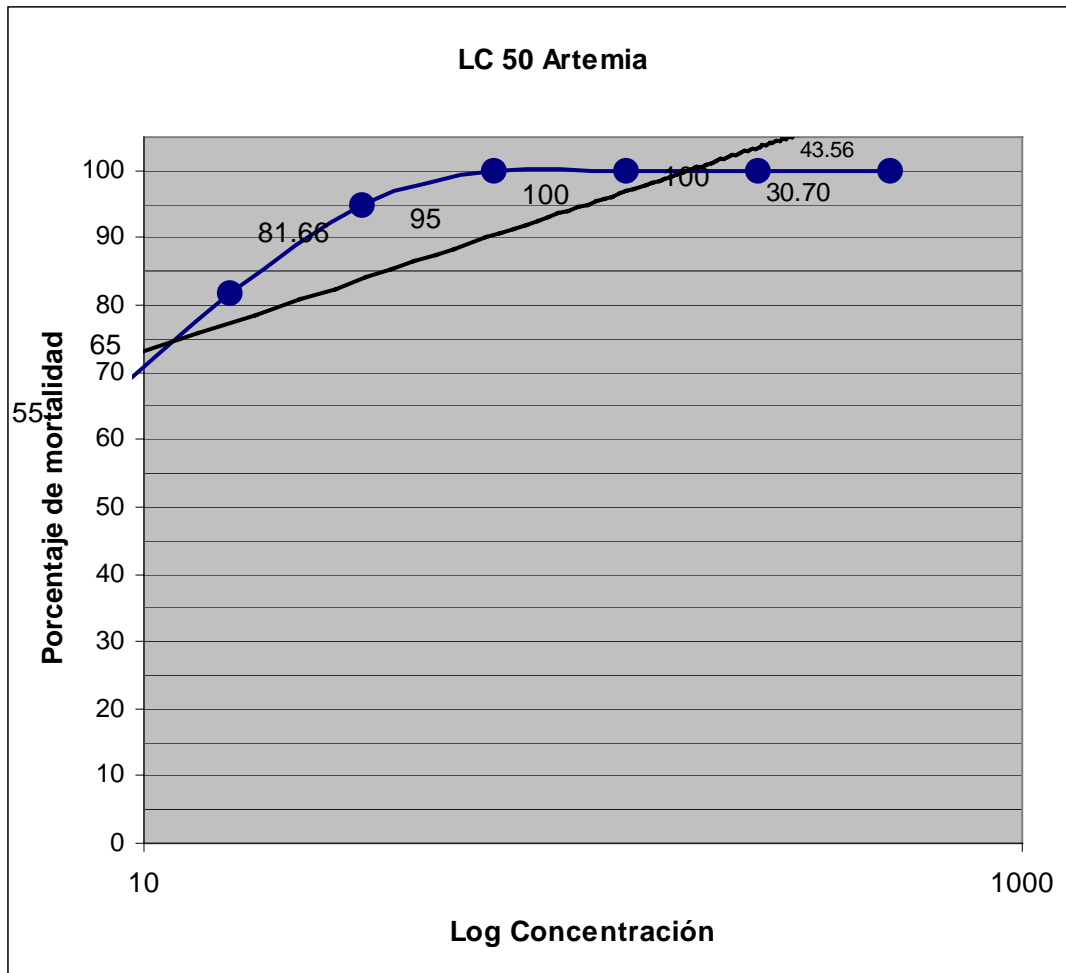
Después de haber realizado el fraccionamiento y eliminado el disolvente , se procedió a efectuar el bioensayo con *Artemia salina* , obteniéndose el porcentaje de mortalidad debido a los metabolitos que fueron arrastrados y que se encontraban presentes en la fracción del extracto de acuerdo a la polaridad y afinidad que mostraban con el disolvente, obteniéndose para cada caso los resultados arriba mostrados dependiendo de la concentración del extracto.

**Calculos de LC50 Para Artemia salina
Raewolfia tetraphila
(Amatillo en n-hexano)**

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	100	2.096910013
62.5	100	1.795880017
31.25	95	1.494850022
15.62	81.66	1.19368103
7.81	65	0.892651034
3.9	55	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
No tiene valor numerico	No tiene valor numerico	No tiene valor numerico

Gráfica No. 6



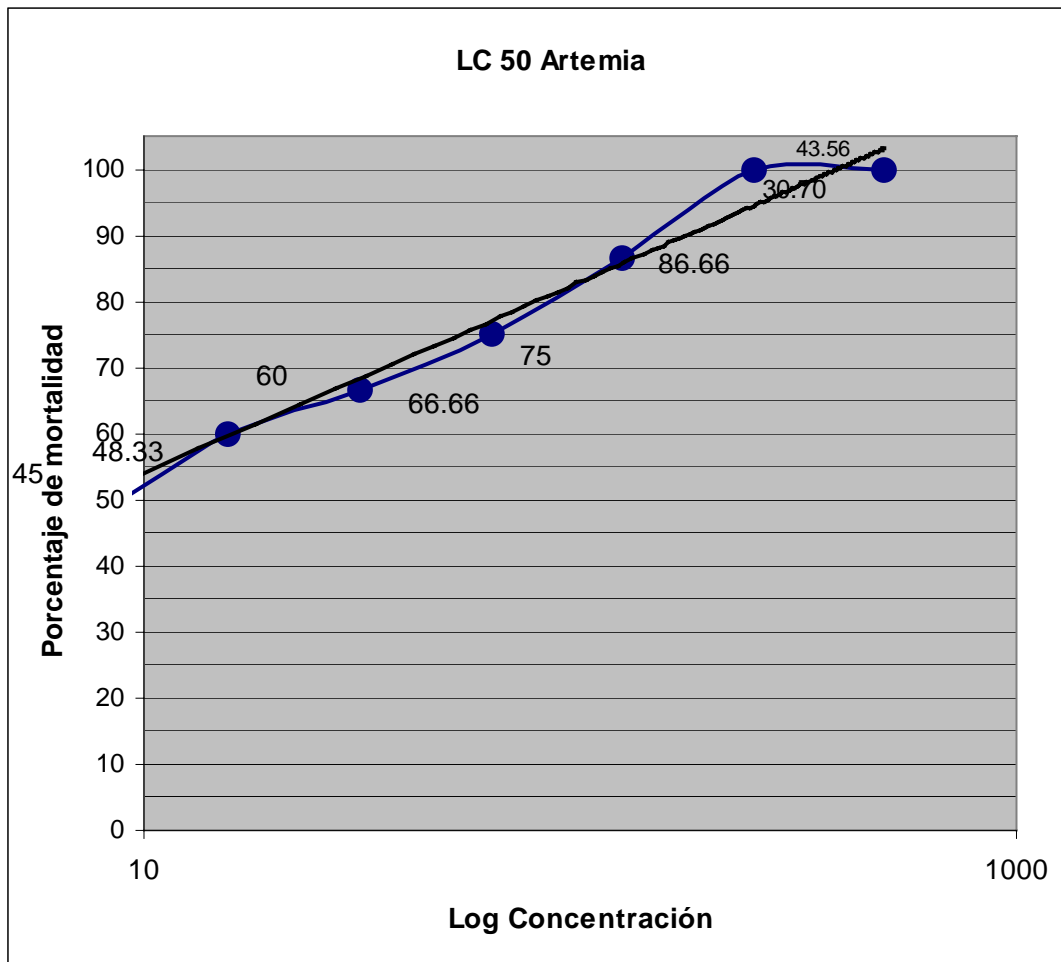
*No se obtuvo valor numerico para "r" (coeficiente de correlación al igual que para la LC50, debido a que el método utilizado es aplicable cuando una concentración produce la muerte a la mitad de la población y no al 100% como en este caso

**Calculos de LC50 Para Artemia salina
Raewolfia tetraphila
(Amatillo en diclorometano)**

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	86.66	2.096910013
62.5	75	1.795880017
31.25	66.66	1.494850022
15.62	60	1.19368103
7.81	48.33	0.892651034
3.9	45	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.94659656	1.013397606	10.31329893

Gráfica No. 7

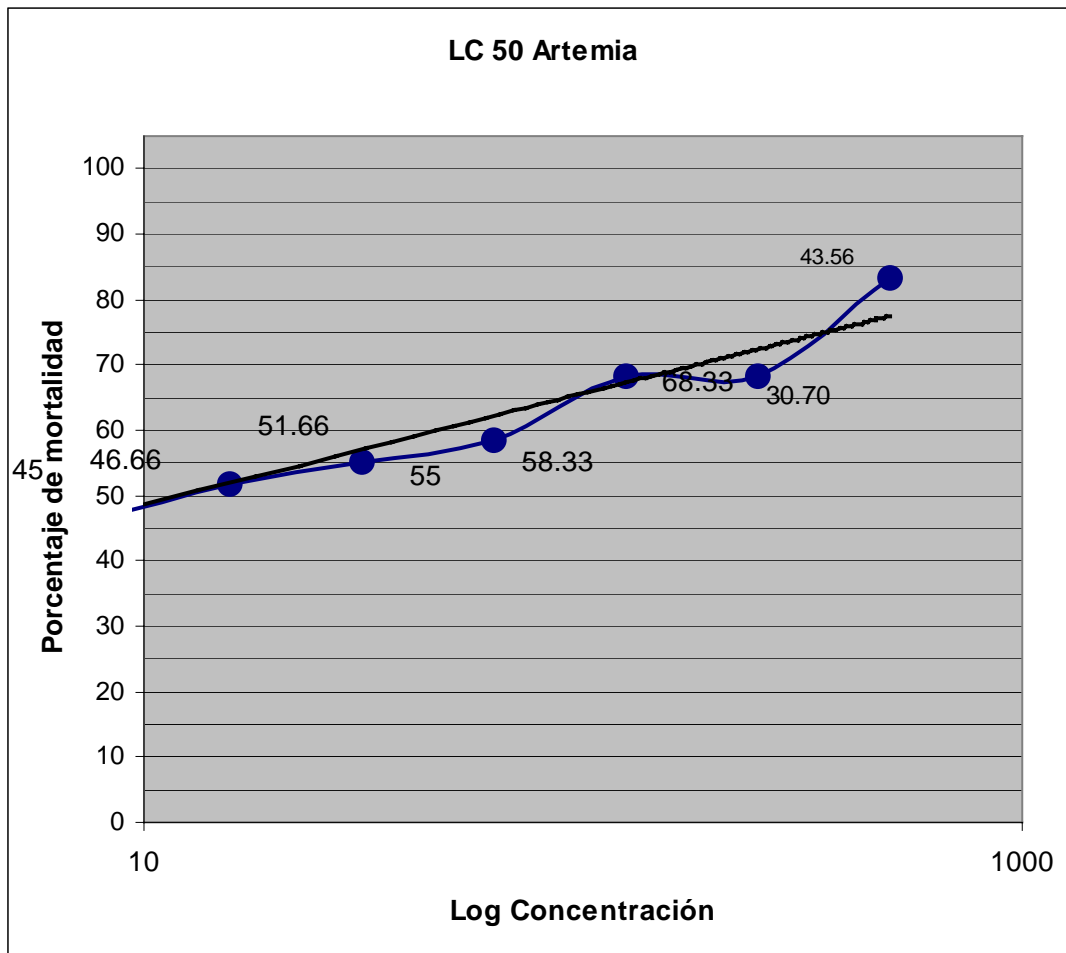


Calculos de LC50 Para Artemia salina
 Rauewolfia tetrphila
 (Amatillo en Cloroformo)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	83.33	2.698970004
250	68.33	2.397940009
125	68.33	2.096910013
62.5	58.33	1.795880017
31.25	55	1.494850022
15.62	51.66	1.19368103
7.81	46.66	0.892651034
3.9	45	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.939336437	1.553993562	35.80911287

Gráfica No. 8

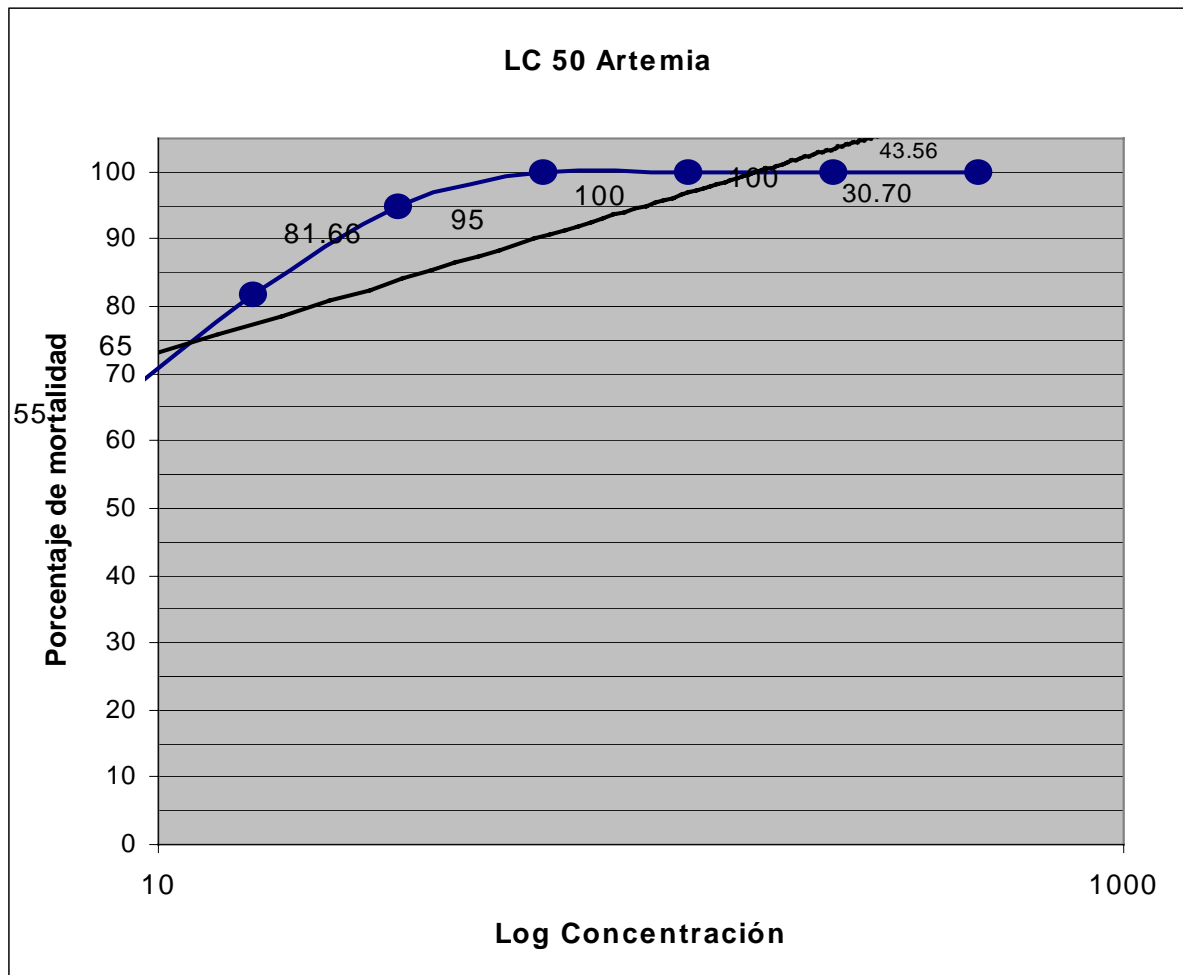


**Calculos de LC50 Para Artemia salina
Raewolfia tetraphila
(Amatillo en Acetato de etilo)**

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	100	2.096910013
62.5	100	1.795880017
31.25	100	1.494850022
15.62	100	1.19368103
7.81	68.33	0.892651034
3.9	66.66	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
No valor numerico	No valor numerico	No valor numerico

