

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**



**DETERMINACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD CITOTÓXICA DE
EXTRACTOS DE 25 ESPECIES VEGETALES DE USO MATERNO
INFANTIL MEDIANTE ENSAYO SIMPLE CON
Artemia salina.**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR
RENE OSWALDO CEA LEMUS
WILLIAN ISAÍAS HERRERA AMAYA**

**PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA Y FARMACIA**

MARZO 2002

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMÉRICA



© 2001, DERECHOS RESERVADOS

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

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rectora

Dra. María Isabel Rodríguez.

Secretaria General

Licda. Lidia Margarita Muñoz Vela

Facultad de Química y Farmacia

Decana

Licda. Maria Isabel Ramos de Rodas.

Secretaria

Ana Arely Cáceres Magaña.

San Salvador, El Salvador

Asesores

Licda. Rhina Antonieta Toledo Mendoza

Licda. Arely Cáceres Magaña

Jurado Calificador

Licda. Maria Concepción Odette Rauda Acevedo.

Licda. Mercedes del Carmen Gomez de Diaz.

Licda. Norma Esthela Molina de Pacheco.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecemos a Dios todo poderoso por prestarnos salud para llevar a cabo esta investigación y de manera especial a las siguientes personas e institución quienes nos brindaron su apoyo:

- Asociación de Promotores Comunales Salvadoreños. APROCSAL.
- Coordinadora del Área de Investigación de APROCSAL. Licda. Sandra Guerrero.
- A nuestros Jurados Licda. Maria Concepción Odette Rauda Acevedo, Licda. Mercedes del Carmen Gómez de Díaz y Licda. Norma Esthela Molina de Pacheco.
- A la Licda. Rhina Antonieta Toledo Mendoza y Licda. Arely Caceres Magaña por su confianza, enseñanza y orientación brindada como nuestras asesoras.
- Nuestra querida compañera y amiga Licda. Ena Edith Salazar.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera nos brindaron su ayuda de forma desinteresada, finalmente gracias.

Rene Cea Lemus y Willian Herrera.

DEDICATORIA

Dedico esta humilde investigación primeramente a un gran AMIGO, ya que sin el nada es posible, nada existiría, gracias Dios mio.

- A mi madre a quien amo infinitamente: Gladis Alicia Lemus.

- A mi Abuela: Medarda Lemus.

- A mi tío: Mauricio Lemus.

- A mi hermana a quien amo infinitamente: Ana Lemus

- A mi hermano a quien amo infinitamente: Luis Armando Lemus, donde quiera que se encuentre.

- A todos mis compañeros y amigos con mucho cariño.

MUCHAS GRACIAS.

Rene Cea Lemus

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a Aquel que es poderoso, que me a dado la vida, salud, sabiduría, nuevas fuerzas cada día y paciencia para lograr mis metas. Al unico y sabio nuestro **Dios.**

A mis Padres: Isaías Herrera Vallecillos y Blanca Ruth Amaya Privado, por brindarme su apoyo, amor, confianza y por estar con migo siempre. a quienes amo con todo mi corazón.

A mis Hermanos: Liseth Eunice Herrera Amaya y Erick Alcides Herrera Amaya, por su confianza y apoyo. a quienes amo con todo mi corazón.

A mi Abuela: Maria Luisa Vallecillos por estar siempre a mi lado y darme su confianza y apoyo.

A mi Abuelo: José Antonio Herrera que en paz descansa.

A mis Tías: Sonia Herrera de Castro, Rosa Eunice Amaya, Oralia Amaya y Judith Amaya, por su confianza y apoyo.

A mis Primos: Claudia, Asdrúbal, Reina, Arturo, Alba y Reina Amaya. por su confianza y apoyo.

A mi Amigo: Lic. Aníbal Moran.

A mi compañero de tesis por su confianza y apoyo, así como también a todos los amigos que de alguna manera colaboraron para la realización de este trabajo.

Dios les bendiga siempre, los quiero a todos.

Willian Isaías Herrera Amaya.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	
CAPITULO I: INVESTIGACIÓN BIBLIOGRAFICA	5
1. MONOGRAFÍAS DE SEIS ESPECIES VEGETALES	6
1.1 <u>Punica granatum</u> (<i>Granado</i>).	6
1.2 <u>Rauwolfia tetraphylla</u> (<i>Amatillo</i>).	9
1.3 <u>Murraya paniculata</u> (<i>Mirto</i>).	13
1.4 <u>Catharanthus roseus</u> (<i>Chula</i>).	15
1.5 <u>Ricinus communis</u> (<i>Higuerillo</i>).	17
1.6 <u>Paspalum notatum</u> (<i>Gramma</i>).	21
2. GENERALIDADES DE METABOLITOS SECUNDARIOS INVESTIGADOS	23
2.1 Alcaloides.	23
2.2 Glicósidos cardiotónicos.	24
2.3 Glicósidos saponínicos.	25
2.4 Flavonoides.	26
2.5 Sesquiterpenlactonas.	27
2.6 Antraquinonas	27
2.7 Taninos	28
3. GENERALIDADES SOBRE BIOENSAYOS.	30
3.1 Ensayos in vivo	31
3.2 Ensayos in vitro	31

4.	GENERALIDADES DE LA <u>Artemia salina</u> .	33
4.1	Biología de <u>Artemia salina</u>	33
4.2	Cultivo de la <u>Artemia salina</u>	35
	4.2.1 Condiciones optimas de calidad de agua.	35
4.3	Otras investigaciones hechas con Artemia salina.	37
CAPITULO II: PARTE EXPERIMENTAL		38
1.	RECURSOS MATERIALES.	39
1.1	<u>Artemia salina</u> .	39
1.2	Especies vegetales	39
1.3	Material.	40
1.4	Equipo.	41
1.5	Reactivos.	41
2.	METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS.	44
2.1	Recolección y preparación de las plantas.	44
2.2	Obtención de los extractos.	45
2.3	Pruebas de Identificación Fitoquímica Preliminar.	45
	2.3.1 Ensayo para determinar Alcaloides.	46
	2.3.2 Ensayo para determinar Antraquinonas.	46
	2.3.3 Ensayo para determinar Glicósidos saponínicos.	47
	2.3.4 Ensayo para determinar Glicósidos cardiotónicos.	47
	2.3.5 Ensayo para determinar Flavonoides.	48
	2.3.6 Ensayo para determinar Sesquiterpenlactonas.	49
	2.3.7 Ensayo para determinar Taninos.	50
2.4	Bioensayo.	51
	2.4.1 Preparación del medio de cultivo.	51

2.4.2	Preparación de los nauplios.	51
2.4.3	Preparación de la muestra.	52
2.4.4	Ensayo.	53
2.4.5	Lectura de resultados.	55
2.4.6	Calculo de la concentración letal 50.	55
CAPITULO III: RESULTADOS		56
CAPITULO IV: DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS		89
1.	Discusión de Análisis Fitoquímico Preliminar.	90
2.	Interpretación de Resultados del Análisis Fitoquímico Preliminar.	91
3.	Discusión de Resultados Sobre el Bioensayo.	93
4.	Interpretación de Resultados del Bioensayo.	94
CAPITULO V: CONCLUSIONES		98
CAPITULO VI: RECOMENDACIONES		102
BIBLIOGRAFÍA		
GLOSARIO		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N° 1. Resultados de Análisis Fitoquímico Preliminar de Alcaloides y Sesquiterpenlactonas.	57
Tabla N° 2. Resultados de Análisis Fotoquímico Preliminar de Saponinas, Antraquinonas y Flavonoides.	58
Tabla N° 3. Resultados de Pruebas Fitoquímicas de Taninos.	59
Tabla N° 4. Resultados de Pruebas Fitoquímicas de Glicósidos cardiotónicos.	60
Tabla N° 5. Cuadro resumen de Componentes Químicos de las especies estudiadas	61
Tabla N° 6. Resultados de Bioensayo en triplicado con <u>Artemia salina</u> . (Expresados en %).	62
Tabla N° 7. Calculo de la concentración letal 50 (LC50).	63

INDICE DE GRAFICAS

	Pag.
Grafica N° 1 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Jatropha curcas</u> (Tempate)	64
Grafica N° 2 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Rauwolfia tetraphilla</u> (Amatillo)	65
Grafica N° 3 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Ocimum bacilicum</u> (Albahaca)	66
Grafica N° 4 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Solanum nigrum</u> (Hierba mora)	67
Grafica N° 5 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Zingiber officinalis</u> (Jengibre)	68
Grafica N° 6 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Lippia alba</u> (Salvia santa)	69
Grafica N° 7 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Bursera simarouba</u> (Jiote)	70
Grafica N° 8 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Catharantus roseaus</u> (Chula)	71
Grafica N° 9 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Yucca elephantipes</u> (Izote)	72
Grafica N° 10 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Punica granatum</u> (Granado)	73
Grafica N° 11 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Hymenaea courbaril</u> (Copinol)	74
Grafica N° 12 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Tridax procumbens</u> (Hierba del toro)	75
Grafica N° 13 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Sanseviria quineensis</u> (Curarían)	76
Grafica N° 14 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Justicia carthaginensis</u> (H. del susto)	77
Grafica N° 15 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Lycopersicum esculentum</u> (tomate)	78
Grafica N° 16 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Plunchea odorata</u> (Siguapate)	79
Grafica N° 17 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Paspalum notalum</u> (Grama)	80
Grafica N° 18 Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Murraya paniculata</u> (Mirto)	81

Grafica N° 19	Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Chenopodium ambrosoides</u> (Epazote)	82
Grafica N° 20	Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Eugenia jambos</u> (Manzana rosa)	83
Grafica N° 21	Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Ricinus communis</u> (Higuerillo)	84
Grafica N° 22	Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Eryngium foetidum</u> (Alcapate)	85
Grafica N° 23	Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>La achillea millefolium</u> (Alhucama)	86
Grafica N° 24	Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Cassia grandis</u> (Carao)	87
Grafica N° 25	Calculo de LC50 con Artemia salina de <u>Guazuma ulmifolia</u> (Caulote)	88

RESUMEN

La investigación desarrollada, forma parte de un macroproyecto cuyo nombre es: “Determinación de la Bioactividad Mediante Bioensayos Simples” el cual tiene como objetivo primordial abordar la problemática concerniente a la relación riesgo-beneficio en el uso de algunas plantas, para tratar diversas patologías humanas. Contribuyendo al desarrollo y expansión de los conocimientos existentes en El Salvador, sobre los usos terapéuticos de especies vegetales, generando estudios preliminares que orienten a investigaciones más específicas sobre la toxicidad de estas.

El trabajo se desarrolló en dos etapas:

1. Investigación Bibliográfica
2. Investigación de campo

Etapas 1. Investigación Bibliográfica

Esta etapa comprende la investigación teórica de las especies vegetales y las 6 monografías de: Catharantus roseaus (Chula), Rauwolfia tetraphylla (Amatillo), Ricinus communis (Higuerillo), Paspalum notalum (Gramma), Punica granatum (Granado), Murraya paniculata (Mirto), sus generalidades, usos terapéuticos populares y recetas folklóricas. Determinando los principales usos medicinales, parte de la planta con mayor uso curativo, las aplicaciones más conocidas y su dosificación.

Etapa 2. Investigación de campo

Esta parte se divide en recolección de las plantas y la investigación de laboratorio. La recolección de las plantas se realizó en las comunidades de los naranjos y el matazano de la zona occidental y los departamentos de San Salvador y La Libertad.