Gráfica No. 9

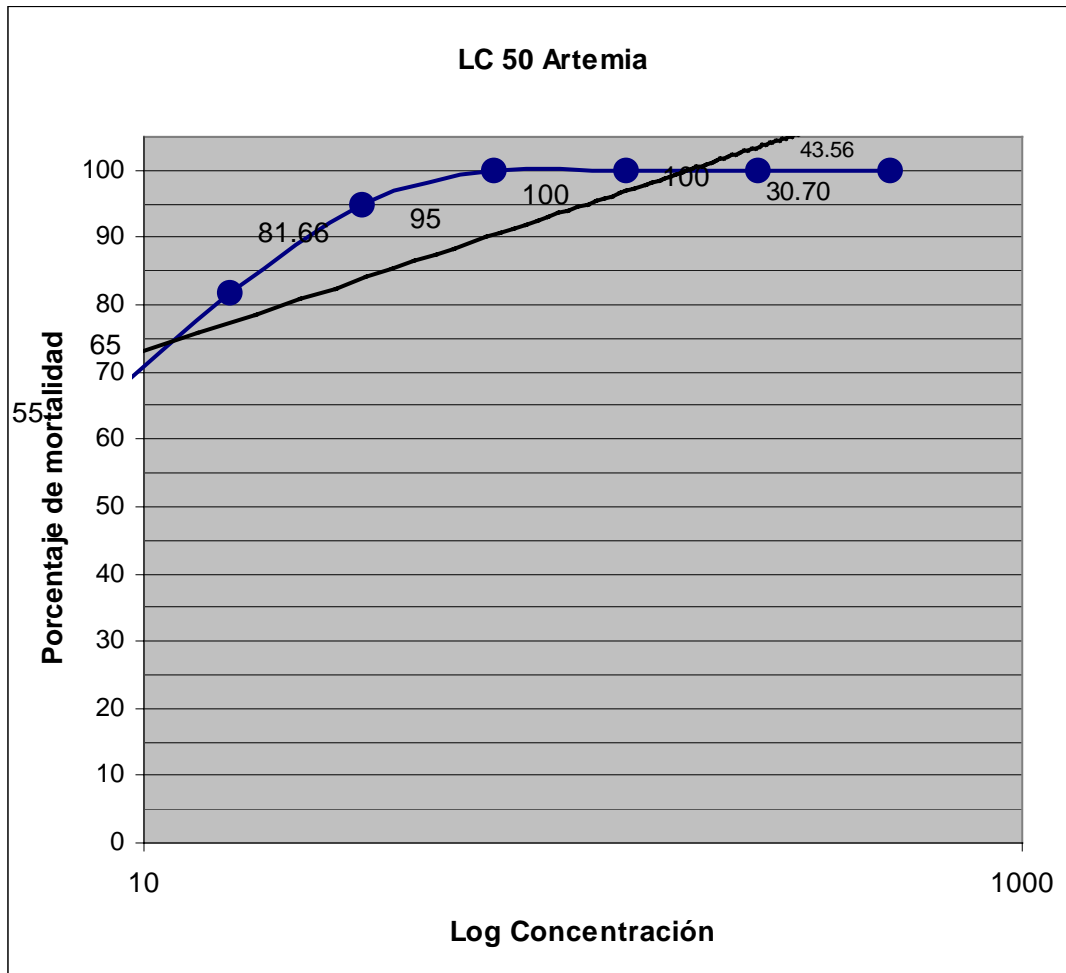


*No se obtuvo valor numerico para "r" (coeficiente de correlación al igual que para la LC50, debido a que el método utilizado es aplicable cuando una concentración produce la muerte a la mitad de la población y no al 100% como en este caso

**Calculos de LC50 Para Artemia salina
Raewolfia tetraphila
(Amatillo en Metanol)**

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	100	2.096910013
62.5	100	1.795880017
31.25	100	1.494850022
15.62	91.66	1.19368103
7.81	68.33	0.892651034
3.9	56.66	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
No valor numerico	No valor numerico	No valor numerico



*No se obtuvo valor numérico para "r" (coeficiente de correlación al igual que para la LC50, debido a que el método utilizado es aplicable cuando una concentración produce la muerte a la mitad de la población y no al 100% como en este caso

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS DE *Rauwolfia tetraphyla*. (Amatillo)

Según el cuadro No. 17, la mortalidad de *Artemia salina* se observa mayor en el acetato de etilo, seguido del metanol, n-hexano - diclorometano y cloroformo (de mayor a menor) respectivamente.-

El acetato de etilo mostró actividad en un 100% de mortalidad a 15.62 Ug/ml en tanto que el cloroformo ni a 500 Ug/ml las mató en un 100%.

En la fracción de n-hexano no se pudo identificar ningún metabolito secundario, por lo que es necesario utilizar otros medios de identificación fitoquímica, sin embargo mostró actividad citotóxica, ya que al observar el gráfico 6 el programa no dio dato para LC₅₀ y esto se justifica porque la fracción n-hexano mató a todas las Artemias salinas en un 100% a una concentración de 62.5 Ug/ml.

En el caso de diclorometano mostró mortalidad para Artemia salina en un 100% a la concentración de 250 Ug/ml (cuadro 17) dando un valor de LC₅₀ de 10.3132 pero aun así mostró toxicidad pues éste valor es menor que 1000 (Todos los valores de LC₅₀ menor de 1000 presentan citotoxicidad según el protocolo del bioensayo), esta fracción contenía sesquiterpenlactonas, quienes posiblemente estén dando dicha actividad.

En la fracción cloroformica también se identifico sesquiterpenlactonas, y a pesar que no mato en un 100% a ninguna concentración , el valor mostrado de LC₅₀ a 35.809 indica citotoxicidad .

En la fracción de acetato de etilo se identificó sesquiterpenlactonas y alcaloides y en la fracción metanolica sesquiterpenlactonas y taninos, en ambas fracciones que fueron las que mayor mortalidad hicieron al observar los gráficos 9 y 10, el programa no indica valores del LC₅₀ pues la mortalidad a 100% se efectuó a concentraciones bien bajas.-

Según bibliografía el amatillo es una planta muy tóxica y no se utiliza medicinalmente por vía interna, sin embargo debe de continuarse con los estudios de citotoxicidad.

1.3. *Mammea americana* (Mamey)

RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS REALIZADAS AL MAMEY EN DIFERENTES SOLVENTES.

Cuadro N° 18

PRUEBA SOLVENTE	SESQUITERPENLACTONAS			RESULTADOS
	LEGAL	BALJET	HIDROXILAMINA	
n-Hexano	-	-	-	Negativo
Diclorometano	+	+	+	Positivo
Cloroformo	+	+	+	Positivo
Acetato de Etilo	-	-	-	Negativo
Metanol	+	+	+	Positivo

Cuadro N° 19

PRUEBA SOLVENTE	ALCALOIDES			RESULTADOS
	WAGNER	MEYER	DRAGENDORFF	
n-Hexano	-	-	-	Negativo
Diclorometano	-	-	-	Negativo
Cloroformo	+	+	+	Positivo
Acetato de Etilo	-	-	-	Negativo
Metanol	-	-	-	Negativo

RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS REALIZADAS AL MAMEY EN DIFERENTES SOLVENTES.

Cuadro N° 20

PRUEBA SOLVENTE	FLAVONOIDES		ANTRAQUINONAS	
	SHINODA	RESULTADOS	BORNTRAGER	RESULTADOS
n-Hexano	-	Negativo	-	Negativo
Diclorometano	-	Negativo	-	Negativo
Cloroformo	-	Negativo	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	Negativo	-	Negativo
Metanol	+	Positivo	-	Negativo

Cuadro N° 21

PRUEBA SOLVENTE	TANINOS				
	FeCl ₃	SUBACETATO DE PLOMO	GELATINA	QUININA	RESULTADOS
n-Hexano	+	+	+	+	Positivo
Diclorometano	+	+	+	+	Positivo
Cloroformo	-	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-	-	Negativo
Metanol	+	+	+	+	Positivo

RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS REALIZADAS AL MAMEY EN DIFERENTES SOLVENTES.

Cuadro N° 22

PRUEBA SOLVENTE	SAPONINAS				RESULTADOS
	LIEBERMAN BUCHARD	SALKOWSKI	PBA . DE ESPUMA		
n-Hexano	-	-	-		Negativo
Diclorometano	-	-	-		Negativo
Cloroformo	-	-	-		Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-		Negativo
Metanol	+	+	+		Positivo

Cuadro N° 23

PRUEBA SOLVENTE	CARDIOTONICOS				RESULTADOS
	KEDDE	LEGAL	KÉLLER KELLIANI	LIEBERMAN BUCHARD	
n-Hexano	-	-	-	-	Negativo
Diclorometano	-	-	-	-	Negativo
Cloroformo	-	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-	-	Negativo
Metanol	-	-	-	-	Negativo

CUADRO RESUMEN DE COMPONENTES QUÍMICOS IDENTIFICADOS EN LAS
FRACCIONES DEL EXTRACTO DE Mammea americana .

Cuadro N° 24

MAMEY	
n-Hexano	Taninos.
Diclorometano	Sesquiterpenlactonas y Taninos.
Cloroformo	Sesquiterpenlactonas y Alcaloides.
Acetato de Etilo	No se logró identificar ningún metabolito secundario.
Metanol	Sesquiterpenlactonas, Flavonoides, Taninos, Saponinas.

Resumen de los porcentajes de mortalidad promedio de *Mammea americana* (Mamey).

Cuadro No. 25

Concentraciones (Ug/ml)	3 PORCENTAJE DE MORTALIDAD PROMEDIO				
	<i>Mammea americana</i> (Mamey)				
	n-hexano	Diclorometano	Clorofor mo	Acetato de etilo	Metanol
500	88.33	100	100	95.0	100
250	68.3	100	100	90.0	100
125	65.0	86.6	100	90.0	100
62.5	53.3	83.0	91.66	90.0	98.33
31.25	53.3	71.66	83.33	86.66	98.33
15.62	48.33	65.0	83.33	70.0	93.33
7.81	41.66	45.0	65.0	58.33	90.0
3.91	40.0	40.0	60.0	46.66	86.6

Después de haber realizado el fraccionamiento y eliminado el disolvente , se procedió a efectuar el bioensayo con *Artemia salina* , obteniéndose el porcentaje de mortalidad debido a los metabolitos que fueron arrastrados y que se encontraban presentes en la fracción del extracto de acuerdo a la polaridad y afinidad que mostraban con el disolvente, obteniéndose para cada caso los resultados arriba mostrados dependiendo de la concentración del extracto.

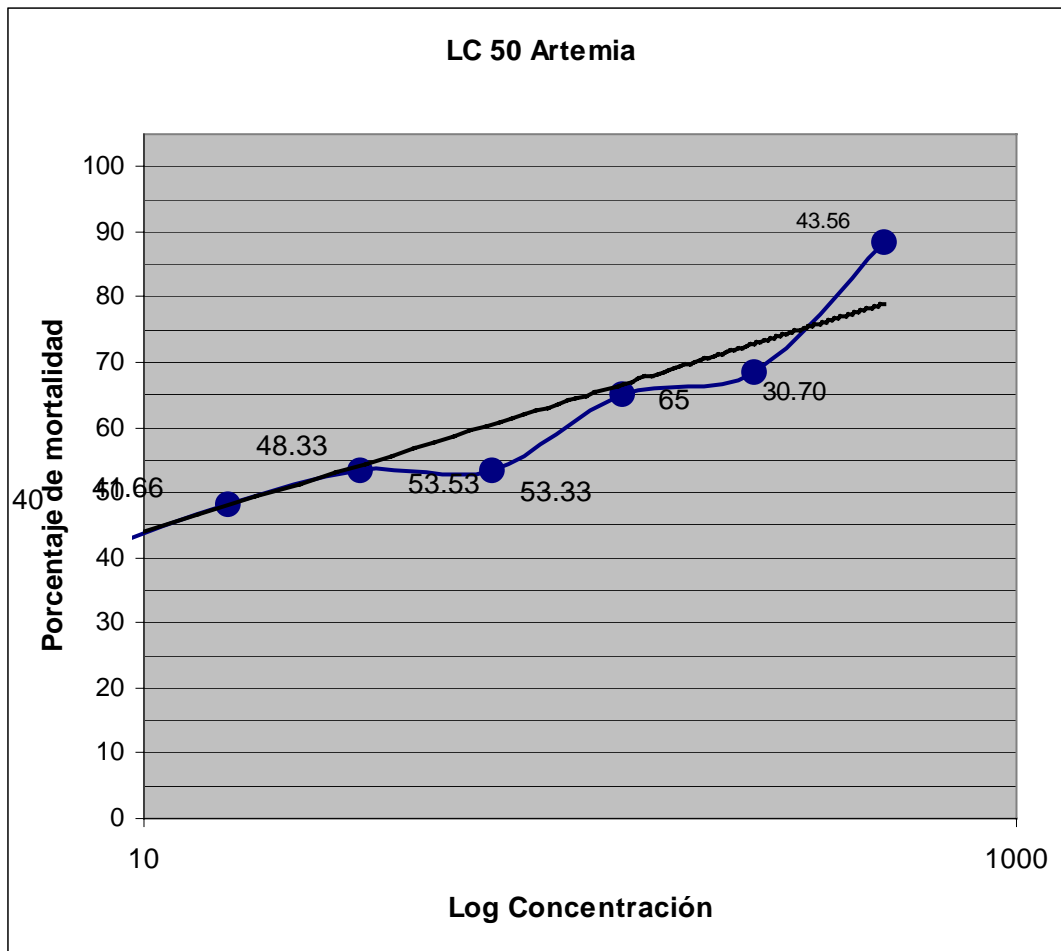
Calculos de LC50 Para Artemia salina

Mammea americana
(Mamey en n-hexano)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	88.33	2.698970004
250	68.33	2.397940009
125	65	2.096910013
62.5	53.33	1.795880017
31.25	53.53	1.494850022
15.62	48.33	1.19368103
7.81	41.66	0.892651034
3.9	40	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.960976982	1.766330544	58.38893371

Gráfica No. 11



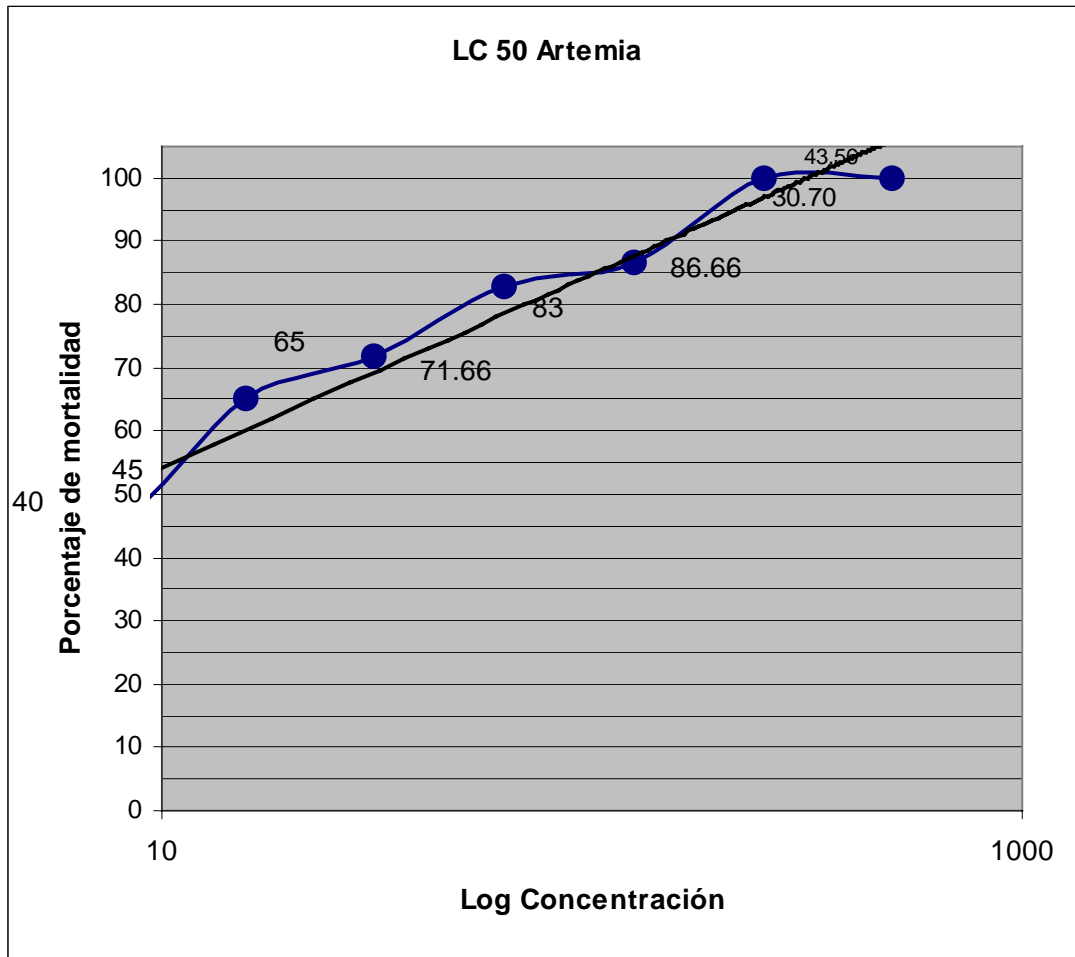
Calculos de LC50 Para Artemia salina

Mammea americana
(Mamey en dicloro metano)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	86.66	2.096910013
62.5	83	1.795880017
31.25	71.66	1.494850022
15.62	65	1.19368103
7.81	45	0.892651034
3.9	40	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.934868931	0.513023508	3.258543389

Gráfica No. 12



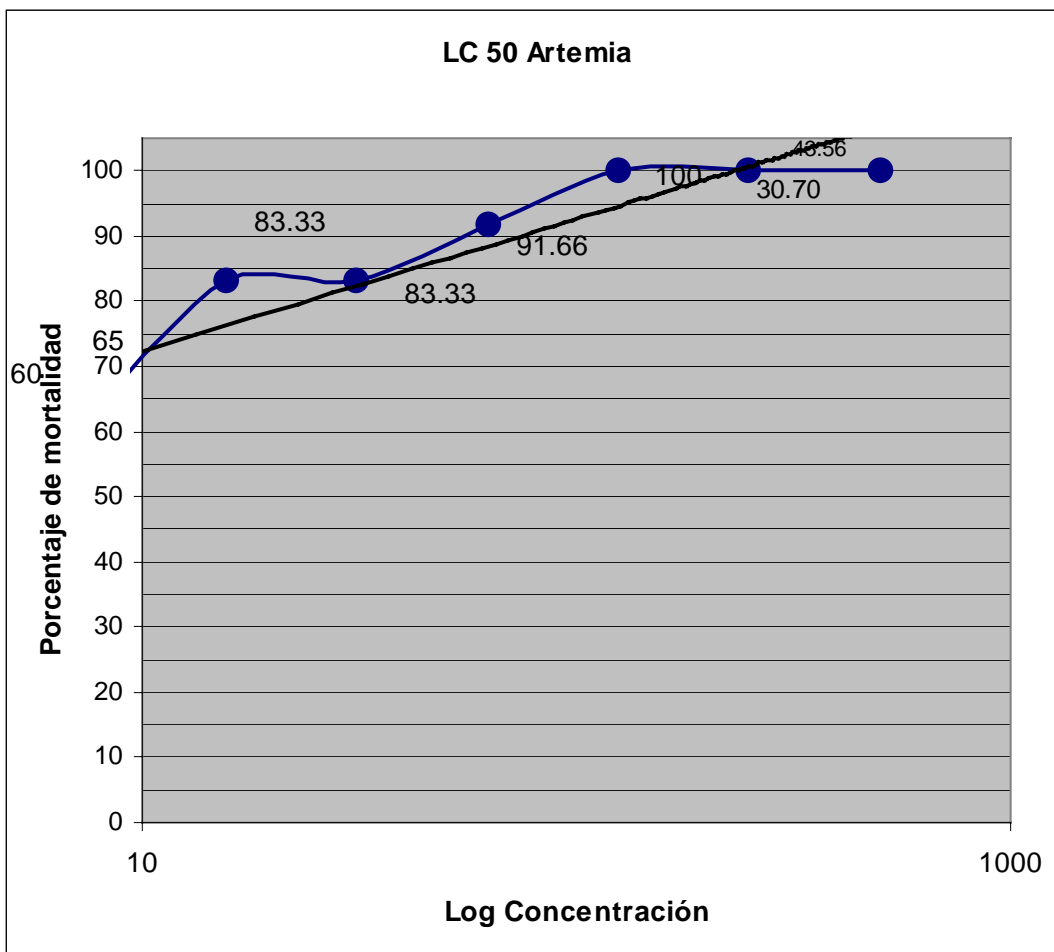
Calculos de LC50 Para Artemia salina

Mammea americana
(Mamey en cloroformo)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	100	2.096910013
62.5	91.66	1.795880017
31.25	83.33	1.494850022
15.62	83.33	1.19368103
7.81	65	0.892651034
3.9	60	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.774596669	-1.211532361	0.061442325

Gráfica No. 13



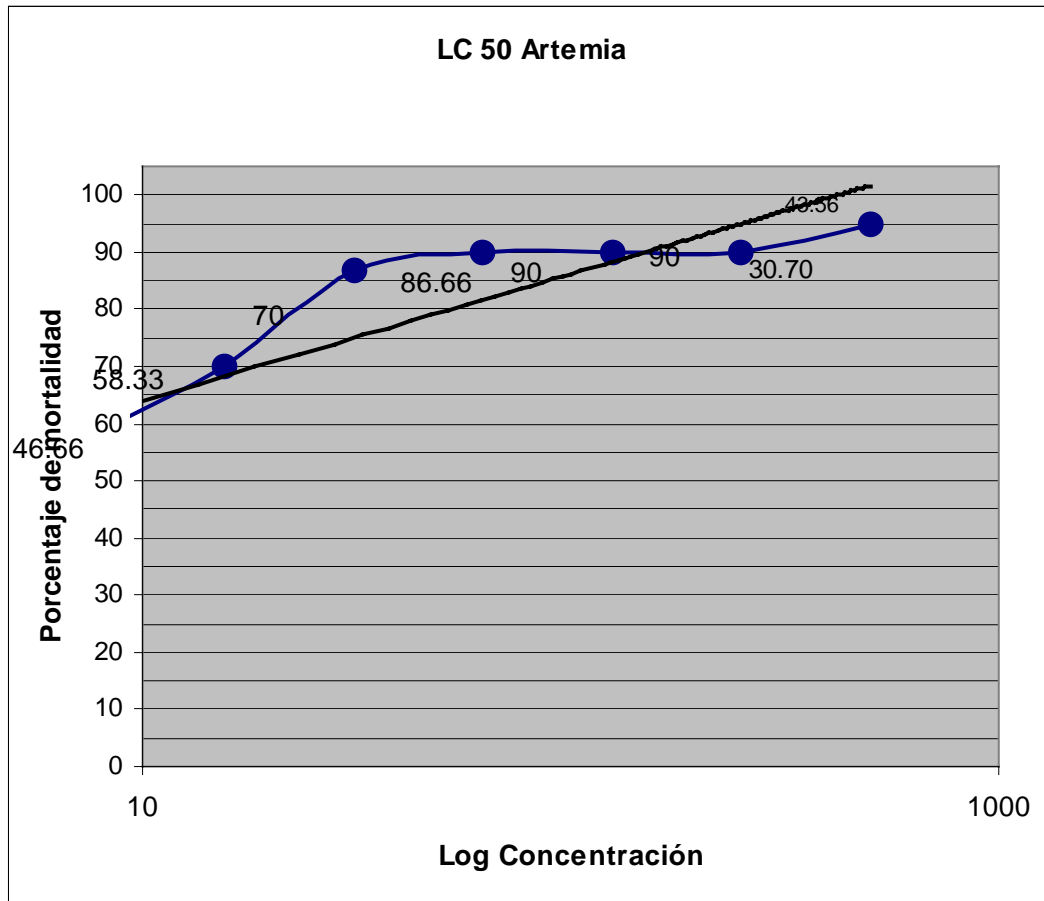
Calculos de LC50 Para Artemia salina

Mammea americana
(Mamey en acetato de etilo)

500	95	2.698970004
250	90	2.397940009
125	90	2.096910013
62.5	90	1.795880017
31.25	86.66	1.494850022
15.62	70	1.19368103
7.81	58.33	0.892651034
3.9	46.66	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.774596669	-2.719569918	0.001907349

Gráfica No.14



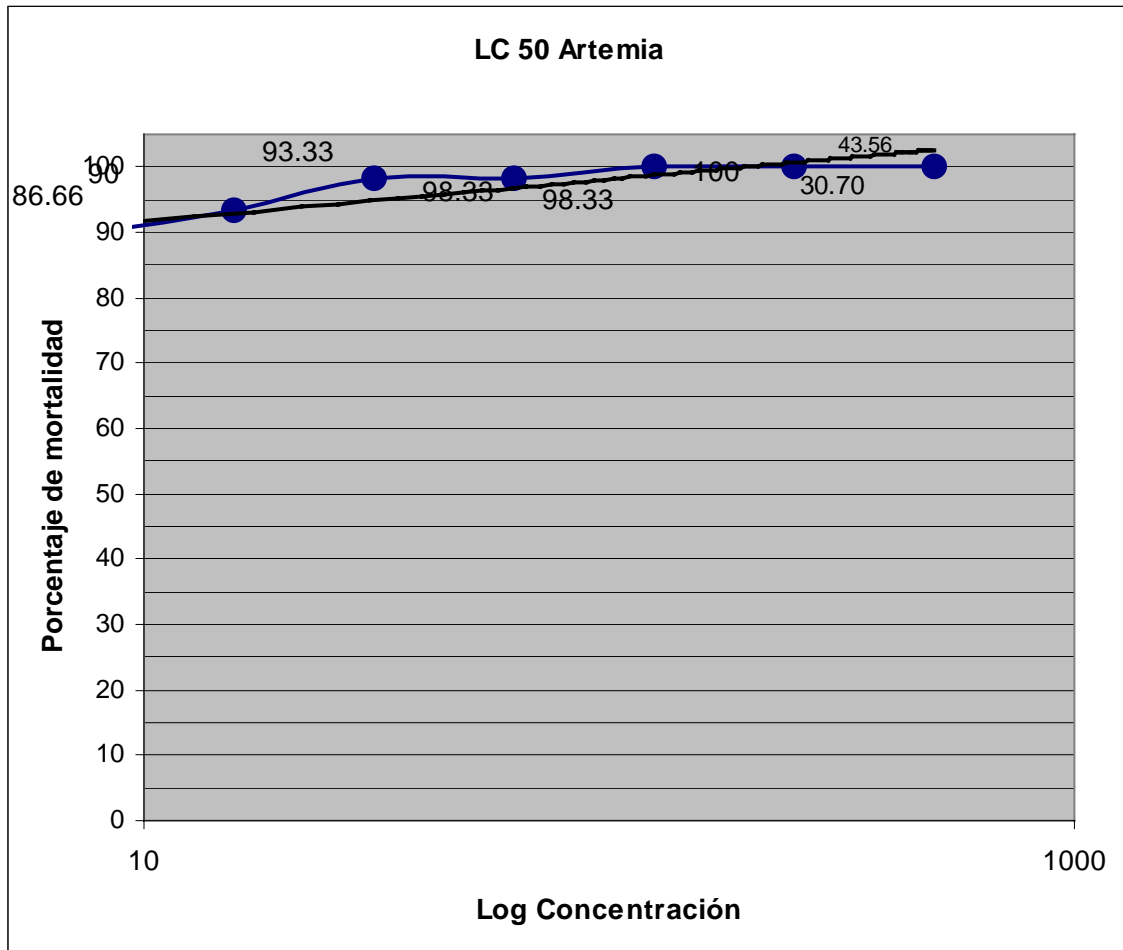
Calculos de LC50 Para Artemia salina

Mammea americana
(Mamey en metanol)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	100	2.096910013
62.5	98.33	1.795880017
31.25	98.33	1.494850022
15.62	93.33	1.19368103
7.81	90	0.892651034
3.9	86.66	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.774596669	-15.62780823	2.35609E-16

Gráfica No. 15



ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE *Mammea americana*.
(Mamey)

Según el cuadro 25 de las fracciones del mamey, los que mataron el 100% de Artemia salina fueron cloroformo y metanol a 125 Ug/ml y diclorometano a 250 Ug/ml ; la fracción de n-hexano y acetato de etilo no mató el 100% de Artemia salina.

La fracción de n-hexano (gráfica 11) mostró una LC₅₀ de 58.3889 valor que indica que el mamey es activo porque es menor que 1000 Ug/ml, esta fracción se identificó solamente taninos los cuales posiblemente le están dando la bioactividad.

La fracción de diclorometano a 250 Ug/ml mató al 100% de Artemia salina y según gráfica 12 tiene una LC₅₀ de 3.2585 valor que indica citotoxicidad la cual según el análisis fitoquímico preliminar posiblemente se debe a la presencia de sesquiterpenlactonas y taninos.

La fracción de cloroformo mató el 100% de Artemias Salinas a 125 Ug/ml y una LC₅₀ de 0.0614 cuyo resultado es alto en toxicidad, se identificaron sesquiterpenlactonas y alcaloides a los cuales posiblemente se les adjudique su actividad como citotóxica.

En la fracción de acetato de etilo no se puede identificar ningún metabolito secundario, además esta fracción no mató el 100% de Artemias Salinas pero al analizar la gráfica No. 14 se observa un LC₅₀ 0.0019 lo cual indica que debe de haber metabolitos que no se pudieron identificar pero que están dando actividad por lo cual deben de seguir investigando estas fracciones con equipos mas sofisticados como Resonancia Magnetica Nuclear.

La fracción de metanol a 125 Ug/ml mostro porcentaje de mortalidad de 100% y según el cuadro 24 se identificó sesquiterpenlactonas, flavonoides, saponinas y taninos y un LC₅₀ de 2.3560 que indica citotoxicidad.

De todos las fracciones del mamey los más activos fueron cloroformo y metanol.

La semilla del mamey no se utiliza oralmente pero si para uso externo especialmente como repelente de ectoparasitos como pulgas y piojos en perros y el hombre.

1.4.Jatropha Curcas (Tempate)

RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS REALIZADAS A LAS FRACCIONES DE TEMPATE EN DIFERENTES DISOLVENTES .

Cuadro N° 26

PRUEBA SOLVENTE	SESQUITERPENLACTONAS			RESULTADOS
	LEGAL	BALJET	HIDROXILAMINA	
n-Hexano	-	-	-	Negativo
Diclorometano	-	-	-	Negativo
Cloroformo	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-	Negativo
Metanol	-	-	-	Negativo

Cuadro N° 27

PRUEBA SOLVENTE	ALCALOIDES			RESULTADOS
	WAGNER	MEYER	DRAGENDORFF	
n-Hexano	-	-	-	Negativo
Diclorometano	-	-	-	Negativo
Cloroformo	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-	Negativo
Metanol	+	+	+	Positivo

RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS REALIZADAS A LAS
FRACCIONES DE TEMPATE EN DIFERENTES DISOLVENTES

Cuadro N° 28

PRUEBA SOLVENTE	FLAVONOIDES		ANTRAQUINONAS	
	SHINODA	RESULTADOS	BORNTRAGER	RESULTADOS
n-Hexano	-	Negativo	-	Negativo
Diclorometano	-	Negativo	-	Negativo
Cloroformo	+	Positivo	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	Negativo	-	Negativo
Metanol	+	Positivo	-	Negativo

Cuadro N° 29

PRUEBA SOLVENTE	TANINOS				
	FeCl ₃	SUBACETATO DE PLOMO	GELATINA	QUININA	RESULTADOS
n-Hexano	-	-	-	-	Negativo
Diclorometano	-	+	-	-	Negativo
Cloroformo	+	+	+	+	Positivo
Acetato de Etilo	-	-	-	-	Negativo
Metanol	+	+	+	+	Positivo

RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS REALIZADAS A LAS FRACCIONES DE TEMPATE EN DIFERENTES DISOLVENTES.

Cuadro N° 30

PRUEBA SOLVENTE	SAPONINAS			RESULTADOS
	LIEBERMAN BUCHARD	SALKOSWIKI	PBA DE ESPUMA	
n-Hexano	-	-	-	Negativo
Diclorometano	-	-	-	Negativo
Cloroformo	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-	Negativo
Metanol	+	+	+	Positivo

Cuadro N° 31

PRUEBA SOLVENTE	CARDIOTONICOS				RESULTADOS
	KEDDE	LEGAL	KÉLLER KELLIANI	LIEBERMAN BUCHARD	
n-Hexano	-	-	-	-	Negativo
Diclorometano	-	-	-	-	Negativo
Cloroformo	-	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-	-	Negativo
Metanol	-	-	-	-	Negativo

CUADRO RESUMEN DE COMPONENTES QUÍMICOS IDENTIFICADOS EN LAS
FRACCIONES DEL EXTRACTO DE Jatropha curcas.

Cuadro N° 32.