La Investigación de Laboratorio se divide básicamente en dos partes:

- a. Análisis fitoquímico preliminar
- b. Bioensayo

a. Análisis fitoquímico preliminar

En ésta se realizó el estudio de las 25 especies vegetales mediante pruebas químicas de caracterización que permiten la identificación de los diferentes metabolitos, los cuales son extraídos de las plantas, por medio de extractos etanólicos, los cuales sirvieron de base para determinar la presencia de: Alcaloides, Glicósidos Cardiotónicos, Glicósidos Saponínicos, Antraquinonas, Sesquiterpenlactonas, Taninos y Flavonoides.

b. Bioensayo

Etapa en la cual se empleo la Artemia salina para determinar la actividad citotóxica de 25 especies vegetales de uso materno infantil, como también la determinación de la concentración letal 50(LC50) haciendo uso de un programa computarizado.

INTRODUCCIÓN

En tiempos pasados las plantas o cualquier tipo de extracto vegetal poseía un valor apreciado tanto por su poder curativo y alimenticio; pero al transcurrir el tiempo y tomando en cuenta el desarrollo industrial éste valor aparentemente fue disminuyendo, lo cuál no involucra que las propiedades curativas y alimenticias desaparecieran. En tiempos modernos las plantas o sus extractos presenta una mayor utilidad en el área de la cosmética, sin embargo ha sido evidente el resurgimiento de la utilización de las plantas como una posible o segura fuente de curación y en algunos casos para prevenir las enfermedades.

Dicho resurgimiento es muy importante, pero al mismo tiempo ha ocasionado que el ser humano haga un uso indiscriminado de las plantas, lo cual puede causar daño a la salud a un corto, mediano o largo plazo; por tal razón es indispensable y apremiante un estudio detallado y minucioso sobre su poder curativo así como de su toxicidad. Este estudio es parte de un macroproyecto denominado: “Determinación de la Bioactividad Mediante Bioensayos Simples” . Dicha información será proporcionada por una serie de bioensayos, los cuales son: Artemia salina, determina la citotoxicidad de extractos de especies vegetales a diferentes concentraciones; ADN, que determina la acción que tienen los extractos sobre la cadena de ADN en una disminución en su pico de la grafica; Aedes aegypti, determina el poder larvicida que poseen los extractos a diferentes concentraciones y Actividad Antimicrobiana, determina el poder antimicrobiano que poseen los extractos a diferentes concentraciones.

El estudio con Artemia salina como las demás partes que conforman el macroproyecto es de suma importancia, pues, éste mostrará resultados que servirán de pauta sobre la toxicidad o no de los extractos de las 25 plantas en las células humanas, lo anterior se evalúa por la reconocida similitud en el comportamiento de la Artemia salina con las células del ser humano, además por su fácil reproducción y manejo.

Este crustáceo presenta cuatro estadios en su ciclo de vida como son: cisto, nauplio, juveniles y adultos, lo que facilita su manejo, puesto que puede permanecer en estado latente de cistos secos. Evidentemente éste estudio es muy amplio, pero hay que realizarlo ya que sin importar si las plantas son seguras o no las personas las están empleando para cualquier tipo de síntoma ó enfermedad.

Este estudio se realizó en seis capítulos, mostrando en el Capítulo I: las monografías de seis especies vegetales: Catharantus roseus (Chula), Rauwolfia tetrafilla (Amatillo), Murraya paniculata (Mirto), Ricinus communis (Higuerillo), Paspalum notatum (Gramma), Punica granatum (Granado). Donde se observan sus generalidades botánicas, como también sus usos terapéuticos populares y recetas folklóricas, un breve resumen sobre los metabolitos investigados en las especies vegetales y sobre la Artemia salina.

El capítulo II presenta los métodos y procedimientos desarrollados en la investigación, el capítulo III expone los resultados obtenidos durante todo el proceso, encontrando que, la mayoría de los extractos vegetales a altas concentraciones (1000, 500 µI) presentan efecto tóxico sobre la Artemia salina, exceptuando el Chenopodium ambrosoides (Epazote), Ricinus

communis (Higuerillo), Eryngium foetidum (Alcapate), Laandula officinalis (Alhucema), y Guazuma ulmifolia (Caulote), Cassia grandis (Carao), Eugenia jambos (Manzana rosa).

El capítulo IV comprende análisis y discusión de resultados, sirviendo esto de base para el capítulo V y VI, en los cuales, se exponen conclusiones y recomendaciones de la investigación.



© 2001, DERECHOS RESERVADOS

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

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

MONOGRAFÍAS DE SEIS ESPECIES VEGETALES

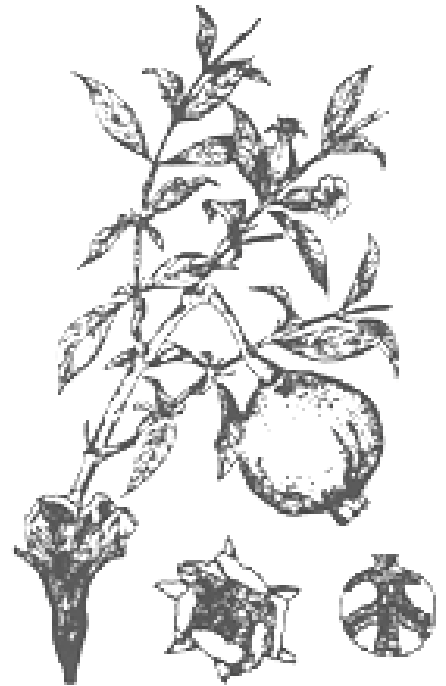
1.1 *Punica granatum*.

FAMILIA: Punicaceae, Horaninow, 1834

Nombre Botánico: *Punica granatum* L.

Sinónimos: *Malus punica*, *Punicum malun*

Nombres Comunes: Granado(la planta),
granada(el fruto)(15)



ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Es una especie nativa de Paquistán, pero cultivada por su fruta, en la mayoría de regiones tropicales y subtropicales o en regiones de temperaturas cálidas. Plantada comúnmente en Guatemala, frecuentemente en diversas alturas, excepto en las muy altas, pero únicamente en pequeñas cantidades.(15)

DESCRIPCIÓN

Es un arbusto o un arbolito de 6 mts. o menos, usualmente ramificado desde la base, algunas veces con un corto tronco, la corteza delgada, gris-cafeuzca. Las hojas son cortamente pecioladas, elípticas a oblongas u oblongo-lanceoladas, de 2-6 cms. de

largo, con ápices obtusos, atenuadas en la base, glabras. Sus flores son Pétalos obovalados a suborbiculares, de 1.5-2.5 cms. de largo, rojo encendido. Los frutos de 5-10 cms. de diámetro, la pulpa blanca o rozada. (15)

COMPOSICIÓN QUÍMICA

La corteza del tronco contiene alcaloides (pelletierina, metilpelletierina) y taninos (22%); la corteza de la raíz contiene alcaloides (pelletierina, metilpelletierina, pseudopelletierina, isopellieterina)⁽⁶⁾, taninos(20%), como pailoilpuncalina, punicafolina, punicalagina y punicalina. El pericarpio del fruto contiene ácido gálico, isoquercitrina, varios elagitaninos, pectina, taninos (14-24%); el fruto contiene glucosa, fructosa, sucrosa y maltosa. Las hojas contiene 2-(2-propenil)A'-piperideina.⁽²⁾

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los extractos acuoso y etanólico del epicarpio del fruto son activos contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes* y *Staphylococcus viridans*, no así contra *Staphylococcus pneumoniae* y *Staphylococcus Diptheriae*. Los extractos acuosos de tallo, hojas y flores tienen actividad antibacteriófago. La corteza de la raíz es antihelmíntica, principalmente tenífuga, que según la dosis puede producir parálisis o muerte de la tenia.

Los extractos etanólico y acetónico de la planta son activos contra organismos fitopatógenos como bacterias (*Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*), hongos (*Colletotrichum falcatum*, *Pyricularia oryzae*, insectos (*Plutella xylostella*) y moluscos.(2)

USOS MEDICINALES POPULARES

La decocción de la corteza del tronco o raíz se usan para expulsar tenia. La decocción de cáscara del fruto se usa para tratar afecciones gastrointestinales (diarrea, disentería, gastralgia, parásitosis) y catarros respiratorios, metrorragia y blenorragia. El jugo del fruto en jarabe se usa para expulsar parásitos, hipertensión, artritis, enfermedades urinarias, ictericia, diabetes. (2)

RECETAS FOLKLÓRICAS

- Se machaca un gema de la cáscara y se pone a hervir con agua o leche y se toma un vaso 3 veces al día para diarreas y disenterías.
- Se destripa una perlita del fruto en los ojos todos los días, cuando hay cataratas.

(10).

1.2 Rauwolfia tetraphylla

FAMILIA: Apocynaceae A. L. de Jussieu, 1789

Nombre botánico: Rauwolfia tetraphylla L. (1753)

Sinónimos R. heterophylla Roem & Schult. (1819); R. Tomentosa Jacq., R. canescens var. glabra Muell.-Arg. (1860); R. hirsuta Var. Glabra (Muell. -Arg) Woodson (1939); R. subpubescens L..



Nombres comunes: Señorita, viborilla, matacoyote, hierba de san José, amatillo (El Salvador); alcotán, cabamuc, chalchupa, curarina (Guatemala); coataco, guataco (Costa Rica); anguito, piñique (Colombia).(15)

ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

La especie es nativa de Guatemala, se encuentra en matorrales secos o húmedos, a menudo como maleza en terrenos sin cultivo. Localizada desde México, Belice a El Salvador y Panamá; Isla del Caribe y el norte de América del Sur. Introducida a la India.(15)

DESCRIPCIÓN

Es una hierba semileñosa, perenne, de 1mt. de alto o más baja, algunas veces un arbusto de 4 mts. Con un copioso látex blanco; usualmente muy ramificada, finalmente rubescente o a menudo casi completamente glabra, zona de vida es en bosques secos subtropicales.

Sus hojas son verticilos de 4, algunas veces de 3 ó 5, muy desiguales, firmemente membranosas, estrechamente oblongo-elípticas a ampliamente ovalado-elípticas u ovo balado-elípticas, de 2-13 cms. de largo, de 1-5 cms. de ancho, agudas u obtusas en el ápice, ampliamente agudas u obtusas en la base; pecíolos de 1-7 mm. de largo, glandulares. Sus flores de cáliz con lóbulos ovalados u ova-lanceolados, agudos o sub-obtusos, de 1.5-3 mm. de largo. Corola diminutamente puberulenta-papilada o glabra, el tubo de 2.5-4 mm. de largo, los lóbulos oblicuamente ovalado-redondeados, de 1-1.5 mm. de largo. Estambres insertos cerca de la mitad del tubo de la corola. La inflorescencia, condensada, mucho más corta que las hojas, de pocas o de muchas flores; pedicelos de 1-3 mm. de largo. Los frutos son una drupa subglobosa, de 5-8 mm. de diámetro empezando rojo y a la madurez, casi negra. (15)

COMPOSICIÓN QUÍMICA

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, isoreserpinina, raujemidina, reserpidina, reserpilina, reserpina, ruwolscina, tetrafilicina, tetrafilina, ∞ -yohimbina).(2)

ACTIVIDAD BIOLÓGICA son inactivos contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Estudios antifúngicos demuestran que la tintura de hojas no presenta actividad contra hongos patógenos (*Aspergillus flavus*, *Epidemophyton floccosum*, *Microsporium gypseum*) a 200 mg/ml.(2)

USOS MEDICINALES POPULARES

La decocción de la raíz se usa oralmente para tratar malaria, mordeduras de culebra, dolor de estomago, bajar la presión arterial, como depurador y febrífugo. La infusión de las hojas se usa para tratar disentería y malaria. La salvia o látex se usa en hidropesía y tos crónica; se aplica en ojos inflamados y edema; la corteza se usa para desintegrar muelas.

Tópicamente se usa el cocimientos de tallos o frutos machacados en emplastos para la mordedura de serpiente, piquete de avispas y alacranes; el cocimiento y hojas del 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 y erisipela; el extracto de la corteza con aceite sirve para curar sarna y otras afecciones cutáneas. El látex se usa para caries dentales, fortalecer las encías, colirio oftálmico y cicatrizal. Los frutos se usan para tratar tinea.

A la hoja, tallo, corteza y raíz se les atribuye propiedad febrífuga, antimalárica y sedante. A la savia o látex se le atribuye propiedad catártica, diurética, emética y expectorante. (2)

RECETA FOLKLÓRICA

- Se machacan las hojas y corteza y se les agrega agua caliente.

Se deja que despida toda la noche.

- Se hacen emplastos en la zona donde hay granos hasta que sanen. (2).

1.3 Murraya paniculata

FAMILIA: Rutaceae

Nombre Botánico: Murraya paniculata
(Linné) Jacquin.

Sinónimos: Murraya exótica linné,
Chalcas exótica millsp,
Chalcas paniculata linné.

Nombres Comunes: Mirto, Anguito, Cruceto, Fruta de Pava, Jazmín de Arabia, Limoncillo, Limonaria, Piñique. (EL Salvador); Limoncillo, Limonaria, Mirto. (Guatemala).(15)



ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

La planta es nativo del sudeste de Asia y Malaya, Cultivado en regiones tropicales y subtropicales.(15)

DESCRIPCIÓN:

Arbusto perennifolio, que alcanza una altura máxima de 3 m. ; se ramifica muy bajo en el tallo; hojas compuestas, pecioladas, alternas, pequeñas, de forma oblanceoladas, borde liso, haz verde oscuro, lustroso y verde olivo en el envés; flores blancas muy fragantes, pequeñas, reunidas en racimos. Los frutos son drupas bacciformes, color rojo, de mesocarpio carnoso y con dos semillas verduscas. (15)

USOS TERAPÉUTICOS POPULARES

- En Odontalgias
- Contra el veneno de serpientes
- Baja la tensión arterial (Hipotensor)(10)

RECETA FOLKLÓRICA

- Cuando hay dolor de muelas, se ponen a cocer 25 hojitas en 5 tasas de agua, cuando está tibio, se hacen enjuagatorios tres veces al día. (10)

1.4 Catharanthus roseus

FAMILIA: Apocynaceae

Nombre Botánico: Catharanthus roseus Linné

Sinónimos: Vinca rosea G. Don,
Lochnera rosea Reichemb,
Vinca speciosa Salisb,
Vinca gulielmi waldermarii
Klotzch.



Nombres comunes: Chula, Chuladita, Mulata (El Salvador); Maravilla de España, Paraguita, Vicaria (México); Chatas, Chatilla, Mosqueta, Vinca (Guatemala); Clavellina (Honduras); Dominia, Vicaria (Cuba); Chokolata, Cortejo, Viudita (Colombia); Boas noites (Brasil).(12)

ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Es probablemente originaria de Madagascar, pero en la actualidad está extendida en las regiones cálidas y se cultiva mucho como planta ornamental; crece profusamente en el sur de Florida. Se dice que puede venir de regiones tropicales del antiguo mundo (Europa)⁽⁹⁾, puede encontrarse desde México hasta Panamá así como el resto de América Tropical.⁽¹²⁾

DESCRIPCIÓN

Hierba perenne, con látex (contiene Alcaloides), erecta, usualmente de menos de 75 cm. de alto, con tallo erguido, ramificado; hojas opuestas, poco succulentas, cara superior brillante y glabra y la inferior opaca, de color mas claro; las flores son pedunculadas, terminales o axilares, colora blanca o rosado lila, provista de lóbulos ovalados; los frutos son folículos gruesos, cilíndricos, con numerosas semillas desnudas, subcomprimidas.(12)

COMPOSICIÓN QUÍMICA

A partir de *Catharantus roseus* se han aislado hasta la fecha unos 90 alcaloides; algunos, como ajmalicina, lochnerina, serpentina y tetrahydro-alstonina, existen en otros géneros de la familia. De especial interés es un grupo de unos 20 alcaloides dímeros, que comprende los que poseen actividad antineoplásica, entre ellos leurocristina (vincristina) y vincaleucoblastina (vinblastina). (5)

USOS TERAPÉUTICOS POPULARES

- Contra la ronquera, Laringitis
- Para curar afecciones de los ojos
- Anticanceroso(10)

RECETA FOLKLÓRICA

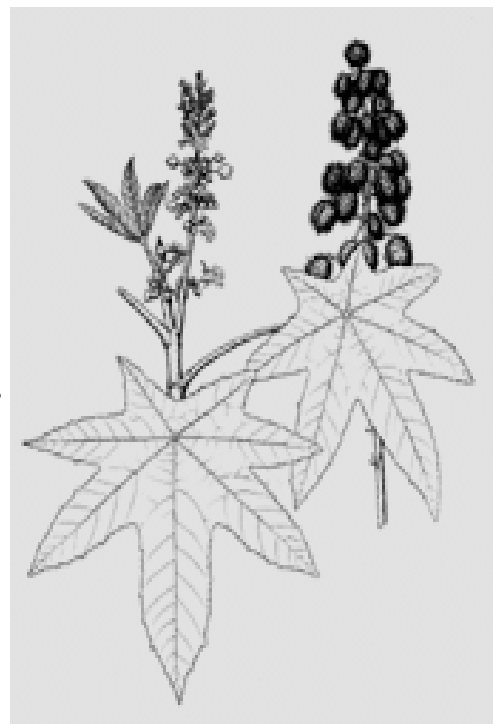
- Cuando hay ronquera y faringitis, se pone a cocer un manojito de flores con agua y se hacen gárgaras, por siete días. (10)

1.5 Ricinus communis

FAMILIA: Euforbiáceas

Nombre Botánico: Ricinus communis L.

Nombres Comunes: Higuero, Higuerrillo, Castor, Palma cristi.



ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Nativo de África tropical. Ahora sembrado y naturalizado en los trópicos y subtropicos alrededor del mundo. (17)

DESCRIPCIÓN

El higuierillo es un arbusto común que requiere bastante luz. Por eso, se encuentra a menudo en los campos abandonados donde invade temprano y luego forma un matorral denso.

El higuierillo es un arbusto o árbol pequeño, siempre verde, que alcanza una altura de 7 metros y un diámetro de 18 cm. tiene una copa rala e irregular. La corteza de color blanzusco a gris claro tiene puntos verrugosos blancos conspicuos en líneas verticales y cicatrices anulares en cada nudo. Hay una forma de esta especie en la cual los tallos jóvenes, ramas y pecíolos son de color rojo brillante. Las hojas son muy grandes partidas en lóbulos lanceolados. Las flores en racimos. Fruto capsular, esférico, espinoso con tres divisiones y otras tantas semillas coriáceas punteadas. (17)

COMPOSICIÓN QUÍMICA

La semilla contiene 40-55% de aceite, alcaloides (ricinina)⁽¹⁰⁾, ácido urico (60 mg/kg) y ácido cianhídrico(7 ppm); enzimas (amilasa, endotripsina, invertasa, lipasa, maltasa, oxidasa, ribonucleasa, cimógeno), diterpenos (casbeno), ácidos orgánicos (ascórbico, cítrico, fumárico, glicólico, málico, oxálico, succínico, tartárico), minerales y vitamina E. Las hojas contienen ácidos orgánicos (elágico, ferúlico, gálico, p-cumárico, shikímico), Flavonoides (rutina, quercetina, isoquercetina), son ricas en

nitrate de potasio y ricina; las hojas y tallo contienen ácido cianhídrico; la raíz contiene un derivado poliacetilénico. El tallo contiene un acetato de sapogenina esteroide.(2)

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Estudios antifúngicos demuestran que el extracto etanólico de hojas frescas tiene moderada actividad antifúngica (*Fusarium oxysporum*) y contra *Mycobacterium tuberculosis* y *Apergyllus niger*.

El polvo de las hojas y el aceite tiene actividad contra fitopatógenos, como fungicida (*Colletotrichum atramentarium*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum*), repelente de insectos (*Aleyrodes vaporariorum*, áfidos, *Locusta migratoria*, mosquitos), insecticidas (*Callosobruchus sinensis*, *Lespeyresia pomonella*, *Musca domestica*, *Oncopeltus fasciatus*, *Popillia japonica*) y nematocida (*Aphelenchus avenae*, *Ditylenchus cypei*, *Helicotylenchus erythrinae*, *Heterodera rostochiensis*, *Heterodera schachtii*, *Hoplolaimus indicus*, *Meloidigyne incógnita*, *Meloidigyne javanica*, *Pratylenchus delattrei*).

Se ha demostrado que el extracto etanólico de hojas tiene actividad hepatoprotectora, colerética en una forma dosis-dependiente, las hojas producen un efecto hipotérmico al aplicarse tópicamente.(2)

USOS MEDICINALES POPULARES

El aceite de semillas purificado de su principio tóxico se usa por vía oral para tratar afecciones gastrointestinales (anasarca, cólera, cólico, diarrea, estreñimiento) y respiratorias (asma, catarro, resfrió, tuberculosis), convulsiones, delirio, epilepsia, fiebre, hidropesía, sordera y uretritis: con aguarráz se administra para expulsar parásitos (tenia).

Las hojas humedecidas con vinagre se aplican en cataplasmas para aliviar el dolor de cabeza; en baños, enema, decocción y cataplasmas, se aplica en pediculosis, induraciones, tumores y verrugas. El aceite instilado intraocularmente previene el orzuelo, aplicado en diversas formas se usa para tratar abscesos, artritis, asma, cáncer, carbuncos, chancros, dermatitis, erisipelas, escrófulas, exantema, fracturas, gota, heridas, lepra, mialgia, raspones, prolapso, quemaduras, reumatismo, seborrea, tinea, torceduras, traumatismos, tumores y verrugas. La decocción de raíces se usa para lumbago, reumatismo y ciática.

Al aceite se le atribuye propiedad anodina, catártica, cianogenética, emenagoga, emética, emoliente, expectorante, galactogoga, insecticida, larvicida, laxante, purgante, tónica y vermífuga. (2)

RECETA FOLKLÓRICA

- Las hojas de las plantas se untan con el aceite de las semillas y se ponen sobre el estómago.
- Las hojas machacadas puestas en los lugares dolorosos, para quitar los dolores causados por los golpes. (10)

1.6 *Paspalum notatum*

FAMILIA: Poaceae (Gramineae)

Nombre Botánico: *Paspalum notatum*. Flüegge

Sinónimos: *Paspalum taphrophyllum*,
Paspalum saltense.

Nombre Común: grama, grama común, grama corriente,
grama nativa, grama negra, pasto manso,
zacate, (El Salvador); gengibrillo
(Costa Rica); pasto bahia (Colombia).(16)



ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Es una especie importada de Europa, distribuyéndose desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina.(8)

DESCRIPCIÓN

Perennes rizomatosas; rizomas gruesos, escamosos. Tallos 40-70 cm, erectos, simples; entrenudos glabros, comprimidos; nudos glabros. Vainas carinadas, glabras o ciliadas; lígula 0.2-0.5 mm; láminas 6-24 cm x 6-10 mm, lineares, aplanadas pero plegadas hacia la base, glabras, pero ciliadas hacia la base. Inflorescencia 3-10 cm, solitaria, terminal; racimos 2(3), 3-10 cm, conjugados, raramente con un tercero por debajo; raquis 0.7-0.9 mm de ancho, en zigzag, con una espiguilla en el ápice o a veces las espiguillas superiores abortivas. Espiguillas 3-3.8 x 2.3-2.8 mm, ovadas a obovadas, obtusas, glabras, solitarias, en 2 filas; glabras; gluma inferior generalmente ausente; gluma superior y lema inferior tan largas como la espiguilla, 5-nervias, glabras; flósculo superior 2.8-3.3 mm, endurecido, diminutamente estriado, pajizo, glabro; anteras 1.8-2 mm. (8)

USOS TERAPÉUTICOS POPULARES

- Vías urinarias.
- Hígado

- Golpes internos
- Cálculos biliares
- Diurético
- Limpiar sangre
- Vías urinarias(10)

RECETA FOLKLORICA

- Se deja en remojo la raíz con agua y se toma como “agua de tiempo” (10)

2 GENERALIDADES DE METABOLITOS SECUNDARIOS INVESTIGADOS

2.1 ALCALOIDES:

Estos constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas, con acción fisiológica mas o menos intenso sobre los animales, con escasas excepciones Ej. Efedrina, mecalina, tienen cuando menos un nitrógeno en un heterosido. Hay unos cuantos alcaloides de nitrógeno amielico que son neutros, como la colchicina, ricinina y otras, las bases púricas y pirimidínicas están excluidas del grupo de alcaloides por carecer de acción fisiológica notable y por sus relaciones bioquímicas con los ácidos nucleicos.