TEMPATE	
n-Hexano	No se logró determinar ningún metabolito secundario.
Diclorometano	No se logró determinar ningún metabolito secundario.
Cloroformo	Taninos , Flavonoides.
Acetato de Etilo	No se logró determinar ningún metabolito secundario.
Metanol	Alcaloides, Taninos, Saponinas, Flavonoides.

Resumen de los porcentajes de mortalidad promedio de *Jatropha curcas* (Tempate).

Cuadro No. 33

Concentraciones (Ug/ml)	4 PORCENTAJE DE MORTALIDAD PROMEDIO				
	<i>Jatropha curcas</i> (Tempate)				
	n-hexano	Diclorometano	Clorofor mo	Acetato de etilo	Metanol
500	78.33	100	100	88.33	100
250	75.0	100	100	73.33	98.33
125	68.33	98.33	83.0	66.66	90.0
62.5	66.66	85.0	73.33	65.0	85.0
31.25	60.0	70.0	66.66	65.0	73.33
15.62	56.66	53.33	58.33	60.0	65.0
7.81	55.55	46.66	51.66	56.66	56.66
3.9	48.33	45.0	41.66	51.66	43.33

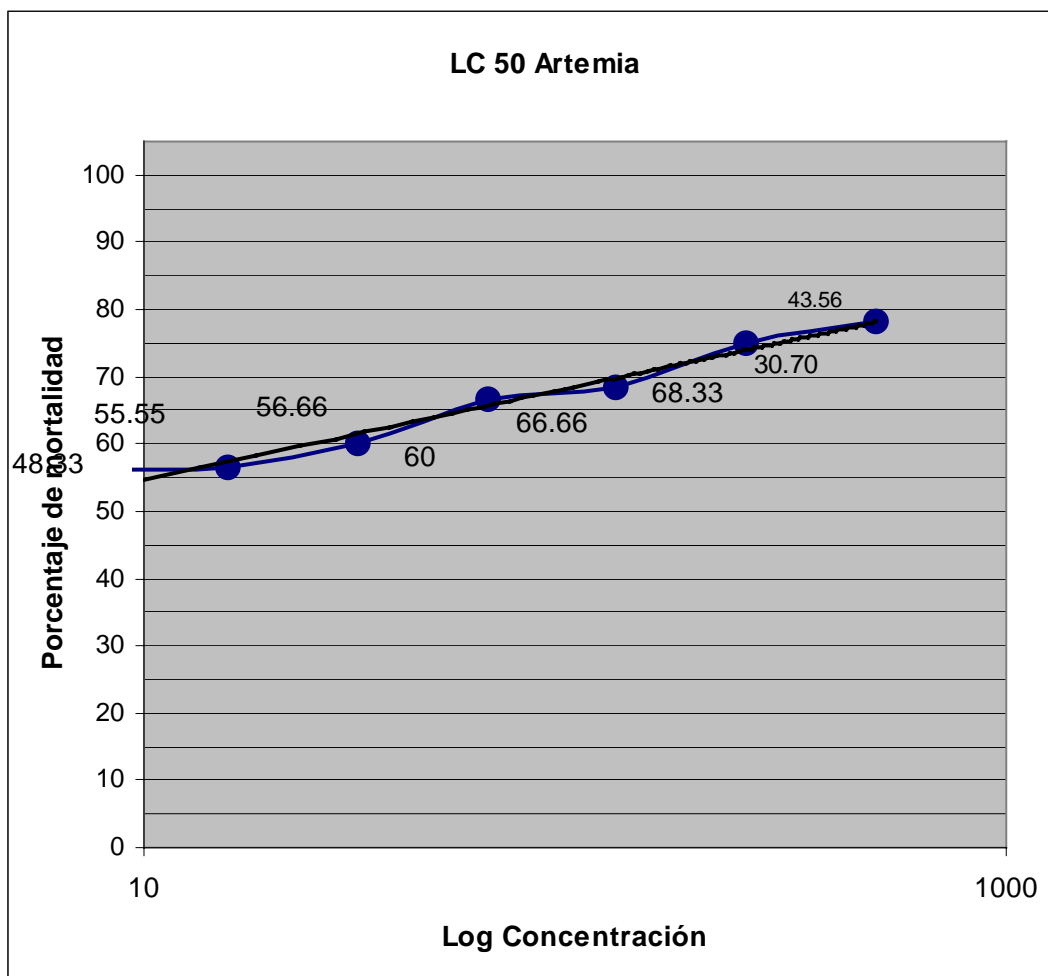
Después de haber realizado el fraccionamiento y eliminado el disolvente , se procedió a efectuar el bioensayo con Artemia salina , obteniéndose el porcentaje de mortalidad debido a los metabolitos que fueron arrastrados y que se encontraban presentes en la fracción del extracto de acuerdo a la polaridad y afinidad que mostraban con el disolvente, obteniéndose para cada caso los resultados arriba mostrados dependiendo de la concentración del extracto.

**Calculos de LC50 Para Artemia salina
Jatropha curcas
(Tempate en n-hexano)**

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	78.33	2.698970004
250	75	2.397940009
125	68.33	2.096910013
62.5	66.66	1.795880017
31.25	60	1.494850022
15.62	56.66	1.19368103
7.81	55.55	0.892651034
3.9	48.33	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.97684507	0.725712857	5.317565606

Gráfica No.16

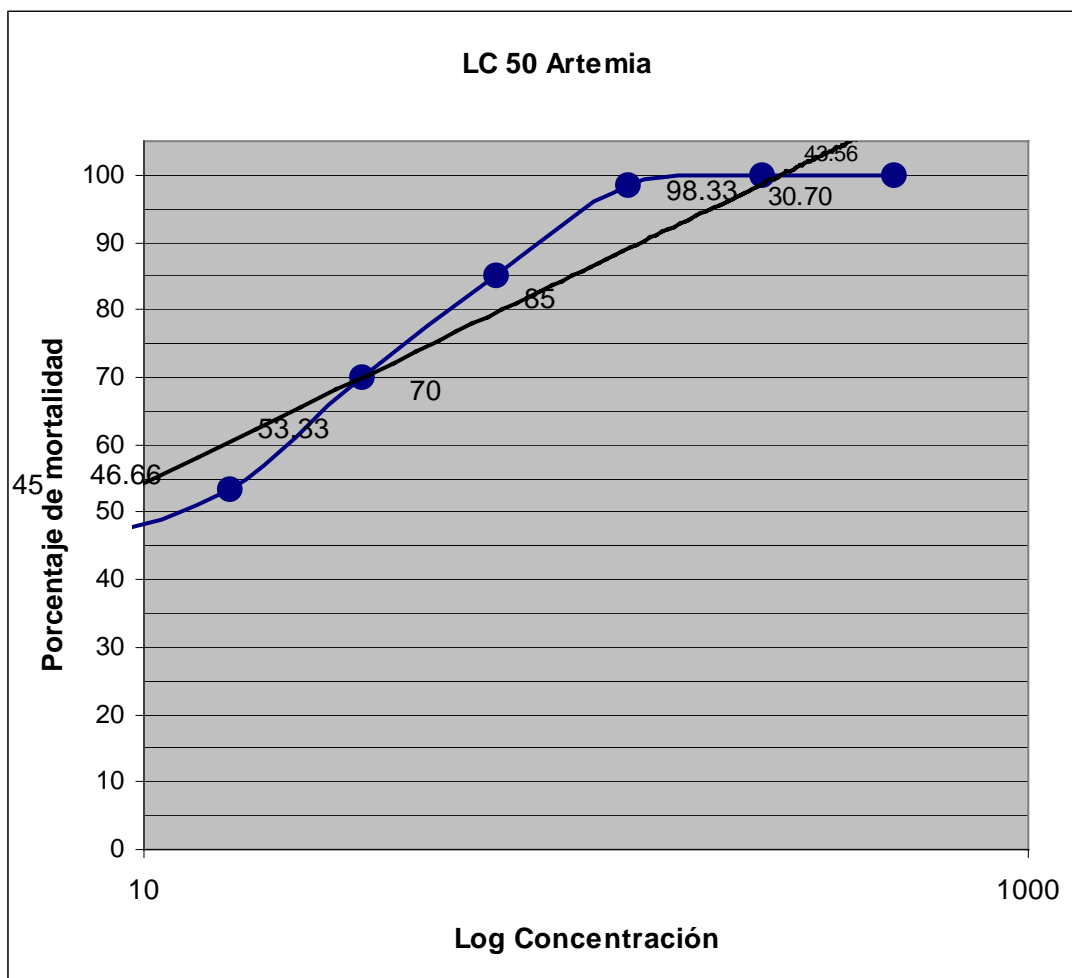


**Calculos de LC50 Para Artemia salina
Jatropha curcas
(Tempate en diclorometano)**

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	98.33	2.096910013
62.5	85	1.795880017
31.25	70	1.494850022
15.62	53.33	1.19368103
7.81	46.66	0.892651034
3.9	45	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.829391295	0.213830015	1.636175989

Gráfica No. 17



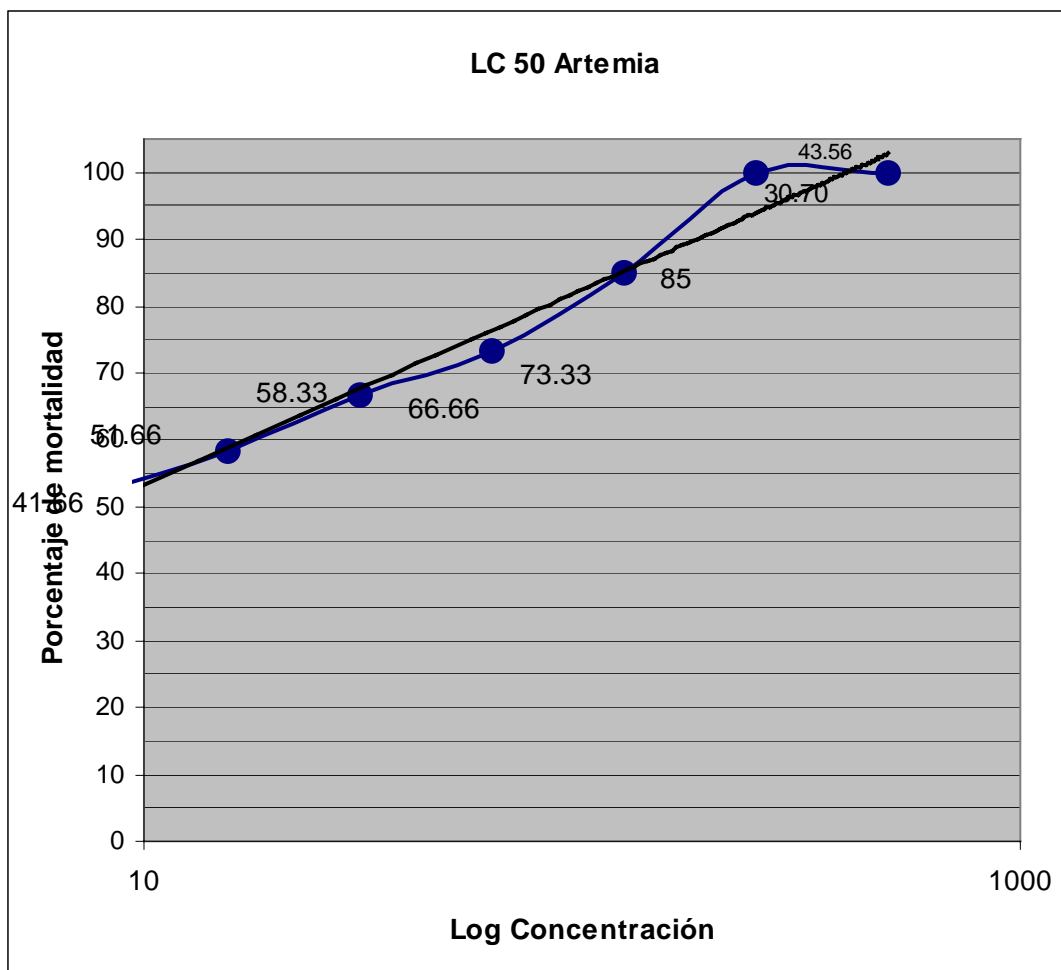
Calculos

**de LC50 Para Artemia salina
Jatropha curcas
(Tempate en cloroformo)**

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	85	2.096910013
62.5	73.33	1.795880017
31.25	66.66	1.494850022
15.62	58.33	1.19368103
7.81	51.66	0.892651034
3.9	41.66	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.94802451	1.12027218	13.19083171

Gráfica No. 18

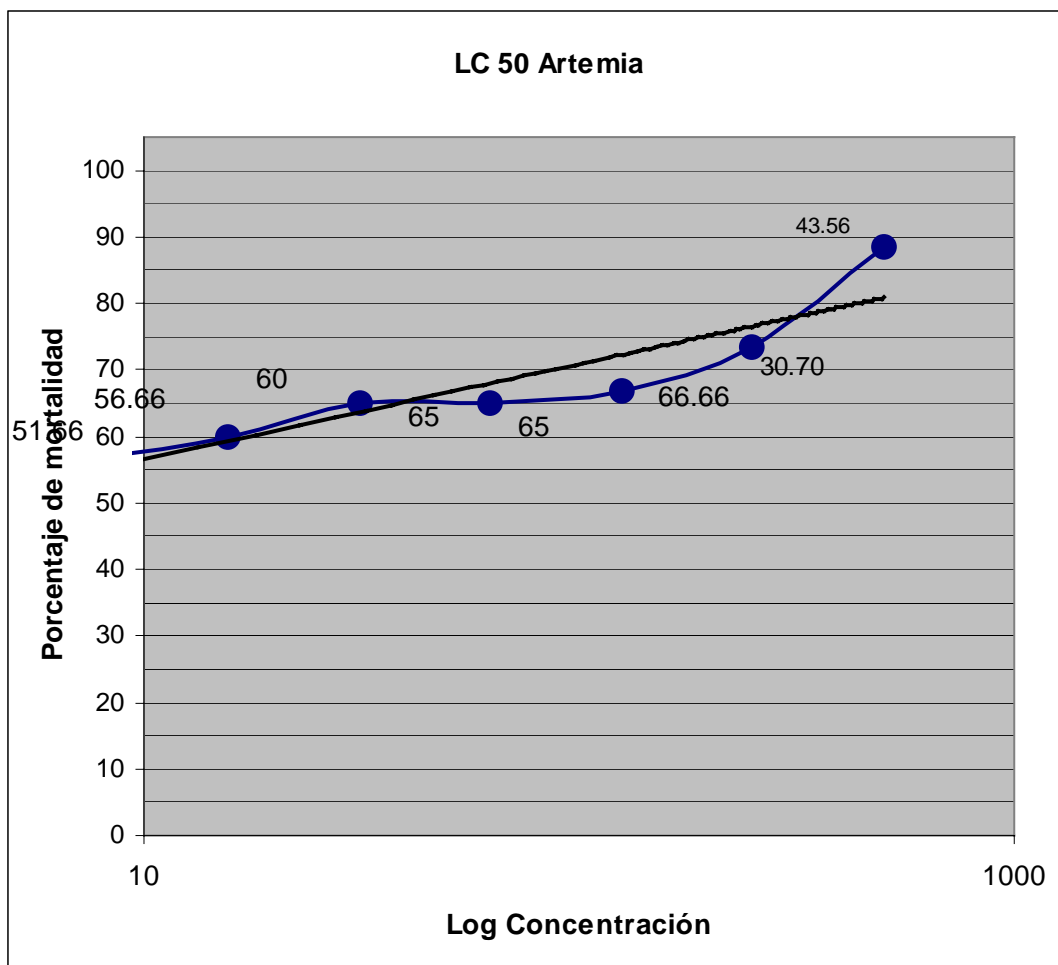


Calculos de LC50 Para Artemia salina
 Jatropha curcas
 (Tempate en acetato de etilo)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	88.33	2.698970004
250	73.33	2.397940009
125	66.66	2.096910013
62.5	65	1.795880017
31.25	65	1.494850022
15.62	60	1.19368103
7.81	56.66	0.892651034
3.9	51.66	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.931177037	1.453059808	28.38309877