Aunque se han encontrado unos 50 alcaloides en órganos animales, solo 12 de estos no se han localizado en vegetales y por definición se acostumbra excluirlos del grupo. Los alcaloides aparecen en muy diversas familias de plantas, unos 256 en los hongos, algas y otros vegetales inferiores.

La mayoría de los alcaloides son sólidos incoloros, aunque algunos como la coniina y la nicotina son líquidos, otros son de color amarillo como la berberina; o rojos como la queliretrina, entre las reacciones que identifican a los alcaloides tenemos: Dragendorff, Mayer, Wagner.⁽⁴⁾

2.2 GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS :

Son sustancias amargas, derivadas de los esteroides que actúan sobre el corazón. La porción del azúcar contiene 3.5 moléculas de monosacáridos, por lo general, metilpentosas y desoxiazucres muy especiales. La glicona esteroidal, aunque toxica, no afecta el corazón, en ella hay varios hidroxilos, uno de ellos en el carbono 14 y otro en C-3 al cual siempre va unida la porción de azúcar.

Reacciones coloridas: La mayoría de las pruebas señalan la presencia de una aglicona esteroidal principalmente tipo cardenolido, ya que los esciladienolidos no dan la mayoría de estas pruebas, otros, como la de la antrona, indican si hay carbohidratos y las de keller – killiani y del xantidrol-9, si hay un desoxiazucar, también existen otras pruebas como la de raymond y tollen, como otros glicósidos, los cardiotónicos pueden estudiarse por cromatografía en papel whatman N° 1, o su equivalente, lo mismo que por cromatografía en capa delgada de gel de sílice G y un oxido de aluminio G.(4)

2.3 GLICÓSIDOS SAPONÍNICOS.

Se le da el nombre de saponina (de latín sapon: jabón) a un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de esta, por lo tanto, al sacudir sus soluciones, se forma una espuma abundante y relativamente estable. Por

hidrólisis de la saponina se obtienen carbohidratos y una aglicona llamada genéricamente sapogenina.

Las saponinas son sustancias muy polares, y es posible extraerlas en caliente o en frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular, los materiales lipoides presentes en estos extractos se separan con benceno. Al concentrar la solución alcohólica se separan las saponinas y después se cristalizan en mezclas de alcohol – agua, para obtener sapogeninas, se pueden hidrolizar las saponinas con sus enzimas naturales, con enzimas de origen microbiológico las saponinas y sapogeninas saturadas o con varios hidroxilos dan coloraciones con varios reactivos ácidos, de los empleados con los esteroides como el de Liebermann Burchard, Salkowski, Cloruro de Tionilo y Tricloruro de Antimonio, las saponinas dan positivas las pruebas para carbohidratos como la de Molish o la de la Antrona.⁽⁴⁾

2.4 FLAVONOIDES:

Los Flavonoides son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado C₆-C₃-C₆ como se encuentra en la flavonona, aurona, chalcona, flavona, flavananol, etc. Se conocen unos 200 flavonoides naturales; se encuentran extensamente distribuidos entre las plantas, tanto libres que como glicósidos; estos últimos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas.

Los Flavonoides son sintetizados por numerosos grupos de plantas y con excepción de algunas flavonas localizadas en las alas de mariposa, probablemente por ingestión se puede decir que no se les encuentran en animales.

Los diferentes tipos de Flavonoides se pueden identificar mediante reacciones coloridas y propiedades de solubilidad; cuando no hay interferencia de pigmentos no Flavonoides , el material vegetal se puede ensayar directamente, si los pétalos blancos de una flor se ponen amarillos en presencia de vapores de amoníaco, deben contener flavonas y/o flavonoles. Los extractos acuosos de pigmentos también muestran variaciones en color cuando se les adiciona un álcali, las flavonas y los flavonoles se ponen amarillos, las chalconas a púrpura rojizo y las antocianinas a azul.

Los extractos alcohólicos incoloros o ligeramente amarillos de un vegetal, se tratan con un trocito de magnesio y unas pocas gotas de ácido clorhídrico concentrado, observándose de inmediato un cambio de color dependiendo del flavonoide presente.(4)

2.5 SESQUITERPENLACTONAS

Poseen un esqueleto fundamental con 15 átomos de carbono que teóricamente deriva de la unión de tres fragmentos de isopreno (2- metilbutadieno – 1,3), cabeza, cola y algunos productos de transposición; parte del esqueleto es un anillo de metilbutenolido.

Las sesquiterpenlactonas se han encontrado principalmente en extractos de flores o partes aéreas de las compuestas, son sustancias amargas, se considera que su actividad citotóxica está relacionada con el grupo exometilenbutenolido y también que este grupo modifica el crecimiento de vegetales, entre los métodos de extracción tenemos: éter de petróleo – etanol, benceno, metanol y cloruro de metileno, presentando reacciones de coloración para su identificación como son: Reactivo de Baljet, Hidroximatos Férricos, Reactivo de Legal. (4)

2.6 ANTRAQUINONAS

Estos se conocían como un grupo natural de drogas purgantes, algunos colorantes vegetales y animales, como la rubia y la colchinilla, tuvieron gran importancia económica antes de la introducción de los colorantes sintéticos.

Los derivados antraquinónicos presentes en las drogas purgantes pueden ser dihidroxifenoles, como el crisofanol; trihidroxifenoles, como la emodina; o tetrahidroxifenoles, como el ácido carmínico.

Los derivados antraquinónicos suelen ser compuestos de color rojo-anaranjado, que en ocasiones puede observarse *in situ*, (como ocurre en los radios medulares del ruibarbo y cascara sagrada). Por lo general son solubles en agua caliente y alcohol diluido. El ensayo de Borntrager suele emplearse para su detección.(5)

2.7 TANINOS

El termino “tanino” se empleo por primera vez en 1796 para denominar ciertas sustancias presentes en extractos vegetales, capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero. De acuerdo con esta definición, un Tanino es una sustancia detectable cualitativamente mediante un ensayo de curtido (ensayo <goldbeater’s skin>) y se determina cualitativamente por su absorción sobre un polvo de piel estándar.

Aunque queda mucho por hacer para llegar al conocimiento completo de la química de los taninos, se suele establecer dos grandes grupos: como los taninos hidrolizables y los taninos condensados(proantocianidinas).

Taninos hidrolizables: pueden ser hidrolizados por ácidos ó enzimas como la tanasa, están formados por varias moléculas de ácidos fenolicos como el gálico y el elágico, que se unen por un enlace éster a un núcleo central de glucosa. Al igual que el ácido gálico sus soluciones toman color azul con sales de hierro, estos taninos se denominaron primeramente pirogálicos debido a que por destilación seca el ácido gálico y compuestos similares se convierten en pirogalol. Pueden establecerse dos tipos fundamentales de taninos hidrolizables, derivados, respectivamente, del ácido gálico y del elágico. Estos grupos se denominan galitaninos y elagitaninos.

Taninos condensados: estos comprenden todos los restantes taninos verdaderos. Sus moléculas son mas resistente a ruptura que las de los taninos hidrolizables y parece

ser intermediarios en su biosíntesis, las catequinas y los flavan-3, 4-dioles. Están por tanto relacionados con los pigmentos Flavonoides con estructura polimera flavan-3-ol. Mediante tratamiento con ácidos o enzimas pueden ser descompuestos en productos rojos e insolubles, llamados flabáfenos. Estos proporcionan su color rojo característico a muchas drogas, como la corteza de quina roja, que contiene estos flobataninos y sus productos de descomposición .

Pseudotaninos: estos son compuestos de menor peso molecular que los taninos verdaderos y no dan positivo el ensayo de la piel. Los taninos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, encontrándose, por lo general, en mayor cantidad en células muertas ó enfermas. Ejercen un efecto inhibitor sobre muchas enzimas, debido a la precipitación de las proteínas, contribuyendo, por lo tanto, a la función protectora de la corteza y leño.(5)

3. GENERALIDADES SOBRE BIOENSAYOS

El termino bioensayo define aquellos procedimientos de prueba realizados en unidades moleculares o células sencillas y en organismos mas complejos; con el objeto de reconocer e investigar la existencia de nuevas sustancias de origen natural capaces de ejercer efectos biológicos de tipo citotóxico, antitumoral o anticancerígeno principalmente.

Hoy en día existen una extensa lista de metodologías analíticas de bioensayos, que de acuerdo con los alcances que se logran al ser aplicadas, son de gran utilidad en el diseño general del procedimiento de prueba para investigaciones de este tipo. Han sido denominados de esta forma por el hecho que son flexibles a los cambios que el investigador considere convenientes a medida este realizando la investigación.

Los bioensayos son de alto costo y comprenden complejos sistemas de pruebas a corto y largo plazo; emplean unidades celulares u organismos de animales respectivamente, los cuales se han clasificado en :A)ensayos *in vitro*. B)ensayos *in vivo*.

Esta investigación tratará solamente lo referente al contexto de las pruebas in vivo, es importante señalar el punto donde nos enfrentamos con que estas series de pruebas por si solas son insuficientes para evaluaciones globales de toxicidades debido a la importancia de las interacciones: entre células, tejidos y órganos con sistemas morfofuncionales corporales que sólo pueden conseguirse en modelos animales.(7)

3.1 ENSAYOS IN VIVO.

Los ensayos in vivo, en el área del cáncer, se definen como aquellas pruebas en las que los blancos de experimentación los constituyen organismos complejos, básicamente en el descubrimiento de nuevas drogas que sirvan de opción en el tratamiento de dicha enfermedad.

3.2 ENSAYOS IN VITRO.

Los ensayos in vitro, en el área del cáncer, se definen como aquellas pruebas en las que los blancos de experimentación los constituyen cultivos celulares y/o unidades moleculares. Este tipo de ensayos se clasifican en dos grupos: ensayos celulares y ensayos moleculares.

Actualmente son pocos los procedimientos existentes para este tipo de ensayos moleculares; sin embargo los resultados que se han logrado a través de su aplicación son calificados como altamente específicos; en cambio para los ensayos celulares hay un gran número de procedimientos pero la mayoría son de poco interés precisamente por que sus resultados son poco específicos e implican una investigación más exhaustiva, para llegar a la conclusión de la misma.

En ambos tipos de ensayos, cabe la posibilidad de obtener falsos positivos; por ejemplo en los ensayos moleculares el más detectado es que el agente que muestre actividad positiva frente a la unidad sub-celular y luego al ser ensayado bajo procedimientos de prueba in vivo (organismos complejos) o in vitro (líneas celulares), resulte que es incapaz de entrar al interior

celular o que sea metabolizado antes de ingresar a la célula. En los ensayos celulares el mayor problema es que se manifiestan un gran número de materiales activos o toxinas ya conocidas que no son de interés, entre las cuales tenemos los metales pesados, detergentes, oxidantes no específicos.

Resultados falso negativos, también suele manifestarse cuando el compuesto ensayado aunque muestre bioactividad frente al blanco de experimentación, tal actividad no sea detectada, lo que probablemente se deba a que dicho compuesto actúe por otro mecanismo que este siendo bloqueado de alguna manera a través del procedimiento aplicado. Esta problemática suele manifestarse en ambos tipos de ensayos.

Otra de las ventajas de los ensayos moleculares es que su costo es relativamente bajo con relación al de los ensayos celulares. Sin embargo, los ensayos in vitro necesitan ser apoyados por ensayos in vivo.

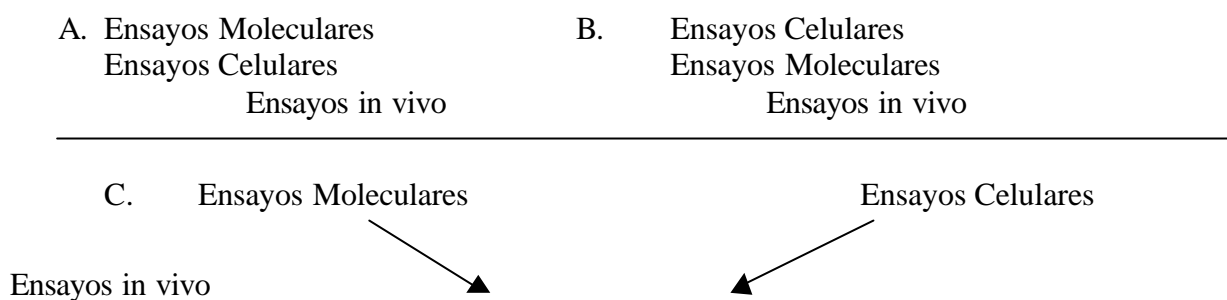


Figura N° 1 Combinación de usos de ensayos Celulares y Moleculares. (7)

4 GENERALIDADES DE ARTEMIA SALINA.

La Artemia. Es un crustáceo pequeño, comúnmente utilizado por los acuicultores como alimento vivo de peces, camarones y en casos menos frecuentes, como la parte viva de bioensayos, por su similitud con las células humanas.

La Artemia salina tiene varias características, las cuales la hacen ideal para sus usos, es decir, fácil manejo, porque se mantiene en estado latente en forma de cistos secos, los cuales pueden ser fácilmente almacenados, transportados. La Artemia es adaptable a altos rangos de condiciones ambientales, no es selectiva en su alimentación, debido a que es un animal puramente filtrador, es capaz de crecer a altas densidades, posee un largo ciclo de vida y tiene un alto valor nutritivo. 40-60 % (proteína).(3)

4.1 BIOLOGÍA DE ARTEMIA SALINA.

Clasificación sistemática

Phylum:	Arthropoda
Clase:	Crustácea
Subclase:	Branchiopoda
Orden:	Anostraca
Familia:	Artemiidae
Género:	Artemia sp.

Habitat Natural

En la naturaleza este crustáceo vive en condiciones de salinidad sumamente extrema, que puede variar de 60 a 200 ppt. En estas condiciones desarrolla una vida normal y no tiene competidores por el alimento ni depredadores.

Ciclo de Vida

La Artemia salina posee varios estadios en su ciclo de vida.

Cisto

Es un huevecillo de aproximadamente 200 a 300 micras de diámetro, puede mantenerse inactivo por algún tiempo, hasta obtener las condiciones óptimas para su eclosión.

Nauplio

Inmediatamente después de la ruptura de la membrana del cisto sale el nauplio, el cual mide aproximadamente 0.4 a 0.5 mm. y pesa aproximadamente 0.002 a 0.003 mg

Juveniles

Son pequeñas larvitas de aproximadamente 2 a 4 mm, las cuales nadan libremente. Se les observa un tracto digestivo funcional, un abdomen alargado y muchos apéndices bien diferenciados.

Adultos

Estos son de aproximadamente 8 a 10 mm, se les observa 11 pares de theracopodos muy bien diferenciados con antenulas sensoriales, un par de ojos laterales y tracto digestivo completo.(17)

4.2 CULTIVO DE ARTEMIA SALINA.

4.2.1 Condiciones óptimas de calidad de agua

Las condiciones de calidad del agua se verifican mediante la toma de diferentes parámetros:

Salinidad

La salinidad óptima a mantener en el estanque es de 120 a 150 partes por trillon, a esta salinidad la Artemia salina mantendrán un ciclo de vida normal y libre de depredadores.

Temperatura

La temperatura óptima oscila entre los 30 – 35 °C y durante la noche de 23 a 28 °C

pH

El pH del agua normal debe estar entre 7.5 a 8.9, un pH menor o mayor de este rango es letal para la Artemia salina.

Oxígeno Disuelto

La Artemia salina no requiere alto grado de oxígeno en el agua. Su rango está entre 1.5 y 3 mg./l

Amonia

Los niveles normales de amonia están entre 8 – 10 mg/l.

Nota: Debe tenerse en cuenta que estas condiciones no son fijas, ya que están íntimamente ligadas a las características de cada raza, variedad o cepa geográfica. (17)

4.3 OTRAS INVESTIGACIONES HECHAS CON ARTEMIA SALINA.

Se ha demostrado que el nuevo ensayo de microplato para probar la citotoxicidad de algunas drogas, utilizando Artemia salina, a dado resultados comparables con el método de los tubos; el cual presenta muchos inconvenientes: alto costo, utilizar gran cantidad de muestra y limitar el numero de diluciones de las muestras.

Para el ensayo de microplato se utilizó células KB (son del carcinoma humano nasofaríngeo) y la Artemia salina, detectando todos los componentes tóxicos a ambos casos en series de 21 agentes farmacológicamente activos (ejemplo: Actinomicina D, Cloranfenicol, Efedrina, Cafeína,...etc.) excepto para los que requieren activación metabólica humana,. Posteriormente este ensayo se realizo con extractos vegetales obteniéndose resultados satisfactorios.

Lo anterior es un reflejo de la similitud existente entre células humanas con la Artemia salina, sin olvidar el hecho que el DNA dependiente RNA polimerasa de la Artemia salina, a mostrado ser similar a la de los mamíferos. (13)

PARTE EXPERIMENTAL

1. RECURSOS MATERIALES

1.1 Artemia salina

1.2 Especies vegetales Ensayadas

Nombre científico

Nombre común

Bursera simarouba

Jiote

Cassia grandis

Carao

Catharantus roseaus

Chula

Chenopodium ambrosoides

Epazote

Eryngium foetidum

Alcapate

Eugenia jambos

Manzana rosa

Guazuma ulmifolia

Caulote

Hymenaea courbaril

Copinol

Justicia carthagenensis

Hierba del susto

Jatropha curcas

Tempate

La achillea millefolium.

Alhucema

Lippia alba

Salvia santa

Lycopersicum esculentum

Tomate

Murraya paniculata

Mirto

Ocimum bacilicum

Albahaca

Paspalum notalum

Gramma

Plunchea odorata

Siguapate

Punica granatum

Granado

Rauwolfia tetraphilla

Amatillo

Ricinus communis

Higuerillo

Sanseviria quineensis

Curarina

Solanum nigrum

Hierba mora

Tridax procumbens

Hierba del toro

Yucca elephantipes

Izote

Zingiber officinalis

Jengibre

Cristalería en general

1.3 *Material*

Beakers

Balones fondo redondo de 250 ml

Espátula y micro espátula

Hidrometro(anexo N° 2)

Jeringa(anexo N° 3)

Micropipeta de 100, 200 ul(anexo N°4)

Micropipeta de ocho canales(anexoN° 5)

Oxigenador de pecera

Pecera

Placa (plato) de micropozos(anexo N°6)

1.4 *Equipo*

Balanza analítica Mettler, Modelo PM 400, Serie SNR K43297

Balanza granataria Ohaus, Modelo 3201, Serie 700

Estereoscopio(anexo N°7).

Refrigerador Admiral, Modelo NT 15ES

Rotavapor, Marca: Buchler instruments, Modelo: 50-60 CY, serie: 52944.(anexo N°8)

1.5 *Reactivos*

Pruebas fitoquímicas preliminares

Acetato de etilo

Ácido Clorhídrico 1N

Ácido Clorhídrico concentrado

Ácido Sulfúrico concentrado

Agua de Bromo

Agua destilada

Anhídrido Acético

Benceno

Clorhidrato de Ferrico 1% en KOH

Cloroformo

Etanol 90°

Laminas de Magnesio

Reactivo de Baljet

Reactivo de Borntrager

Reactivo de Dragendorff

Reactivo de Kedde

Reactivo de Keller

Reactivo de Killiani

Reactivo de Legal

Reactivo de Mayer

Reactivo de Wagner

Solución de Clorhidrato de Quinina

Solución de Cloruro de Hidroxilamina

Solución de Cloruro Ferrico

Solución de Dicromato de Potasio 5 %

Solución de Gelatina al 5 %

Solución de Sulfato de Atropina

Sub – Acetato de Plomo TS

Para Bioensayo de Artemia salina (anexo N° 9)

Dimetilsulfoxido

Etanol 90°

Sal de mar

Sulfato de cobre (250 ug/ml)

2. METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS

2.1 Recolección y preparación de las plantas

Lo primero a tomar en cuenta es la identificación botánica de las especies, luego se realizó la recolección de las plantas en los Departamentos de San Salvador, Sonsonate, Santa Ana y La Libertad. Llevándose a cabo durante los meses de Febrero, Marzo y Abril.

Las muestras recién cortadas, deberán estar en óptimas condiciones: Libre de insectos y materiales extraños. Posteriormente lavarlas con abundante agua de chorro, enjuagadas con agua purificada y secadas al aire bajo la sombra por un día, para eliminar el agua del lavado, evitando cualquier tipo de contaminación o daño producido por el sol. Ya secos los órganos de las plantas, en el caso de las hojas triturar manualmente, en caso de raíces cortarlas en trozos pequeños y en caso de semillas son pulverizadas.⁽⁷⁾

Almacenar en bolsas plásticas oscuras para protegerlas de la luz, y evitar así cualquier riesgo de alteración en su composición química; identificar cada especie de acuerdo al modelo de etiqueta siguiente:

Nombre científico
Nombre común
Parte de la planta recolectada
Lugar de recolección
Fecha de recolección
Hora de recolección
Nombre de recolector

2.2 Obtención de los Extractos

Colocar en un beaker de 250 ml un mínimo de 50g de materia vegetal, agregar alcohol etílico hasta cubrir, tapar y dejar en maceración durante 24 horas. Después de este tiempo, pasar el contenido a una jeringa de 200 ml, la cual posee en su interior una torunda de algodón, evitando con esto que el extracto salga con restos de la planta cuando se acciona el dispositivo de la jeringa. Recibir el extracto etanólico en un frasco ámbar debidamente identificado.

Transferir el extracto etanólico al Rotavapor, activándolo como máximo a 40°C, concentrar hasta tener una consistencia resinosa, envasar al final del proceso en frascos bien cerrados, protegidos de la luz y la humedad.

2.3 Pruebas de identificación fitoquímica preliminar.

De cada uno de los extractos etanólicos de las 25 especies obtenidos del numeral anterior, realizar las pruebas de identificación fitoquímica, para determinar la presencia de los siguientes metabolitos secundarios.

2.3.1 Ensayos para determinar Alcaloides.

Del extracto vegetal, concentrar 40 ml a 20 ml adicionar seguidamente 25 ml de cloroformo y acidificar con ácido clorhídrico 1Normal a pH 1 – 2, separar la capa ácida y dividir en 3 porciones y realizar las siguientes reacciones:

Dragendorff:

Con la porción 1, adicionar el reactivo de Dragendorff, obteniendo como resultado un precipitado anaranjado.

Mayer:

A la segunda porción, adicionar reactivo de Mayer, obteniendo como resultado un precipitado blanco amarillento.