Gráfica No. 19

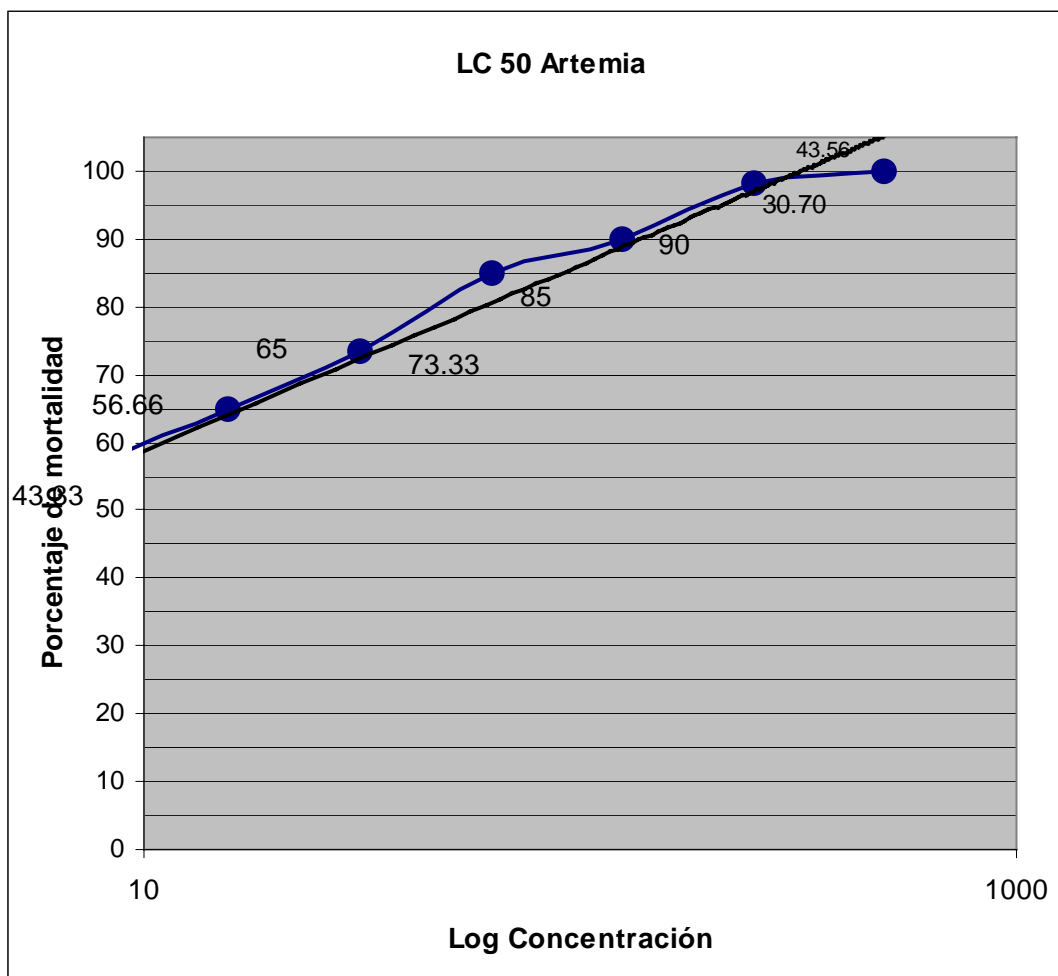


**Calculos de LC50 Para Artemia salina
Jatropha curcas
(Tempate en metanol)**

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	98.33	2.397940009
125	90	2.096910013
62.5	85	1.795880017
31.25	73.33	1.494850022
15.62	65	1.19368103
7.81	56.66	0.892651034
3.9	43.33	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.973776309	-0.071946634	0.847331527

Gráfica No.20



DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS DE *Jatropha curcas*.
(Tempate)

Según el cuadro 33 las fracciones que mostraron 100% de mortalidad fueron cloroformo, diclorometano y metanol; y n-hexano y acetato de etilo no mataron en un 100%.-

En la fracción de n-hexano, diclorometano, y acetato de etilo, no se logró determinar la presencia de metabolitos secundarios al realizarle el análisis fitoquímico, lo cual no quiere decir que no hayan componentes químicos, pues estas fracciones presentaron actividad al desarrollar el bioensayo, lo que sucede es que se necesita equipo más sofisticado como Resonancia Magnética Nuclear, ya que en cada una de las fracciones se encuentran compuestos químicos más específicos.

En n-hexano no se logró identificar ningún metabolito, sin embargo dio un resultado de LC₅₀ de 5.3175 lo cual significa que es activo, pero además esta fracción no mató el 100% de Artemia salina.

En diclorometano, gráfica 17 el porcentaje de mortalidad fue en 250 Ug/ml y una LC₅₀ de 1.6361 lo que indica según el protocolo de investigación que es citotóxico por ser un valor menor de 1000 Ug/ml. En esta fracción no se pudo identificar ningún metabolito pero como se explica anteriormente no significa que no hayan componentes químicos, sino que los análisis fitoquímicos preliminares no llegan a ser tan específicos.

En la fracción de cloroformo se identificó flavonoides y taninos y el porcentaje de mortalidad fue de 250 Ug/ml y una LC₅₀ de 13.1908 (gráfico 18) que indica que es citotóxica.

En la fracción de acetato de etilo no se pudo identificar los metabolitos secundarios, además no se tuvo el 100% de mortalidad a ninguna concentración, la LC₅₀ que se obtuvo fue de 28.3830.-

En la fracción de metanol se identificaron alcaloides, taninos, saponinas, y flavonoides y el porcentaje de mortalidad fue de 500 Ug/ml y el valor de LC₅₀ 0.8473.

Las fracciones más activas donde el porcentaje de mortalidad fue 100% se consiguió en diclorometano y cloroformo.

La LC₅₀ mayor se obtuvo en metanol, diclorometano, n-hexano, cloroformo y acetato de etilo respectivamente.

El tempate es usado para afecciones gastrointestinales en forma interna y en forma topica para fuego de la boca, erisipela, úlceras y quemaduras, se recomienda seguir haciendo un estudio de citotoxicidad y no aumentar las dosis por problemas de toxicidad hacia los humanos.

1.6. *Yucca elephantipes* (Izote)

1.7. RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS REALIZADAS AL IZOTE
EN DIFERENTES SOLVENTES.

Cuadro N° 34

PRUEBA	SESQUITERPENLACTONAS			
	LEGAL	BALJET	HIDROXILAMINA	RESULTADOS
SOLVENTE				
n-Hexano	-	-	-	Negativo
Diclorometano	-	-	-	Negativo
Cloroformo	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-	Negativo
Metanol	-	-	-	Negativo

Cuadro N° 35

PRUEBA	ALCALOIDES			
	WAGNER	MEYER	DRAGENDORFF	RESULTADOS
SOLVENTE				
n-Hexano	-	-	-	Negativo
Diclorometano	-	-	-	Negativo
Cloroformo	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-	Negativo
Metanol	-	-	-	Negativo

RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS REALIZADAS AL IZOTE EN DIFERENTES SOLVENTES.

Cuadro N° 36

PRUEBA SOLVENTE	FLAVONOIDES		ANTRAQUINONAS	
	SHINODA	RESULTADOS	BORNTRAGER	RESULTADOS
n-Hexano	-	Negativo	-	Negativo
Diclorometano	-	Negativo	-	Negativo
Cloroformo	-	Negativo	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	Negativo	-	Negativo
Metanol	-	Negativo	-	Negativo

Cuadro N° 37

PRUEBA SOLVENTE	TANINOS				
	FeCl ₃	SUBACETATO DE PLOMO	GELATINA	QUININA	RESULTADOS
n-Hexano	-	-	-	-	Negativo
Diclorometano	-	-	-	-	Negativo
Cloroformo	-	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-	-	Negativo
Metanol	+	+	+	+	Positivo

RESULTADOS DE PRUEBAS FITOQUIMICAS REALIZADAS AL IZOTE EN DIFERENTES SOLVENTES.

Cuadro N° 38

PRUEBA SOLVENTE	SAPONINAS			
	LIEBERMAN BUCHARD	SALKOWSKI	PBA. DE ESPUMA	RESULTADOS
n-Hexano	-	-	-	Negativo
Diclorometano	-	-	-	Negativo
Cloroformo	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-	Negativo
Metanol	+	+	+	Positivo

Cuadro N° 39

PRUEBA SOLVENTE	CARDIOTONICOS				
	KEDDE	LEGAL	KÉLLER KELLIANI	LIEBERMAN BUCHARD	RESULTADOS
n-Hexano	-	-	-	-	Negativo
Diclorometano	-	-	-	-	Negativo
Cloroformo	-	-	-	-	Negativo
Acetato de Etilo	-	-	-	-	Negativo
Metanol	-	-	-	-	Negativo

CUADRO RESUMES DE COMPONENTES QUÍMICOS IDENTIFICADOS EN LAS
FRACCIONES DEL EXTRACTO DE Yucca elephantipes.

Cuadro N° 40

IZOTE	
n- Hexano	No se logró determinar ningún metabolito secundario.
Diclorometano	No se logró determinar ningún metabolito secundario.
Cloroformo	No se logró determinar ningún metabolito secundario.
Acetato de Etilo	No se logró determinar ningún metabolito secundario.
Metanol	Taninos, Saponinas.

Resumen de los porcentajes de mortalidad promedio de Yuca elephantipes (Izote).

Cuadro No. 41.

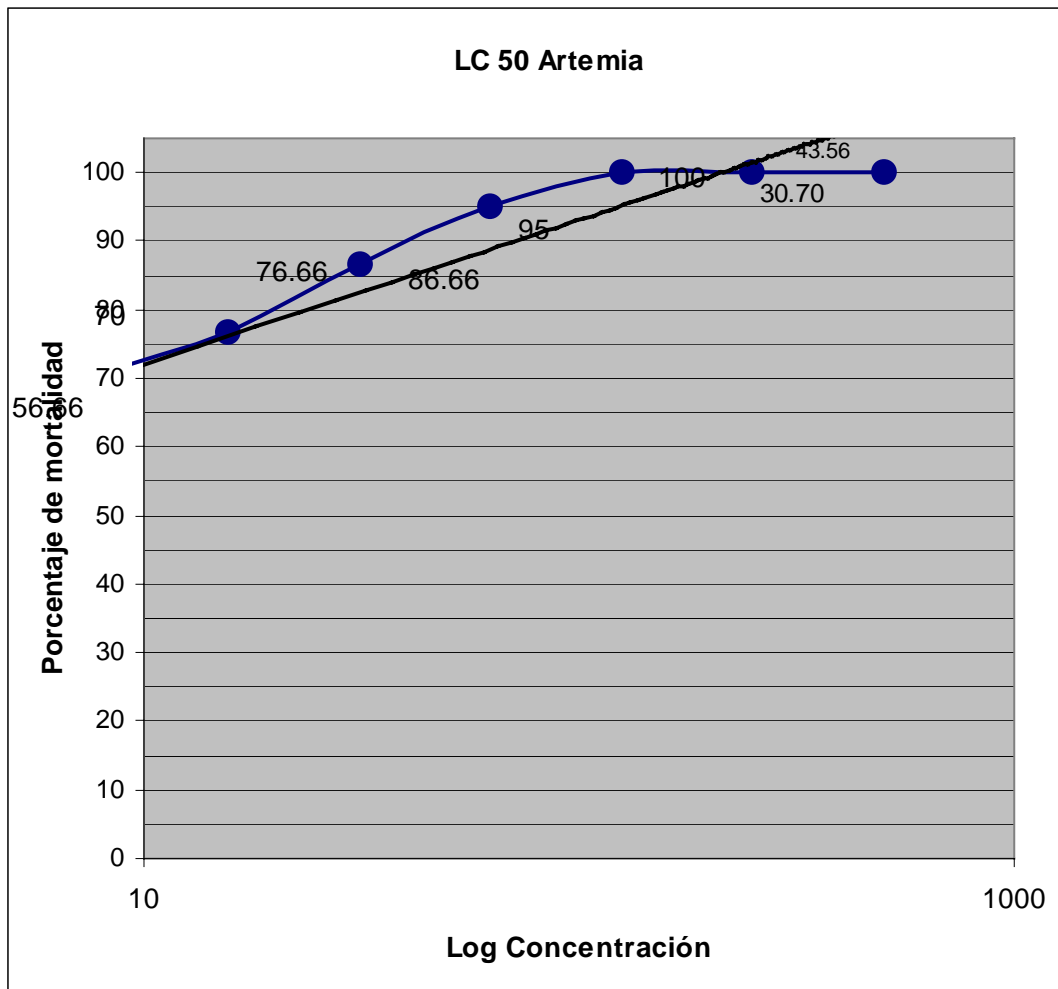
Concentraciones (Ug/ml)	5 PORCENTAJE DE MORTALIDAD PROMEDIO				
	<i>Yuca elephantipes</i> (Izote)				
	n-hexano	Diclorometano	Clorofor mo	Acetato de etilo	Metanol
500	100	100	100	98.3	100
250	100	100	100	93.33	100
125	100	100	100	93.3	100
62.5	95.0	100	90.0	90.0	98.33
31.25	86.66	100	86.6	86.6	98.33
15.62	76.66	100	76.66	83.3	98.33
7.81	70.0	100	70.0	80.0	70.0
3.9	56.66	98.3	56.6	76.6	61.6

Después de haber realizado el fraccionamiento y eliminado el disolvente , se procedió a efectuar el bioensayo con Artemia salina , obteniéndose el porcentaje de mortalidad debido a los metabolitos que fueron arrastrados y que se encontraban presentes en la fracción del extracto de acuerdo a la polaridad y afinidad que mostraban con el disolvente, obteniéndose para cada caso los resultados arriba mostrados dependiendo de la concentración del extracto.

Calculos de LC50 Para Artemia salina
Yuca elephantipes
(izote en n-hexano)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	100	2.096910013
62.5	95	1.795880017
31.25	86.66	1.494850022
15.62	76.66	1.19368103
7.81	70	0.892651034
3.9	56.66	0.591064607

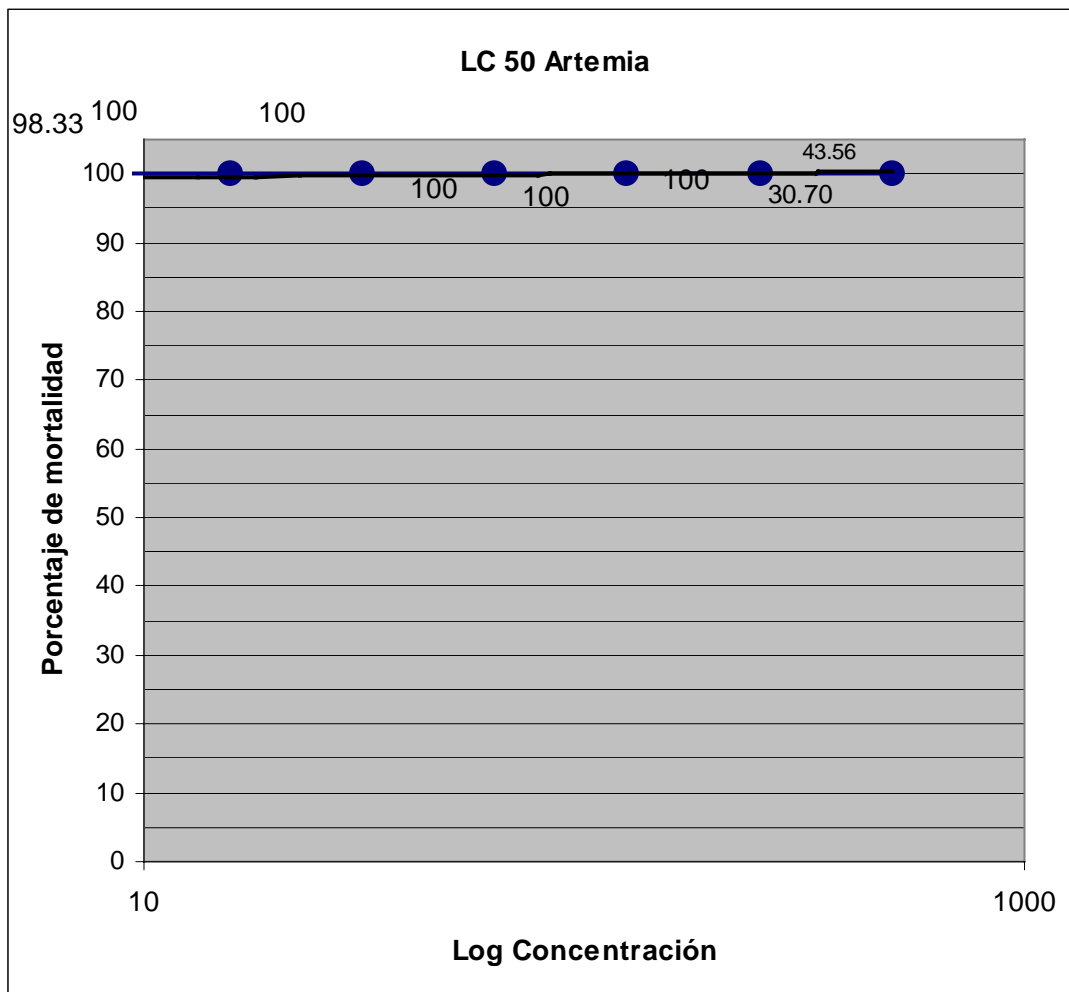
Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.774596669	-3.622659905	0.000238419