Wagner:

Con ésta porción, adicionar el reactivo de Wagner, formando un precipitado de coloración café ó marrón.⁽⁷⁾

2.3.2 Ensayo para determinación de Antraquinonas

Esta determinación se realiza mediante la prueba de:

Borntrager:

Evaporar 5 ml del extracto a sequedad, disolver el residuo con 30 ml de ácido clorhídrico 1N y filtrar, adicionar al filtrado 10 ml de Benceno, después

adicionar a la capa bencénica 5 ml de amoniaco, dando como resultado que la capa alcalina se colorea de rozado intenso a rojo.(7)

2.3.3 Ensayo para determinar glicósidos saponínicos

Al extracto etanolico de las especies vegetales se les realizó las siguientes pruebas para glicósidos saponínicos:

Índice de la espuma:

A 5 ml del extracto adicionar 10 ml de agua destilada. Agitar, dejar reposar por 5 min., Produciéndose una espuma mayor de 3 cm arriba de la superficie del liquido que debe permanecer no menos de 5 minutos.

Lieberman – Buchard:

Seguir el procedimiento descrito en glicósidos cardiotónicos. Da como resultado anillo color azul violeta, rojo.

Prueba de Salkowski:

A 10 ml del extracto mas 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado, se le adiciona 1 ml anhídrido, formándose un anillo color rojo.(7)

2.3.4 Ensayo para determinar glicósidos cardiotónicos:

Primeramente realizar un tratamiento previo al extracto: Precipitar las sustancias interferentes del extracto con un volumen de solución de sub-acetato

de plomo TS. Con un volumen menor o igual del extracto, dejar reposar por 30 minutos y filtrar.

Extraer con dos porciones de acetato de etilo y concentrar hasta 20 ml, dividir en tres porciones para las siguientes pruebas:

Lieberman – Buchard:

Evaporar a sequedad y adicionar 1 ml de anhídrido acético, 3 gotas de ácido sulfúrico o más. (baño de hielo), dejar reposar por 30 minutos. Forma un anillo de color azul violeta, rojo.

Kedde:

Evaporar a sequedad, adicionar 2 ml de alcohol y 1 ml de reactivo de kedde. Forma un anillo de color azul violeta.

Keller – Killiani:

Evaporar a sequedad, disolver el residuo con 2 ml de reactivo de keller y gotas de reactivo de killiani. Formando un anillo de color rojo.(7)

2.3.5 Ensayo para determinar Flavonoides:

Tomar el extracto vegetal y realizar la siguiente prueba:

Prueba de Shinoda:

A 5 ml del extracto adicionar una lámina de magnesio, agregar 2 ml de ácido clorhídrico concentrado, dejar reposar por 10 minutos, produciendo tonos rojos.(7)

2.3.6 Ensayo para determinar sesquiterpenlactonas:

Realizar un tratamiento previo a la muestra, para realizar las diferentes pruebas.

Tratamiento previo del extracto etanólico:

Precipitar la clorofila del extracto con cantidad suficiente de solución de sub-acetato de plomo TS., dejar reposar por 30 minutos y filtrar. Extraer con dos porciones de 20 ml de cloroformo, eliminando el exceso de acetato de plomo con lavados de agua destilada.

Dividir el extracto clorofórmico en tres porciones, evaporar a sequedad en baño maría cada una de las fracciones, separadamente.

Hidroximatos Férricos: La fracción 1, y solución de clorhidrato de Hidroxilamina y cloruro férrico al 1 % en hidróxido de potasio, da una coloración violeta.

Reactivo de Baljet: La fracción 2, y el reactivo de Baljet, hay un cambio de coloración de anaranjado a rojo oscuro.

Reactivo de Legal: La fracción 3, y el reactivo de legal, da como resultado una coloración rojo intenso.⁽⁷⁾

2.3.7 Ensayo para determinar Taninos

En este ensayo se le realizaron diferentes pruebas, que a continuación mencionaremos:

Prueba con solución de Acetato de Plomo TS:

A 2 ml de extracto, agregar 1 ml de solución de acetato de plomo, dando un precipitado amarillo como resultado.

Prueba con la solución de FeCl₃:

2 ml de extracto y 3 gotas de la solución de tricloruro de hierro, observar un viraje de color que va de azul oscuro – verde – gris oscuro.

Prueba con solución de gelatina:

2 ml de extracto y 2 ml de solución de gelatina proporciona un precipitado de color blanco.

Prueba con solución de Sulfato de Atropina:

2 ml de extracto y 2 ml de solución de Sulfato de Atropina, da un precipitado de color amarillo.

Prueba con solución de Clorhidrato de Quinina :

Con 2 ml de extracto y 2 ml de solución de Clorhidrato de quinina, da como resultado un precipitado blanco amarillento.

Prueba con solución de Dicromato de Potasio:

2 ml de extracto y 10 gotas de $K_2Cr_2O_4$, da una formación de precipitado de color café.⁽⁷⁾

2.4 Bioensayo

2.4.1 Preparación del medio de Cultivo

Pesar 87.5 g. de sal de mar (Sigma Chem. Co.), y disolver en 3.5 L. de agua destilada, verificando la salinidad con el Salinometro. (120-150 ppt)

2.4.2 Preparación de los Nauplios

En un vaso de precipitado limpio, colocar 300 ml de agua de mar (T° ambiente) y aproximadamente 100 mg de huevecillos. Oxigenar la

mezcla con ayuda de una bomba de aire para acuario durante 24 horas para una mejor reproducción de los nauplios.

Después de las 24 horas , separa los nauplios de los huevecillos, quitándoles el burbujeo y dejar que los nauplios se reúnan en la esquina del recipiente debido a su movimiento fototrópico, luego remover los nauplios con la ayuda de una pipeta pasteur y colocarlos en otro recipiente con agua de mar fresca previamente preparada y burbujeada.

Repetir esta operación , en caso que hayan pasado muchos huevecillos. Este paso asegura la edad o estadio de los nauplios utilizados en el ensayo.

Con una fuente de luz y una pipeta automática, fijada a 100 ul. se extraen los nauplios, recomendándose que estos no excedan de 15 y no sean menores de 10.⁽¹⁶⁾

2.4.3 Preparación de la Muestra

Pesar 20 mg del extracto vegetal en un vaso de precipitado de 10 ml. Añadir 500 ul de dimetilsulfoxido y disolver completamente, transferir a un balón volumétrico de 10 ml , lavando el vaso de precipitado con pequeñas porciones de agua de mar, pasándolo al balón y aforando a 10 ml, obteniendo una concentración de 2000 ug/ml.

Tomar 1 ml de la solución anterior y colocarlo en un balón volumétrico de 10 ml y aforar con agua de mar, obteniendo una concentración de 200 ug/ml.

Tomar 1 ml de la solución anterior (200 ug/ml) y aforar con agua de mar a 10 ml. Obteniendo una concentración de 20 ug/ml.

Solución blanco: Colocar en un balón volumétrico de 10 ml, 500 ul de dimetilsulfoxido y adicionar agua de mar hasta aforar a 10 ml.

.(16)

2.4.4 Ensayo

En un plato de 96 micropozos de 300 ul, colocar 100 ul de agua de mar, excepto en la línea A. En los pozos A1, A2, A3, colocar 200 ul de la solución blanco, en los pozos A4, A5, A6, colocar 200 ul de la solución patrón de sulfato de cobre (250 ug/ml). En los pozos A7, A8, A9, colocar 200 ul de la solución muestra (2000 ug/ml). En los pozos A10, A11, A12, colocar una segunda muestra de igual concentración.

Usando una pipeta de ocho canales(anexo N° 4), a lo largo de la línea A(pozos A1 al A8), remover 100 ul de la solución y colocar en línea B, mezclar por succiones repetidas la solución, luego remover 100

ul de esta línea, y colocar en la línea C, mezclar por succiones repetidas, descartando 100 ul de la solución de los pozos C7 al C12 mientras que en los pozos C1 a C7 pasar 100 μ l de la solución a la línea D1 a D7. Obteniendo concentraciones de 1000, 500 y 250 ug/ml respectivamente.

Luego, colocar 100 ul de la misma muestra de concentración de 200 ug/ml en la línea D(pozos D7 al D9), en los pozos D10 al D12, colocar una segunda muestra de igual concentración (200ug/ml). Usar una pipeta de ocho canales a lo largo de la línea D(pozos D1 al D8), mezclar por succiones repetidas la solución y remover 100 ul de esta línea y colocarlos en la línea E, realizar el mismo procedimiento para la línea F, descartando 100 ul de la solución de los pozos F7 al F12, mientras que en los pozos F1 a F6 pasar 100 μ l a la línea G1 a G6. Obteniendo así concentraciones de 100, 50 y 25 ug/ml respectivamente.

Colocar 100 ul de la muestra de concentración de 20 ug/ml en la línea G (pozos G7 a G9), en los pozos G10, G11,G12, colocar una segunda muestra de igual concentración (20 ug/ml). Con la pipeta de ocho canales , usarla a lo largo de la línea G (G1 a G8), mezclar por succiones repetidas y remover 100 ul de esta línea , colocándola en la línea H, mezclar bien por succiones repetidas eliminando al final 100 ul

de la solución. Obteniendo concentraciones de 10 y 5 ug/ml. respectivamente.

Repetir este procedimiento para las columnas A9 a A12. ahora todos los micropozos contienen 100 ul de solución.

A todos los pozos adicionar 100 ul de la suspensión , entre 10 y 15 nauplios.

Tapar el plato e incubar a 22 – 29 °C durante 24 horas.(16)

2.4.5 Lectura de Resultado

Luego de las 24 horas, contar los nauplios muertos usando un estereoscopio. Anotar este numero en cada casilla de un cuadro simulando el microplato(anexo N° 9).

2.4.6 Calculo de la Concentración Letal 50 (LC 50)

Los datos obtenidos anteriormente se introducen a una computadora, usando un programa Sé Probit(anexo N° 1). También es muy preciso utilizar regresión lineal, graficando el porcentaje de muertos versus el logaritmo de la concentración .

Los datos se expresan como la concentración letal 50 de un experimento en triplicado. .(16)

TABLA N° 1. **RESULTADOS DE ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE ALCALOIDES Y SESQUITERPENLACTONAS.**

P R U E B A S		A L C A L O I D E S				S E S Q U I T E R P E N L A C T O N A S			
E S P E C I E S V E G E T A L E S		Dragendorff	Wagner	Mayer	Resultados	Legal	Balget	Hidroxilamina	Resultados
NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN								
<u>Jatropha curcas</u>	Tempate	+	+	+	positivo	-	-	-	negativo
<u>Chenopodium ambrosoides</u>	Epazote	+	+	+	positivo	-	-	-	negativo
<u>Catharantus roseaus</u>	*Chula	+	+	+	positivo	-	-	-	negativo
<u>Sanseviria quineensis</u>	Curarina	-	-	-	negativo	+	+	+	positivo
<u>Rauwolfia tetraphila</u>	*Amatillo	+	+	+	positivo	+	+	+	positivo
<u>Solanum nigrum</u>	Hierba mora	+	+	+	positivo	+	+	+	positivo
<u>Murraya paniculata</u>	*Mirto	+	+	+	positivo	-	-	-	negativo
<u>Bursera simarouba</u>	Jiote	+	+	+	positivo	-	-	-	negativo
<u>Eugenia jambos</u>	Manzana rosa	-	-	-	negativo	-	-	-	negativo
<u>Tridax procumbens</u>	Hierba del toro	-	-	-	negativo	-	-	-	negativo
<u>Lycopersicum esculentum</u>	Tomate	+	+	+	positivo	-	-	-	negativo
<u>Ricinus communis</u>	*Higuerillo	+	+	+	positivo	-	-	-	negativo
<u>Ocimum bacilicum</u>	Albahaca	-			negativo	-	-	-	negativo
<u>Zingiber officinalis</u>	Jengibre	+	+	+	positivo	+	+	+	positivo
<u>Lippia alba</u>	Salvia santa	-	-	-	negativo	-	-	-	negativo
<u>Eryngium foetidum</u>	Alcapate	-	-	-	negativo	-	-	-	negativo
<u>La andula officinalis</u>	Alhucema	-	-	-	negativo	-	-	-	negativo
<u>Cassia grandis</u>	Carao	-	-	-	negativo	+	+	+	positivo
<u>Yucca elephantipes</u>	Izote	+	+	+	positivo	-	-	-	negativo
<u>Justicia carthagenensis</u>	Hierba del susto	+	+	+	positivo	-	-	-	negativo
<u>Plunchea odorata</u>	Siguapate	+	+	+	positivo	-	-	-	negativo
<u>Paspalum notatum</u>	*Gramma	+	+	+	positivo	-	-	-	negativo
<u>Punica granatum</u>	*Granado	+	+	+	positivo	+	+	+	positivo
<u>Hymenaea courbaril</u>	Copinol	-	-	-	negativo	+	+	+	positivo
<u>Guazuma ulmifolia</u>	Caulote.	-	-	-	negativo	-	-	-	negativo

TABLA N° 2. RESULTADOS DE ANÁLISIS
FITOQUIMICO DE SAPONINAS

ANTRAQUINONAS Y
FLAVONOIDES.

P R U E B A S		S A P O N I N A S			ANTRAQUINONAS		FLAVONOIDES		
ESPECIES VEGETALES		Espuma	Salkowski	lieberman buchar	Resultado	Borntrager	Resultado	Shinoda	Resultado
NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN								
<u>Jatropha curcas</u>	Tempate	-	-	-	negativo	-	negativo	+	positivo
<u>Chenopodium ambrosoides</u>	Epazote	-	-	-	negativo	-	negativo	-	negativo
<u>Catharantus roseaus</u>	*Chula	-	-	-	negativo	-	negativo	+	positivo
<u>Sanseviria quineensis</u>	Curarina	+	+	+	positivo	-	negativo	-	negativo
<u>Rauwolfia tetraphila</u>	*Amatillo	-	-	-	negativo	-	negativo	-	negativo
<u>Solanum nigrum</u>	Hierba mora	-	-	-	negativo	-	negativo	-	negativo
<u>Murraya paniculata</u>	*Mirto	-	-	-	negativo	-	negativo	-	negativo
<u>Bursera simarouba</u>	Jiote	-	-	-	negativo	-	negativo	-	negativo
<u>Eugenia jambos</u>	Manzana rosa	-	-	-	negativo	-	negativo	-	negativo
<u>Tridax procumbens</u>	Hierba del toro	+	+	+	positivo	-	negativo	+	positivo
<u>Lycopersicum esculentum</u>	Tomate	+	+	+	positivo	-	negativo	-	negativo
<u>Ricinus communis</u>	*Higuerillo	-	-	-	negativo	-	negativo	-	negativo
<u>Ocimum bacilicum</u>	Albahaca	-	-	-	negativo	-	negativo	-	negativo
<u>Zingiber officinalis</u>	Jengibre	-	-	-	negativo	-	negativo	+	positivo
<u>Lippia alba</u>	Salvia santa	-	-	-	negativo	-	negativo	-	negativo
<u>Eryngium foetidum</u>	Alcapate	-	-	-	negativo	-	negativo	-	negativo
<u>La andula officinalis</u>	Alhucema	-	-	-	negativo	-	negativo	-	negativo
<u>Cassia grandis</u>	Carao	-	-	-	negativo	-	negativo	+	positivo
<u>Yucca elephantipes</u>	Izote	+	+	+	positivo	-	negativo	-	negativo
<u>Justicia carthaginensis</u>	Hierba del susto	-	-	-	negativo	-	negativo	-	negativo
<u>Plunchea odorata</u>	Siguapate	-	-	-	negativo	-	negativo	+	positivo
<u>Paspalum notatum</u>	*Grama	-	-	-	negativo	-	negativo	-	negativo
<u>Punica granatum</u>	*Granado	-	-	-	negativo	-	negativo	-	negativo
<u>Hymenaea courbaril</u>	Copinol	+	+	+	positivo	-	negativo	-	negativo
<u>Guazuma ulmifolia</u>	Caulote.	+	+	+	positivo	-	negativo	-	negativo

TABLA N°4 **RESULTADOS DE ANALISIS FITOQUIMICO DE GLICOSIDOS
CARDIOTONICOS.**

PRUEBAS		GLICOSIDOS CARDIOTONICOS				
ESPECIES VEGETALES		Kedde	Keller-Killiani	Legal	Lieberman Burcherd	Resultados
NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN					
<u>Jatropha curcas</u>	Tempate	-	-	-	-	negativo
<u>Chenopodium ambrosoides</u>	Epazote	-	-	-	-	negativo
<u>Catharantus roseaus</u>	*Chula	+	+	+	+	positivo
<u>Sanseviria quineensis</u>	Curarina	-	-	-	-	negativo
<u>Rauwolfia tetraphila</u>	*Amatillo	-	-	-	-	negativo
<u>Solanum nigrum</u>	Hierba mora	-	-	-	-	negativo
<u>Murraya paniculata</u>	*Mirto	+	+	+	+	positivo
<u>Bursera simarouba</u>	Jiote	-	-	-	-	negativo
<u>Eugenia jambos</u>	Manzana rosa	-	-	-	-	negativo
<u>Tridax procumbens</u>	Hierba del toro	-	-	-	-	negativo
<u>Lycopersicum esculentum</u>	Tomate	-	-	-	-	negativo
<u>Ricinus communis</u>	*Higuerillo	-	-	-	-	negativo
<u>Ocimum bacilicum</u>	Albahaca	-	-	-	-	negativo
<u>Zingiber officinalis</u>	Jengibre	-	-	-	-	negativo
<u>Lippia alba</u>	Salvia santa	-	-	-	-	negativo
<u>Eryngium foetidum</u>	Alcapate	-	-	-	-	negativo
<u>La andula officinalis</u>	Alhucema	-	-	-	-	negativo
<u>Cassia grandis</u>	Carao	+	+	+	+	positivo
<u>Yucca elephantipes</u>	Izote	-	-	-	-	negativo
<u>Justicia carthagenensis</u>	Hierba del susto	-	-	-	-	negativo
<u>Plunchea odorata</u>	Siguapate	-	-	-	-	negativo
<u>Paspalum notatum</u>	*Grama	-	-	-	-	negativo
<u>Punica granatum</u>	*Granado	-	-	-	-	negativo
<u>Hymenaea courbaril</u>	Copinol	-	-	-	-	negativo
<u>Guazuma ulmifolia</u>	Caulote.	-	-	-	-	negativo

Tabla N° 5 CUADRO RESUMEN DE COMPONENTES QUIMICOS DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS.

ESPECIES VEGETALES		METABOLITOS SECUNDARIOS						
NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	ALCALOIDES	ANTRAQUINONAS	GLICOSIDOS CARDIOTONICOS	FLAVONOIDES	TANINOS	SAPONINAS	SESQUITERPENLACTONAS
<u>Jatropha curcas</u>	Tempate	+	-	-	-	+	+	-
<u>Chenopodium ambrosoides</u>	Epazote	+	-	-	-	+	-	+
<u>Catharantus roseaus</u>	*Chula	+	-	+	-	+	-	+
<u>Sanseviria quineensis</u>	Curarina	-	-	-	-	+	+	+
<u>Rauwolfia tetraphila</u>	*Amatillo	+	-	+	+	+	-	-
<u>Solanum nigrum</u>	Hierba mora	+	-	-	-	+	-	+
<u>Murraya paniculata</u>	*Mirto	+	-	+	-	+	-	-
<u>Bursera simarouba</u>	Jiote	+	-	-	+	+	-	+
<u>Eugenia jambos</u>	Manzana rosa	+	-	-	+	+	-	+
<u>Tridax procumbens</u>	Hierba del toro	-	-	-	+	+	+	-
<u>Lycopersicum esculentum</u>	Tomate	+	-	-	-	+	+	-
<u>Ricinus communis</u>	*Higuerillo	+	-	-	-	+	-	+
<u>Ocimum bacilicum</u>	Albahaca *	-	-	-	+	-	-	-
<u>Zingiber officinalis</u>	Jengibre	+	-	-	+	+	-	+
<u>Lippia alba</u>	Salvia santa	+	-	-	+	+	-	-
<u>Eryngium foetidum</u>	Alcapate *	-	-	-	+	-	-	-
<u>La andula officinalis</u>	Alhucema	+	-	-	+	-	-	+
<u>Cassia grandis</u>	Carao *	+	+	+	+	+	-	+
<u>Yucca elephantipes</u>	Izote	+	-	-	-	+	+	-
<u>Justicia carthaginensis</u>	Hierba del susto	+	-	-	-	+	-	-
<u>Plunchea odorata</u>	Siguapate	+	-	-	+	+	-	-
<u>Paspalum notatum</u>	*Gramma	+	-	-	-	+	-	-
<u>Punica granatum</u>	*Granado	+	-	-	-	+	-	+
<u>Hymenaea courbaril</u>	Copinol	-	+	-	+	+	+	+
<u>Guazuma ulmifolia</u>	Caulote.	-	-	-	+	+	+	-

Tabla N° 7 CALCULO DE LA CONCENTRACIÓN LETAL 50 (LC50)

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	LC(50) (UG/ML)	VALOR r
<u>Jatropha curcas</u>	Tempate	54.24	0.98
<u>Rauwolfia tetraphyla</u>	*Amatillo	115.73	0.91
<u>Ocimum bacilicum</u>	Albahaca	122.34	0.95
<u>Solanum nigrum</u>	Hierba Mora	172.54	0.88
<u>Zingiber officinalis</u>	Jengibre	259..32	0.78
<u>Lippia alba</u>	Salvia santa	301.84	0.85
<u>Bursera simarouba</u>	Jiote	338.74	0.96
<u>Catharantus roseaus</u>	*Chula	414.39	0.65
<u>Yuca elephantipes</u>	Izote	768.31	0.97
<u>Punica granatum</u>	*Granado	2264.68	0.74
<u>Hymenaea courbaril</u>	Copinol	3045.67	0.84
<u>Tridax procumbens</u>	Hierba del toro	3533.91	0.97
<u>Sansevieria guineensis</u>	Curarína	3635.46	0.59
<u>Justicia carthaginensis</u>	Hierba del susto	4427.71	0.66
<u>Lycopersicum esculentum</u>	Tomate	6457.16	0.64
<u>Plunchea odorata</u>	Siguapate	483909.23	0.71
<u>Paspalum notatum</u>	*Grama	846717.6	0.72
<u>Muralla paniculata</u>	*Mirto	2936887675	0.70
<u>Chenopodium ambrosoide</u>	Manzana rosa	0	0
<u>Recinus communis</u>	*Higuerillo	0	0
<u>Eryngium foetidum</u>	Alcapate	0	0
<u>La Achillea millefolium</u>	Alhucema	0	0
<u>Cassia gradis</u>	Carao	0	0
<u>Guazuma ulmifolia</u>	Caulote	0	0
<u>Chenopodium ambrosoide</u>	Epazote	0	0

r: factor de correlación

CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Jatropha curcas(Tempate).