Calculos de LC50 Para Artemia salina
Yuca elephantipes
(izote en diclorometano)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	100	2.096910013
62.5	100	1.795880017
31.25	100	1.494850022
15.62	100	1.19368103
7.81	100	0.892651034
3.9	98.33	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
No valor numerico	No valor numerico	No valor numerico

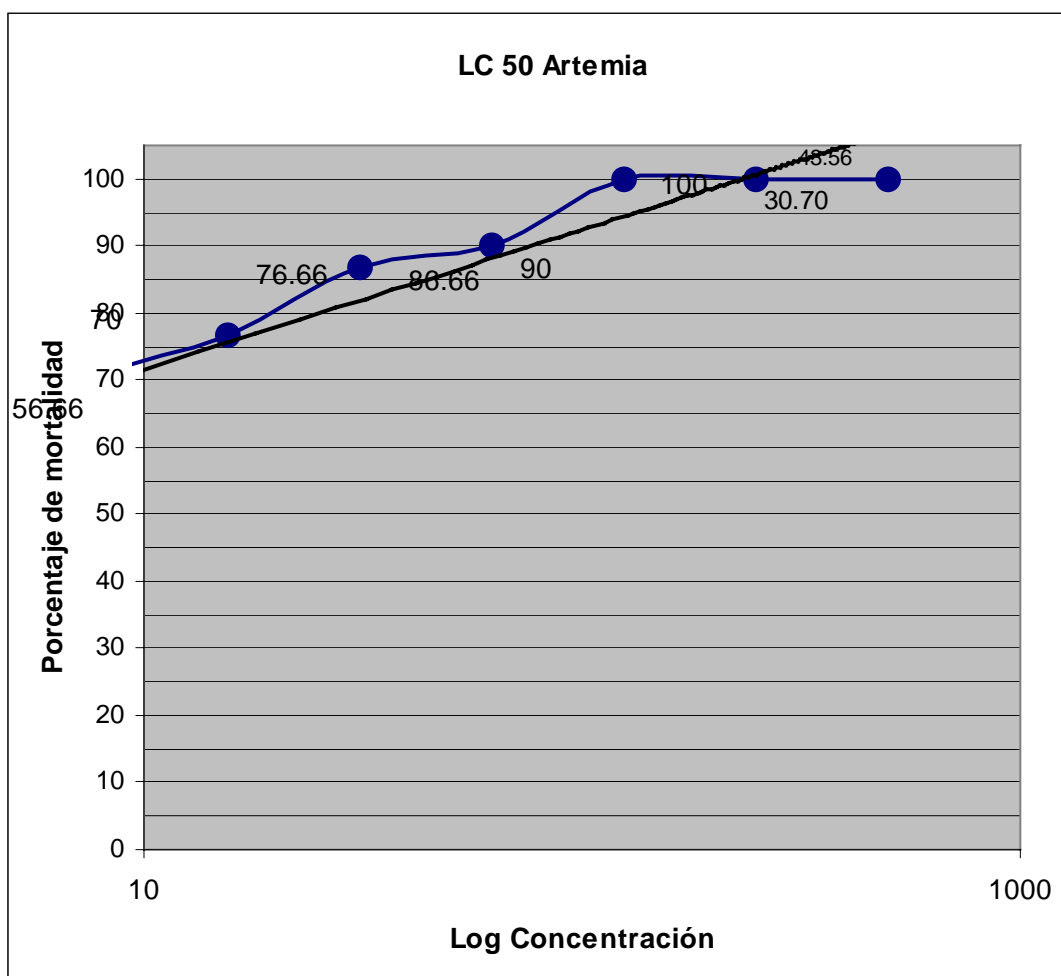


*No se obtuvo un valor numerico para "r"(coeficiente de correlación, al igual que para LC50 debido a que el método utilizado es aplicable cuando una concentración produce la muerte a la mitad de la población y no al 100% en este caso

Calculos de LC50 Para Artemia salina
 Yuca elephantipes
 (izote en cloroformo)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	100	2.096910013
62.5	90	1.795880017
31.25	86.66	1.494850022
15.62	76.66	1.19368103
7.81	70	0.892651034
3.9	56.66	0.591064607

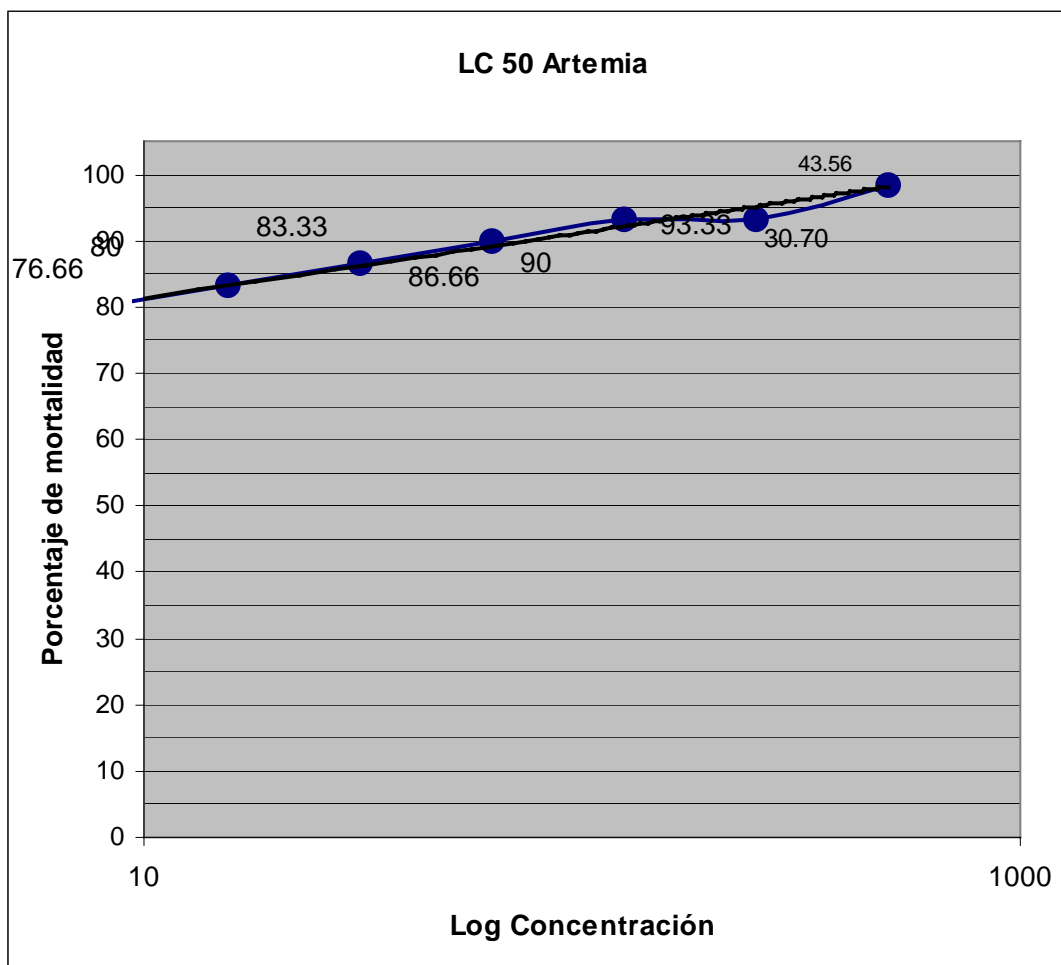
Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.774596669	-0.612359948	0.244140625



Calculos de LC50 Para Artemia salina
 Yuca elephantipes
(izote en acetato de etilo)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	98.33	2.698970004
250	93.33	2.397940009
125	93.33	2.096910013
62.5	90	1.795880017
31.25	86.66	1.494850022
15.62	83.33	1.19368103
7.81	80	0.892651034
3.9	76.66	0.591064607

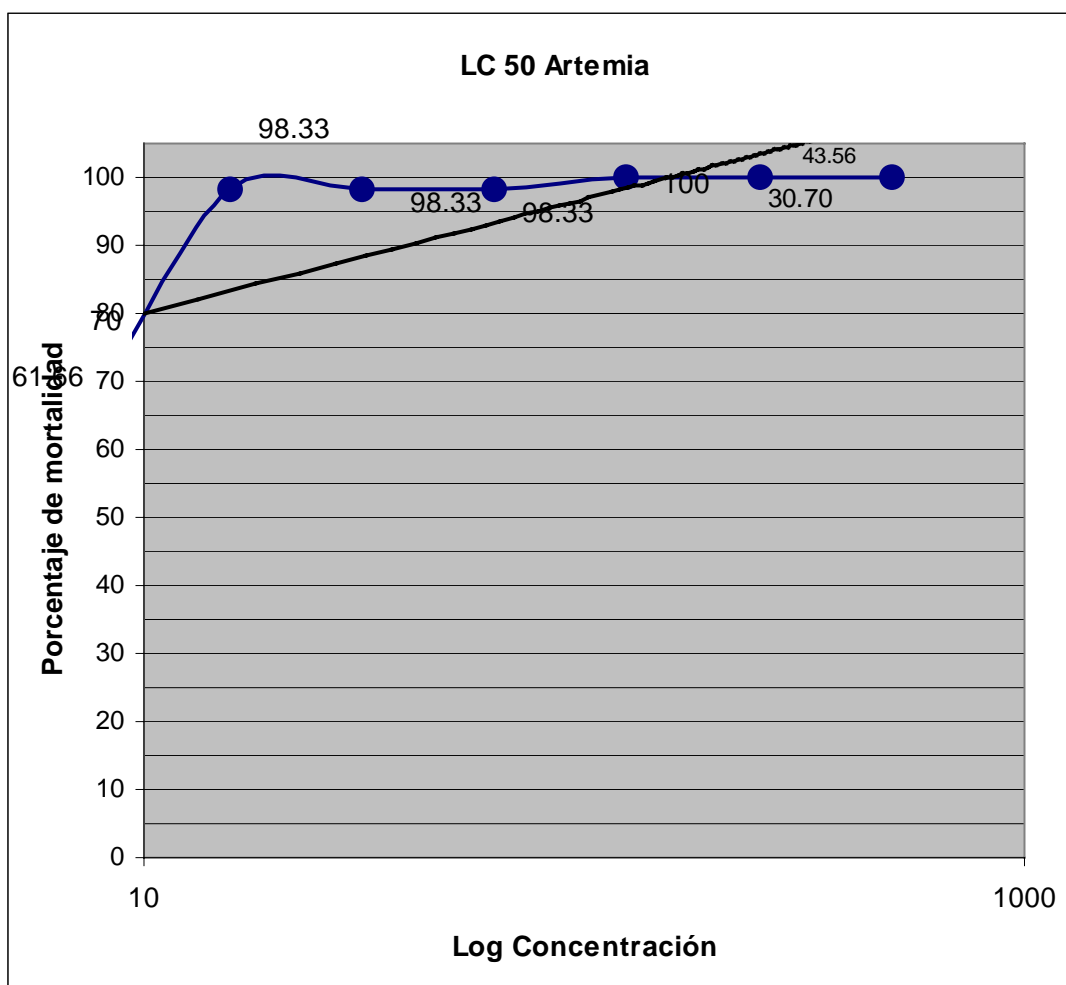
Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.939292165	-2.401988309	0.003962887



Calculos de LC50 Para Artemia salina
 Yuca elephantipes
(izote en metanol)

CONCENTRACION ug/ml	Porcentaje de mortalidad	Logaritmo de concentracion
500	100	2.698970004
250	100	2.397940009
125	100	2.096910013
62.5	98.33	1.795880017
31.25	98.33	1.494850022
15.62	98.33	1.19368103
7.81	70	0.892651034
3.9	61.66	0.591064607

Valor de r	Valor Logaritmico de LC50	LC 50 microgramos por mililitro
0.774596669	-15.62780823	2.35609E-16



DISCUSIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE Yucca elephantipes. **(Izote)**

En el caso del Izote, se encontró que el porcentaje de mortalidad en 100 % se obtuvo para n-hexano, cloroformo y metanol, a una concentración de 125 ug/ml y en el acetato de etilo no se tuvo a ninguna concentración el 100% de mortalidad.

En las fracciones n-hexano, diclorometano, cloroformo y acetato de etilo no se pudo identificar ningún metabolito secundario, al igual que en los casos anteriores no es que no se encuentren metabolitos secundarios presentes si no que mediante el análisis fitoquímico preliminar no fue posible identificarlos ;

Solamente en la fracción de metanol se encontró taninos y saponinas según el cuadro N° 40.

La fracción con mayor grado de mortalidad fue con diclorometano el cual lo hizo a 7.81ug/ml por lo que el programa de computadora “Probit” , no lanzó valor de Concentración Letal Media ya que la mayoría del porcentaje de mortalidad en casi todas las concentraciones fue del 100%.

El valor de Concentración Letal Media con mayor dato de toxicidad, resultó con n-hexano, acetato de etilo, cloroformo y metanol con 0.00023, 0.0039, 0.2441 y 2.3560 respectivamente.

El izote es utilizado para problemas respiratorios . Por lo cual se sugiere no aumentar las dosis por su citotoxicidad encontrada.

INTERPRETACIÓN DE LAS GRAFICAS.

Para calcular el valor de la Concentración Letal Media (LC50) de las fracciones de los extractos ensayados se utiliza el Programa de Computadoras para cálculo “**PROBIT**” o prueba de Finney. EL programa presenta un cuadro de tabulación en el cual se encuentran 3 variables que ayudan a determinar la concentración letal media de los extractos de las plantas en estudio en sus diferentes fracciones.

1. La concentración de las fracciones de los extractos, representada en unidades de ug/ml, haciendose diluciones a partir de una concentración de 500 ug/ml hasta 3.91 ug/ml.
2. Porcentaje de mortalidad, el cual depende del efecto de las fracciones del extracto de cada planta sobre la Artemia salina; y luego se encuentran los correspondientes logaritmos de cada concentración.
3. El coeficiente de correlación (r), nos determina el grado o intensidad de relación entre la variable en estudio en éste caso la concentración de las fracciones de los extractos y el porcentaje de mortalidad se determina estadísticamente a partir de los datos que se encuentran en la tabla de tabulación y será perfecto cuando $r = 1$.

El dato que se encuentra al lado del coeficiente de correlación (r), es el valor de la LC_{50} .

Se grafican el porcentaje de mortalidad en el eje de las ordenadas, en una escala lineal y la concentración de las fracciones de los extractos en el eje de las abscisas, en una escala logarítmica, por lo que hay que obtener el logaritmo de los valores de 10, 100, 1000 que se observan en el gráfico (siendo entonces 10^1 , 10^2 , 10^3 ; respectivo), para trazar los puntos.

Se usa la escala logarítmica porque se han obtenido valores elevados y mínimos del porcentaje de mortalidad, dando exactitud y precisión al obtener la gráfica.

En este cuadro se presentan las especies vegetales a 500 ppm que presentaron actividad citotóxica sobre los nauplios de artemias salinas además se presentaron los valores de las concentraciones letal medio (LC50), su coeficiente de correlación el logaritmo de la concentración.

Cuadro No. 42.

Nombre común de la planta fracionada en los diferentes solventes	Coefficiente de correlación " r "	Logaritmo de la concentración LC50	Concentra cion Letal Media Ug/ml
Mamey			
En n-hexano	0.960976982	58.38893371	1.766330544
En Diclorometano	0.934868931	3.258543389	0.513023508
En Cloroformo	0.774596669	0.061442325	-1.211532361
En Acetatao de Etilo	0.774596669	0.001907349	-2.719569918
En Metanol	0.774596669	2.35609E-16	-15.62780823
Amatillo			
En n-hexano	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor
En Diclorometano	0.94659656	10.31329893	1.013397606
En Cloroformo	0.939336437	35.80911287	1.553993562
En Acetatao de Etilo	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor
En Metanol	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor
Tempate			
En n-hexano	0.97684507	5.317565606	0.725712857
En Diclorometano	0.829391295	1.636175989	0.213830015
En Cloroformo	0.94802451	13.19083171	1.12027218
En Acetatao de Etilo	0.931177037	28.38309877	1.453059808
En Metanol	0.973776309	0.847331527	-0.071946634
Izote			
En n-hexano	0.774596669	0.000238419	-3.622659905
En Diclorometano	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor
En Cloroformo	0.774596669	0.244140625	-0612359948
En Acetatao de Etilo	0.939292165	0.003962887	-2.401988309
En Metanol	0.774596669	2.35609E-16	-15.62780823
Anona			
En n-hexano	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor
En Diclorometano	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor
En Cloroformo	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor
En Acetatao de Etilo	0.774596669	0.00766914	-2.11525333
En Metanol	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor	No se obtuvo valor

No se obtuvo valor numérico para las fracciones más tóxicas ya que estas presentaron un 100 % de mortalidad sobre el animal experimentado.

Capitulo IV

CONCLUSIONES

1. Las fracciones obtenidas de los extractos de las cinco especies vegetales en estudio(Anona, Amatillo, Izote, Mamey y Tempate) presentan una elevada citotóxicidad debido a que la Concentración Letal Media (LC_{50})resultante es menor a 1000 ug/ml.
2. La actividad citotóxica que presentan las fracciones en estudio podría deberse al sinergismo de la actividad de los metabolitos secundarios presentes en los diferentes extractos vegetales ya que cada una de las fracciones estudiadas presentan más de un metabolito secundario.
3. En el ensayo realizado a 500 ppm, las fracciones : Anona en Cloroformo, Anona en Metanol, Anona en n-Hexano, Anona en Diclorometano, Amatillo en Acetato de Etilo, Amatillo en Metanol, Amatillo en n-Hexano, Izote en Diclorometano, presentaron un 100% de mortalidad sobre Artemia salina considerándose estas como las fracciones más tóxicas.
4. Las concentraciones letales medias obtenidas demuestran que los extractos de las plantas en estudio causan destrucción celular cuando son administrados principalmente por vía oral, para tratar enfermedades para las que presentan acción terapéutica.
5. A pesar de la elevada toxicidad que las especies vegetales ensayadas presentan para el ser humano, las propiedades que poseen las hacen útiles para otras áreas como la agricultura (control de plagas), para la industria(elaboración de insecticidas y larvicidas), etc.

6. A través de las pruebas fitoquímicas preliminares se puede identificar algunos metabolitos secundarios presentes tales como alcaloides, antraquinonas, glicósidos saponinicos, glicósidos cardiotónicos, flavonoides, sesquiterpenlactonas, y taninos, en las fracciones obtenidas; en los casos en que no se pudo identificarlos, no significa que no hayan componentes químicos , ya que a ellos se debe la bioactividad.

7. La utilización del método de los micropozos, para el desarrollo del bioensayo, resultó ser un método sencillo, práctico, sensible y reproducible ya que permite trabajar con una mayor comodidad al realizar las diluciones de las muestras y la lectura de los resultados, obteniéndose siempre datos confiables, al igual que el método de los tubos y sin ser tedioso debido ala gran cantidad de material que se utilizaba en el antiguo método.

8. El método utilizado no es aplicable para las fracciones en las que se obtiene el 100% de mortalidad, ya que esta diseñado para trabajar cuando se produce solamente la muerte en el 50% de la población estudiada.

Capitulo V

RECOMENDACIONES

1. Para la obtención de los extractos vegetales se debe de tomar en cuenta la forma de recolección, hora, así como el buen estado del órgano de la planta a utilizar, con el objeto de obtener metabolitos secundarios que den bioactividad objetiva.
2. Para el método cromatográfico en columna es necesario un adecuado empaquetamiento de esta, para lograr que la separación de los extractos en los diferentes solventes se dé de la mejor forma posible.
3. Durante la realización del bioensayo es importante llevar un blanco y un control simultáneamente con las muestras, para verificar si el bioensayo de mortalidad de Artemia salina es válido o si existen factores externos que afectan los resultados de los análisis.
4. Se recomienda utilizar el método de los micropozos para la investigación de actividad citotóxica de otras especies vegetales debido a que pueden realizarse ensayos en forma rápida; además de ser un método sencillo, reproducible y de bajo costo.

5. Continuar las investigaciones fitoquímicas con equipo especializado como Resonancia Magnética Nuclear y otros, para determinar así todos aquellos metabolitos secundarios que no pudieron ser identificados .

6. Seguir efectuando separaciones para poder obtener más fracciones hasta poder llegar a las moléculas activas y poder ir tras la búsqueda de nuevas drogas vegetales.

7. Debido a que está demostrada la actividad citotóxica de los extractos vegetales analizados frente a la Artemia salina, recomienda no utilizarlos internamente mientras no se concluyan sus estudios de citotoxicidad..

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA.

LIBROS.

1. CACERES, ARMANDO. “ Plantas de uso medicinal en Guatemala” .1º Edición . Editorial Universitaria. Universidad de San Carlos. Guatemala, vol. I, 1996.
2. DOMINGUEZ, X.A. “Métodos de investigación fitoquímica” . 1º edición . Editorial Limusa, Mexico, DF. 1973.
3. EVANS, W. C. “ Farmacognosia” . 13º edición. Editorial Interamericana. Mc Grill, Mexico, DF. 1991.
4. GUPTA, P.M. “ 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas”. Editorial LTDA. Bogotá, Colombia, 1995.
5. HARPER, S, POTTER, C. “Annona species as insecticides” .Chemical abstracts,1948. vol 42.
6. LOZANO CABO, F. “ Oceanografía, Biología Marina y Pesca”. 1º Edición . Editorial Paraninfo. Madrid, España. Vol. 1, 1970.
7. PLANT RESEARCH MEDICA, “A microwell cytotoxicity assay using Artemia salina.(Brine Shrimp); Octubre, 1992, vol. LVIII.
8. PLANTER, “Obtención y Aprovechamiento de extractos vegetales de la flora salvadoreña”. 1º Edición . Volumen 1. Universidad de El Salvador, El Salvador, Editorial Universitaria , 1989.
9. STANDLEY, P. “Flora de Guatemala”. 1º edición. Guatemala, 1978.

DOCUMENTOS.

10. AREVALO,L;MENDEZ,C.L. “ Incorporación del extracto de semilla de Mamey a una forma farmacéutica adecuada para el tratamiento de la pediculosis ”, Facultad de Química y Farmacia , Universidad de El Salvador, El Salvador, 1997.
11. BLANCO , G ; LAINEZ, G. “Determinación de la bioactividad citotóxica de extractos de veinticinco especies vegetales mediante el bioensayo con Artemia salina”
Facultad de Química y Farmacia . Universidad de El Salvador, El Salvador, 2002.
12. CACERES, A & SAMAYOA, B. Tamizaje de la actividad antibacterianas de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Guatemala 1989.
13. CAMPOS, H ; SANTAMARÍA, A ; SOLIS, D. “Determinación de la actividad antimicrobiana de extractos de 26 especies de la flora salvadoreña según método Mitscher”. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador, El Salvador,1999.
14. CAÑAS , R .; LOPEZ, M.; “Determinación de la bioactividad citotóxica de extractos de veintiséis especies vegetales mediante el bioensayo simple con Artemia salina .Facultad de Química y Farmacia. Universidad de el Salvador. El Salvador . 2001.
15. CARREÑO , I. “ Contribución al estudio Químico y Cualitativo de 50 especies de la flora salvadoreña”. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. 1971.
16. CEA, L ; HERRERA, A ; “Determinación de la bioactividad citotóxica de los extractos de veinticinco especies vegetales de uso materno infantil mediante ensayo simple con Artemia salina .
17. GALLEGOS, C ; MELÉNDEZ, D ; PEREZ, G . “Determinación de la bioactividad de 26 especies de la flora salvadoreña mediante el bioensayo interaccion con ADN por cromatografía líquida de alta resolución”. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. El Salvador, 2000.

18. HERRERA, E.; ZULETA, R.; “Determinación de la bioactividad de los aceites esenciales de quince especies vegetales, mediante el bioensayo en Artemia salina . Facultad de Química y Farmacia .Universidad de El Salvador. El Salvador. 2001.
19. HOUSE, P.R.; TORRES, C; WHITE, T; OCHOA, L ; RIVAS, M ; “Plantas medicinales comunes de Honduras ”. 1º Edición, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Laboratorios de Histología Vegetal y Etnobotánica, Tegucigalpa, Honduras, 1995.
20. MARTINEZ FUENTES, W. A. “Efecto de la hidratación , decapsulación, y salinidad, para la producción de Artemia salina , en una explotación de larvas de camarón de río Macrobrachium rosenbergii”. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de el Salvador. El Salvador. 1992 .
21. MENA , M.G. “Obtención y aprovechamiento de los extractos vegetales de la flora salvadoreña”. 2º edicion. Editorial Universitaria .1994. Universidad de El Salvador.
22. SANCHEZ , N.C. Estudios etnobotanicos y farmacognósicos de quince plantas medicinales de El Salvador (Zona Oriental), Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador.

FOLLETOS

23. BOLETÍN INFORMATIVO TRIMESTRAL editado por la Asociación Jardín Botánico “La Laguna”, Año XIII , Numero 1 , Enero-Marzo, 1994.

PUBLICACIONES

24. CYTED, Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo manual de técnicas de investigación ;Sub programa X: Química Fina Farmacéutica ; Proyecto XI: Búsqueda de Principios Bioactivos en plantas de la región . Marzo, 1995.
25. PANKIA. “ Publicacion trimestral editada por la asociación Jardín Botánica La Laguna” , Boletín informativo, Año XVI , Numero 1 , Enero- Marzo. 1997. San Salvador.

DOCUMENTOS DE INTERNET.

26. [http:// www.cancer.com](http://www.cancer.com) hoy.

27. [http:// www. Google.com.](http://www.Google.com)

28. [http:// www.Drpez.com.](http://www.Drpez.com)

29. [http://www.aquatic.unizar.es/htm.](http://www.aquatic.unizar.es/htm)

30. [http://www.ciudadfutura.net/peces/glosario.htm.](http://www.ciudadfutura.net/peces/glosario.htm)

31. [http://www.catie .ac. cr/ informacion/RMP/rev 63.](http://www.catie.ac.cr/informacion/RMP/rev63)

ANEXOS

ANEXO I
G L O S A R I O

G L O S A R I O .

ANTICANCERIGENO: Medicamento o tratamiento contra el cáncer.

ANTICONVULSIVANTE: o antiepiléptico, medicamento eficaz contra la epilepsia.

ANTIFEBRIL: Agente eficaz contra la fiebre.

ANTISEPTICO: Sustancias que se aplican a las personas o animales y que destruyen los microorganismos nocivos o que impiden la actividad de los mismos. Sustancia usada para lograr la desinfección.

ANTITUMORAL: Agente efectivo contra un sistema de tumor modelo in vivo; que implica selectividad contra tumores comparada con huesped.

ANTITUSIVO: Sustancia eficaz para calmar la tos.

BIOACTIVIDAD: Cualquier respuesta o reacción del tejido vivo.

CITOTOXICO: Agente tóxico para las células, no muestra efectos selectivos sobre células del cáncer y células normales.

COMPRESA: Lienzo con varios dobleces que se emplea para usos médicos.

CORTEZA: Parte exterior de un árbol, compuesto de varias capas que lo cubren desde sus raíces hasta la extremidad de sus ramas.

CRUSTACEO: Clase de artrópodo antenado de respiración branquial, cubierto generalmente de una caparazón dura o flexible y que tiene cierto número de patas dispuestas simétricamente.

CULTIVO: Prueba de laboratorio que implica el cultivo de células o microorganismos en un medio específico de crecimiento.

DESINFECCION: Reacción de eliminar los gérmenes nocivos para la salud.

DISOLVENTE: cualquier líquido en el que se puede disolver otra sustancia.

ECLOSION: Ruptura de la cáscara del cisto, donde el embrión entra en contacto directo con el medio externo.

EPILEPSIA: Enfermedad caracterizada por convulsiones y pérdida del sentido.

EXPECTORANTE: Sustancia usada para arrancar y arrojar por la boca, las flemas y secreciones que se depositan en los órganos respiratorios.

FARINGITIS: Inflamación de la faringe.

FLAVONOIDES: Pigmentos vegetales que tienen el esqueleto carbonoso C6-C3-C6. Se encuentran extensamente distribuida en las plantas tanto libres como glicosidos, estas ultimas contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas.

GINECEO: [verticilo](#) fértil femenino de las flores [hermafroditas](#) y de las femeninas. Está constituido por una serie de hojas transformadas, llamadas carpelos, que, arrollándose sobre sí mismas y soldando sus bordes, forman el pistilo de las flores, que es el verticilo más interno de las mismas.

GINECEO APOCARPICO: Es el órgano sexual femenino o verticilo más interno de la flor. Se encuentra situado en el centro de la flor, y compuesto por un conjunto de *carpelos* o megasporofitos. Éstos son en realidad unas hojas transformadas que se encuentran dobladas por su mitad, y en cuyo interior guardan una cavidad redondeada, el *ovario*, que alberga el óvulo que dará lugar a las semillas cuando éste sea fecundado. Se dice que el gineceo es *apocárpico*, si los carpelos encierran entre sí a los óvulos formando uno solo.

GLABRA: Calvo o lampiño.

GLUCOSIDOS: Diversos metabolitos que se desdoblán por hidrólisis en un azúcar y en una sustancia no azúcar o aglicona.

GLUCOSIDOS CARDIOTONICOS: Grupo de sustancias que se caracterizan por su acción sobre el músculo cardíaco aumentando su tono, excitabilidad y contractibilidad.

GRIPE: Enfermedad de origen vírico, de carácter epidémico con emisiones especialmente constantes.

HABITAT: Conjunto de factores ambientales en los que vivé, de un modo natural una determinada especie animal o vegetal.**INFECCION:** Penetración y desarrollo en el organismo de germen nocivos.

INFLORESCENCIA: Conjunto de las ramificaciones florales de una planta.

INSECTICIDA: Sustancia química con efecto negativo sobre la viabilidad o fertilidad de los insectos. Actualmente se utilizan sustancias normales del crecimiento de los insectos frente a los cuales estos no pueden ganar resistencia.

INTOXICACION: Estado de envenenamiento por un fármaco u otra sustancia tóxica.

LETAL: Capaz de producir la muerte.

METABOLITO: Sustancia producida por acción del metabolismo o que es necesaria para un proceso metabólico.

NAUPLIOS: Larva inicial de los crustaceos, insegmentada y con tres pares de apendices (antenas y mandibulas de los adultos).

OBLONGA: Más largo que ancho.

OVIPARO: Animal que pone huevos.

PARTENOGENETICAS: Modo de reproducción por división reiterada de células sexuales femeninas no fecundadas.

PEDICULICIDA: Para matar piojos.

SAPONINAS: Glicósido formado por una parte azúcar y una aglicona ó sapogenina. Material jabonoso encontrado en algunas plantas especialmente la janonera y determinados lirios.

TANINOS: Sustancias de naturaleza polifenolicas se encuentran ampliamente repartidas en todo el reino vegetal excepto en hongos, algas y líquenes, la acción que mejor los define es la astringencia.

TOXICIDAD: Grado en el que una sustancia es toxica. Enfermedad que se produce como consecuencia de la exposición de una toxina o a cantidades toxicas de una sustancia que no causa efectos adversos en cantidades menores.

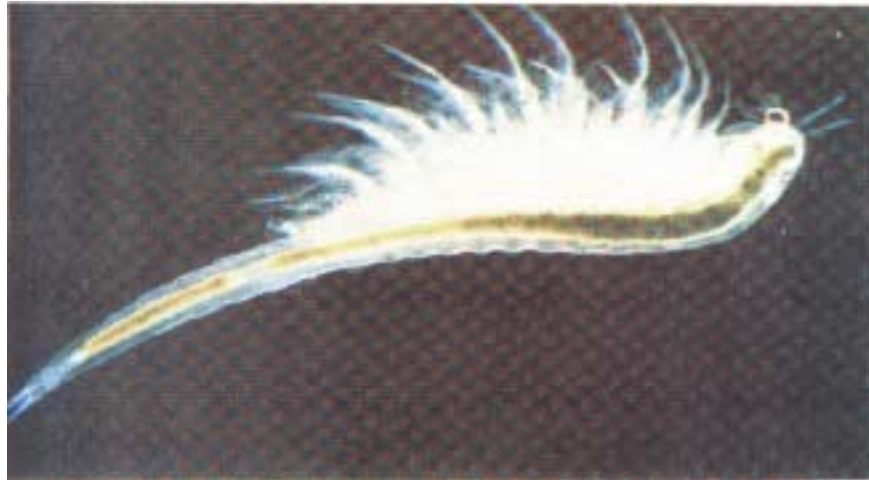
VIVIPARO: Animal que realiza su desarrollo embrionario en el interior del cuerpo de la madre.

ANEXO II

Artemia salina.



La Artemía salina tiene dos pares de antenas, dos ojos compuestos sobre pedunculos y un tercer ojo pequeño en el centro de la cabeza.
Cuenta con 11 pares de extremidades.



Artemía Salina en estado adulto

ANEXO III

PREPARACION DE REACTIVOS PARA PRUEBAS FITOQUIMICAS

PREPARACION DE REACTIVOS UTILIZADOS EN PRUEBAS FITOQUIMICAS.

- Determinación de Alcaloides:

Dragendorff: Se disuelven 8.0 gramos de sub-nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico y 27.2 gramos de yoduro de potasio en 50 ml de agua. Se mezclan las dos soluciones y se dejan reposar 24 horas. Se decanta la solución y se afora con agua a 100 ml, la presencia de un precipitado anaranjado-marrón indica prueba positiva para alcaloides.

Mayer: : Se disuelven 1.36 gramos de cloruro de mercurio en 60 ml de agua y 5 gramos de yoduro de potasio en 10 ml de agua ; Se juntan las dos soluciones y se aforan a 100 ml. La presencia de un precipitado blanco amarillento indica prueba positiva para alcaloides.

Wagner: Se disuelven 1.27 gramos de yodo y 2 gramos de yoduro de potasio en 20 ml de agua, la solución se afora a 100 ml con agua destilada. La presencia de precipitado café o marrón indica prueba positiva para alcaloides en general.

- Determinación de Antraquinonas :

Borntrager : Se mezclan 10 ml de hidróxido de potasio 0.5 N y 1 ml de peróxido de hidrógeno al 6%. Las antraquinonas colorean de rojo la capa alcalina.

- Determinación de Glicósidos Saponínicos :

Lieberman-Buchard : Mezclar 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo, enfriar a cero grados centígrados y adicionar gotas de ácido sulfúrico concentrado. Si hay formación de color azul, verde, rojo, anaranjado, etc, que cambia con el tiempo, la prueba es positiva.

Salkowski : 1 ml de cloroformo se pone en contacto con 1 ml de ácido sulfúrico ;la presencia de los glicósidos saponínicos se verifica mediante la formación de un anillo color rojo.

- Determinación de Glicósidos Cardiotónicos :

Lieberman-Buchard : (ver determinación de glicósidos saponínicos)

Kéller-Killiani : Mezclar 1 ml de sulfato férico al 5 % con 99 ml de ácido acético glacial, tomar 1 ml de esta mezcla y adicionarle de 1-2 gotas de ácido sulfúrico . Si la prueba es positiva aparecerá un anillo color rojo.

- Determinación de Sesquiterpenlactonas :

Baljet : Formado por la solución A y solución B.

Solución A : es un gramo de ácido pícrico en solución etanólica (100 ml de etanol).Solución B : Son 10 gramos de hidróxido de sodio en 100 de agua.

Legal : Mezclar de 2-3 gotas de piridina con 3 gotas de solución de nitroprusiato de sodio 0.5 % (reciente) y 3 gotas de hidróxido de sodio 2N.

Siendo prueba positiva la formación de un color rojo intenso.

ANEXO IV

CALCULOS DE OBTENCION DEL PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE Artemia salina.

OBTENCION DEL PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE Artemia salina PARTIR DE DATOS EXPERIMENTALES. A

Número de Nauplios de Artemia salina vivas encontrados después de la realización del bioensayo, partiendo de 15 Artemias para cada micropozo.

Ejemplo : Fracción de Tempate en metanol.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
A	0	0	0	0
B	0	0	1	0
C	0	0	3	3
D	1	0	4	4
E	2	2	6	6
F	3	4	7	7
G	5	6	7	8
H	9	9	8	8

Haciendo uso de la fórmula para encontrar el porcentaje de mortalidad de Artemia salina :

$$\frac{\% \text{ de mortalidad de } \underline{\text{Artemia salina}}}{\sum \text{ de nauplios muertos de cada ensayo.}} \times 100 = \frac{\sum \text{ total de nauplios utilizados en cada ensayo.}}{\sum \text{ de nauplios muertos de cada ensayo.}} \times 100$$

$$A) \frac{15+15+15+15}{60} \times 100 = 100\%$$

$$B) \frac{15+15+14+15}{60} \times 100 = 98.93\%$$

$$C) \frac{15+15+12+12}{60} \times 100 = 90\%$$

$$D) \frac{14+15+11+11}{60} \times 100 = 85\%$$

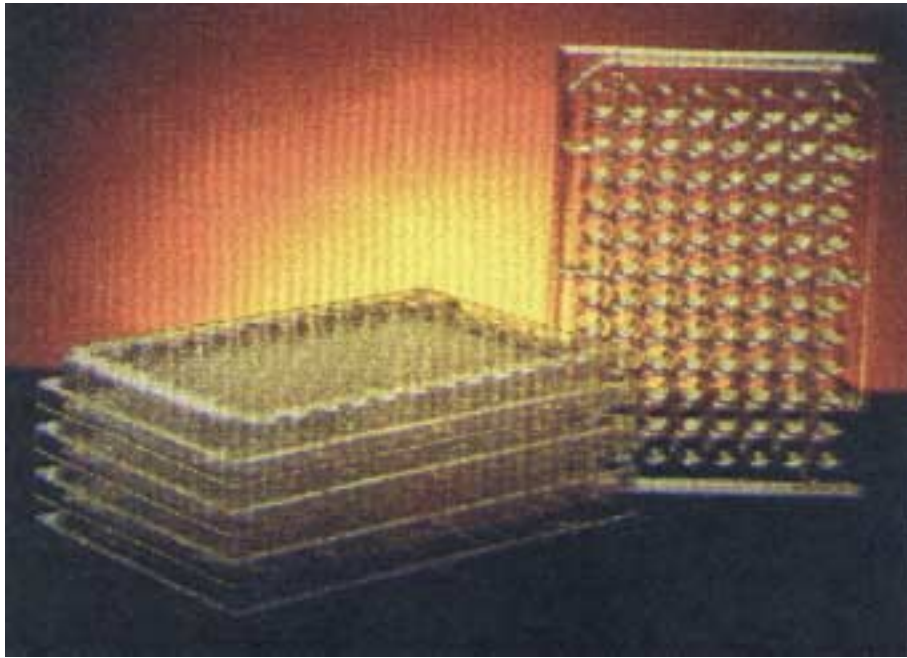
$$E) \frac{13+13+9+9}{60} \times 100 = 73.33\%$$

$$F) \frac{12+11+8+8}{60} \times 100 = 65\%$$

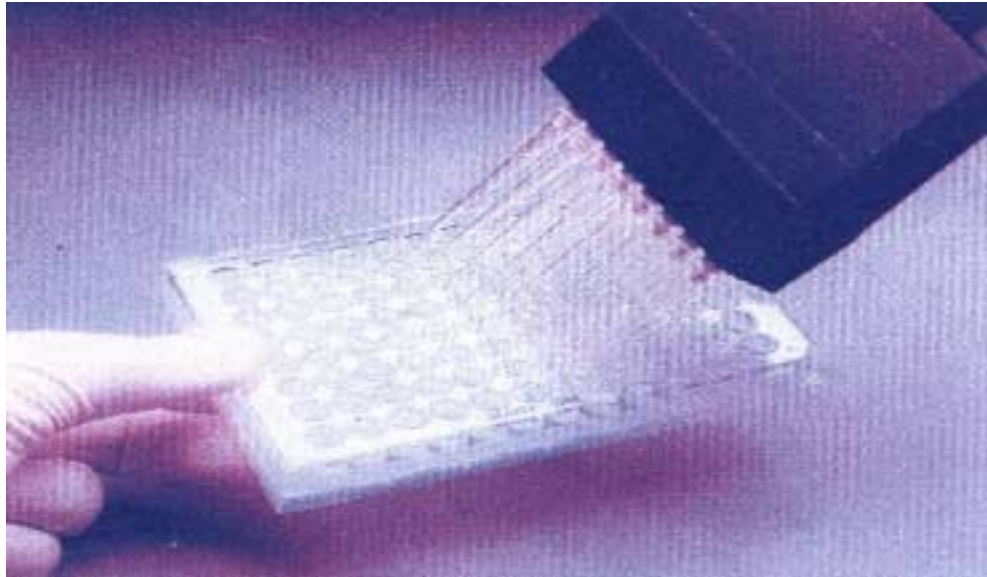
$$G) \frac{10+9+8+7}{60} \times 100 = 56.56\%$$

$$H) \frac{6+6+7+7}{60} \times 100 = 43.43\%$$

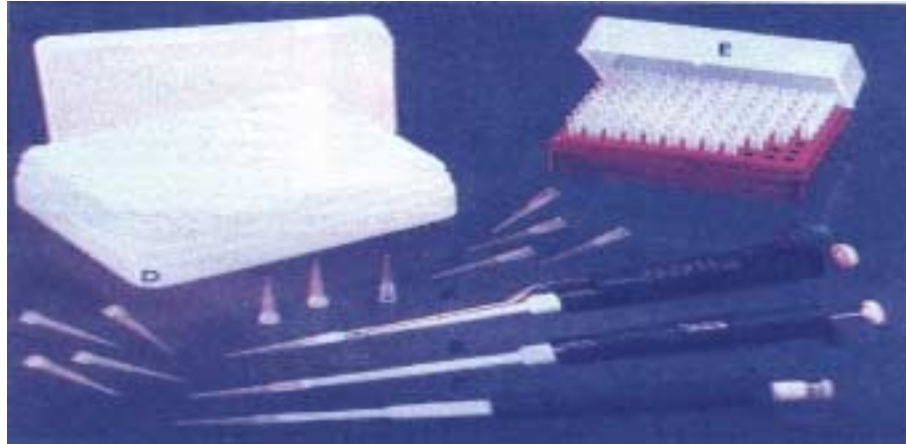
ANEXO V
CRISTALERIA Y EQUIPO



MICROPLATOS utilizados para realizar las diluciones de las muestras, los patrones y los blancos en el bioensayo de mortalidad de Artemia salina



MICROPIPETA DE OCHO CANALES utilizada en el llenado de los microposos en los bioensayos de mortalidad de Artemia salinas.



MICROPIPETAS REGULARES (A yB) y fijas © con sus respectivas puntas descartables (Dy E) utilizadas en el bioensayo de mortalidad de Artemia salina



ESTEREOSCOPIO utilizado para realizar el recuento de Artemias salinas muertas y vivas en cada bioensayo de las diferentes fracciones



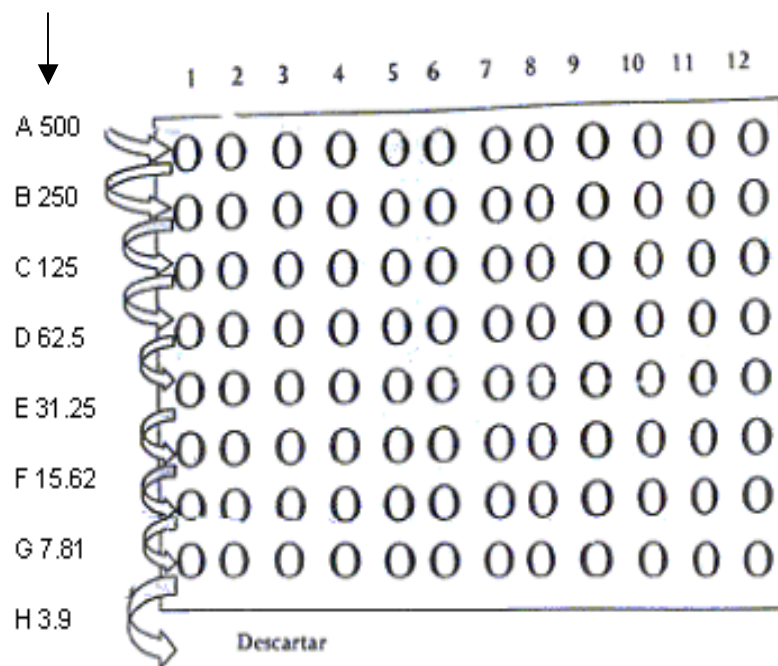
HIDROMETRO usado para medir el grado de salinidad del agua de mar utilizada para lo oclusión de los huevos de Artemia salina.

ANEXO VI

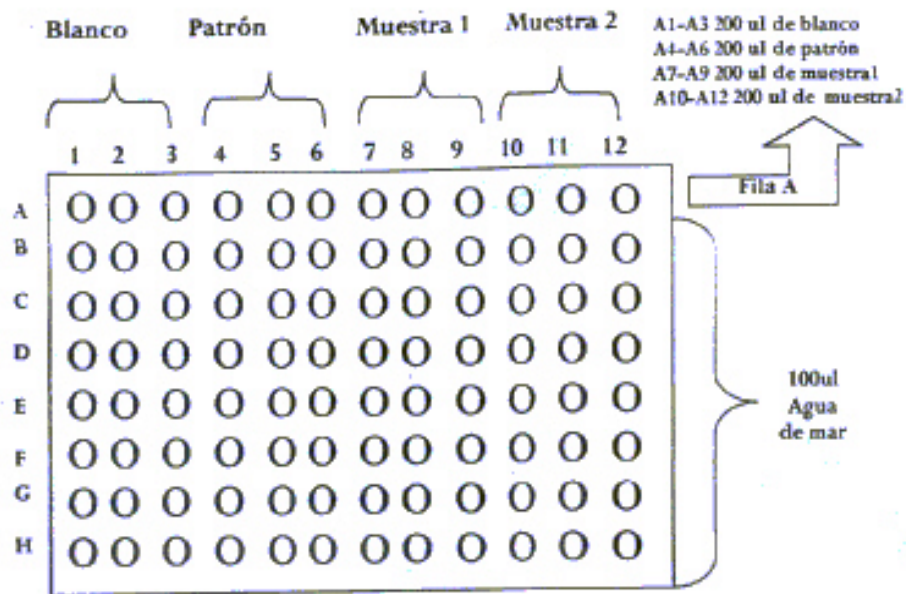
ESQUEMA DEL MICROPLATO
UTILIZADO EN EL BIOENSAYO.

DILUCIONES GEOMÉTRICAS.

La concentración del pozo A es de 500 microgramos por mililitro, al pasar al pozo B su concentración es de 250 microgramos por mililitro y así sucesivamente.



Adicionar 100 ul de la suspensión que contenga entre 10 y 15 nauplios a todos los pozos
Tapar el plato e incubar a 22-29 grados Celsius durante 24 horas.



La figura representa un plato de 96 micropozos de 300 ul, excepto en la línea A, en todos los micropozos se colocaron 100 ul de agua de mar.

En los pozos A1, A2 y A3 se colocaron 200 ul de solución blanco.

En los pozos A4, A5 y A6 se colocaron 200 ul de solución patrón.

En los pozos A7, A8 y A9 se colocaron 200 ul de solución muestra.

En los pozos A10, A11 y A12 se colocaron una segunda muestra.

Usando una pipeta de 8 canales a lo largo de la línea A (pozos del A1 al A8), se removieron 100 ul de la solución y se colocaron en la línea B, mezclado por succiones repetidas de la solución.

Luego se removieron 100 ul de ésta línea y se colocaron en la línea C y se mezclaron; se repitió este procedimiento hasta el final del plato.

Al final se quedaron 100 ul de solución que se descartaron.

Se repitió este procedimiento para las columnas 9 a 12.

Todos los micropozos contienen 100 ul de solución.