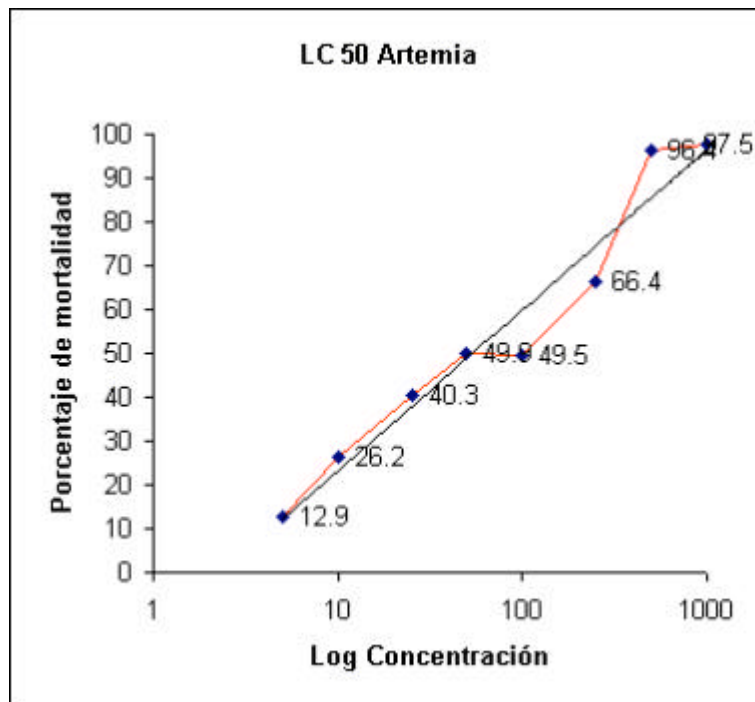
CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	97.5	3
500	96.4	2.698970004
250	66.4	2.397940009
100	49.5	2
50	49.9	1.698970004
25	40.3	1.397940009
10	26.2	1
5	12.9	0.698970004

Valor de r
0.976021751

log.
1.734390991

LC 50
54.24890683

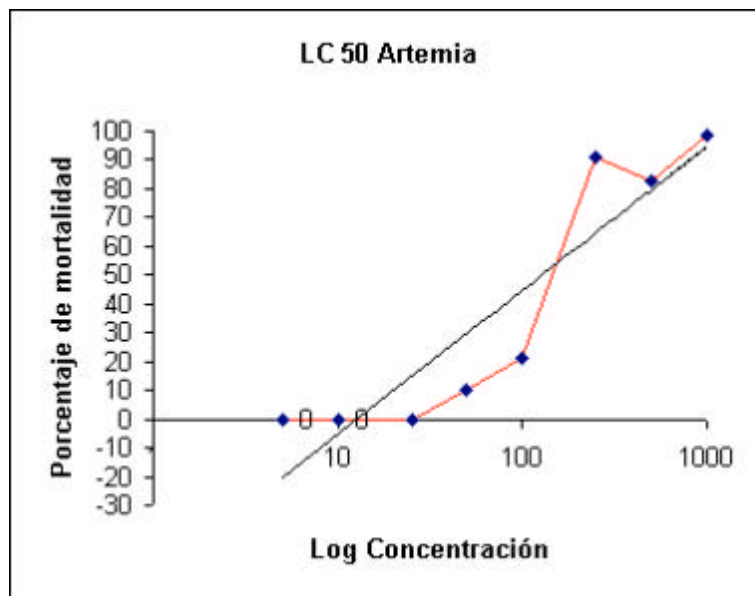


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Rauwolfia tetrafylla (Amatillo).

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	98.3	3
500	82.6	2.698970004
250	91	2.397940009
100	21.3	2
50	10.3	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

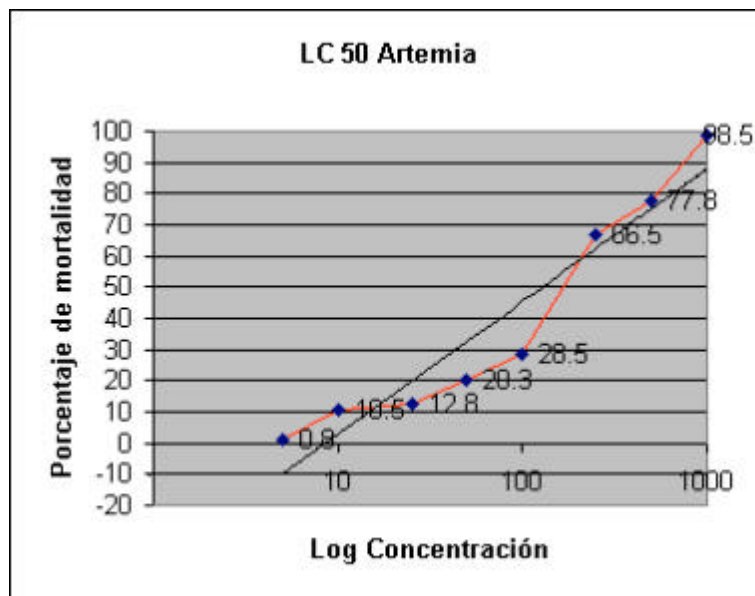
Valor de r	log.	LC 50
0.913122706	2.063465686	115.7352586



CALCULO DE LC50 con Artemia salina para Ocimum Bacilicum (Albahaca)

CONCENTRACION mg/ml	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
1000	98.5	3
500	77.8	2.698970004
250	66.5	2.397940009
100	28.5	2
50	20.3	1.698970004
25	12.8	1.397940009
10	10.5	1
5	0.8	0.698970004

Valor de r	LC 50
0.955882477	122.3406488

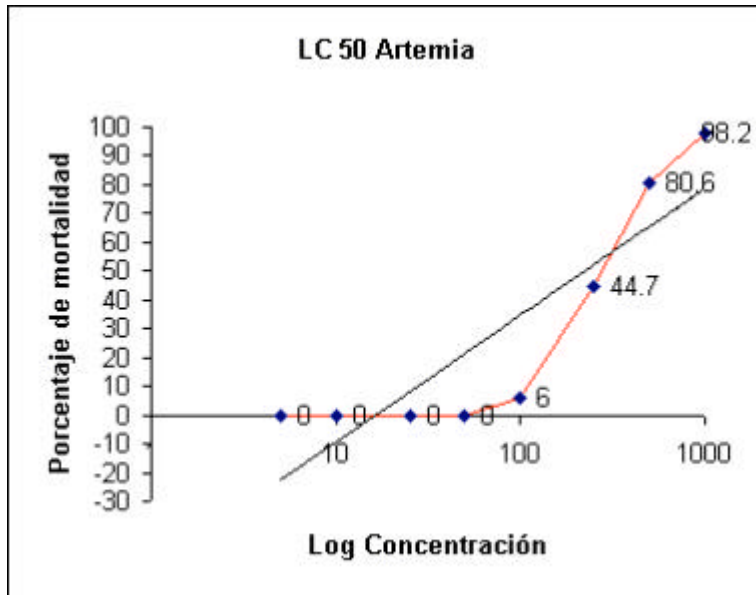


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Solanum nigrum (Hierba mora).

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	98.2	3
500	80.6	2.698970004
250	44.7	2.397940009
100	6	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

Valor de r	log	LC 50
0.880124609	2.236892927	172.5412447

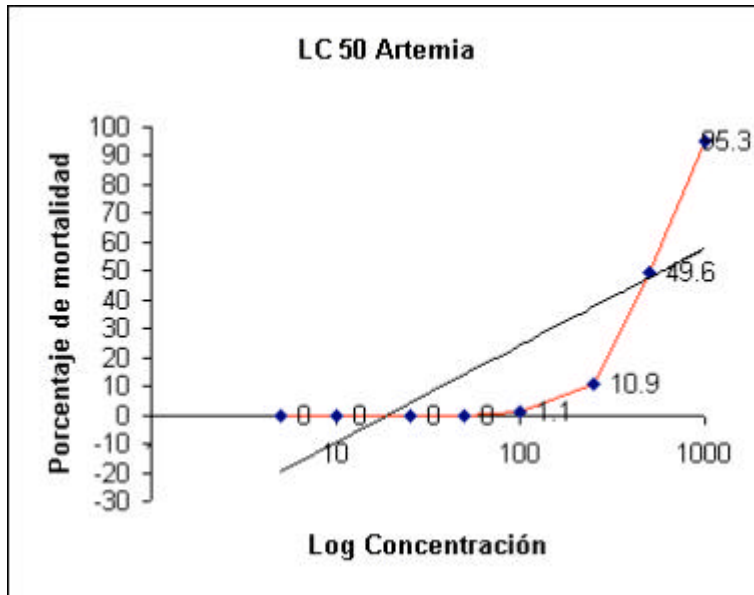


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Zingiber officinalis (Jengibre).

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	95.3	3
500	49.6	2.698970004
250	10.9	2.397940009
100	1.1	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

Valor de r	log	LC 50
0.781771094	2.413849054	259.3277867

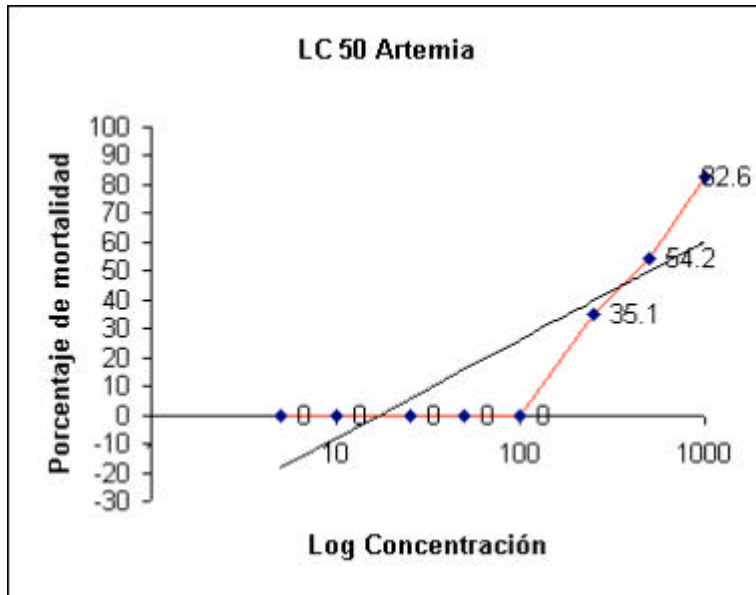


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Lippia alba (Salvia santa)

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	82.6	3
500	54.2	2.698970004
250	35.1	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

Valor de r	log	LC 50
0.859940374	2.479777244	301.8403141

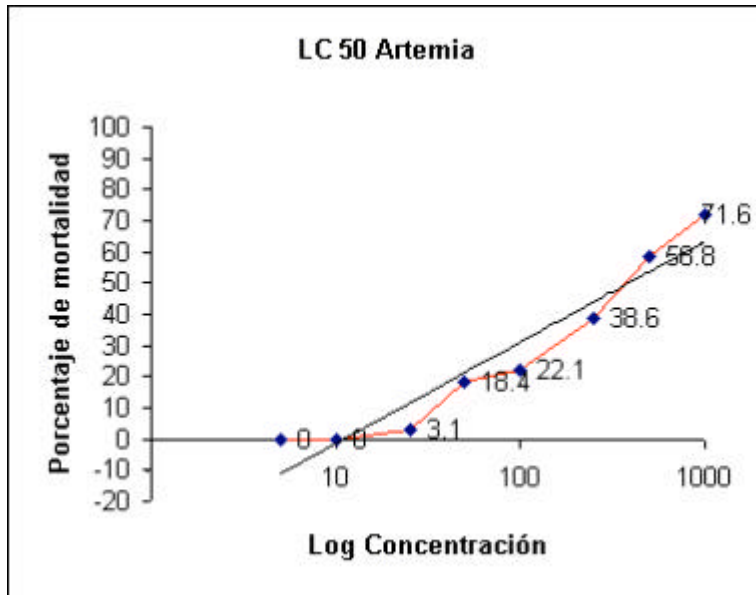


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Bursera simarouba (Jiote).

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	71.6	3
500	58.8	2.698970004
250	38.6	2.397940009
100	22.1	2
50	18.4	1.698970004
25	3.1	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

Valor de r	log	LC 50
0.960647801	2.529874192	338.746013

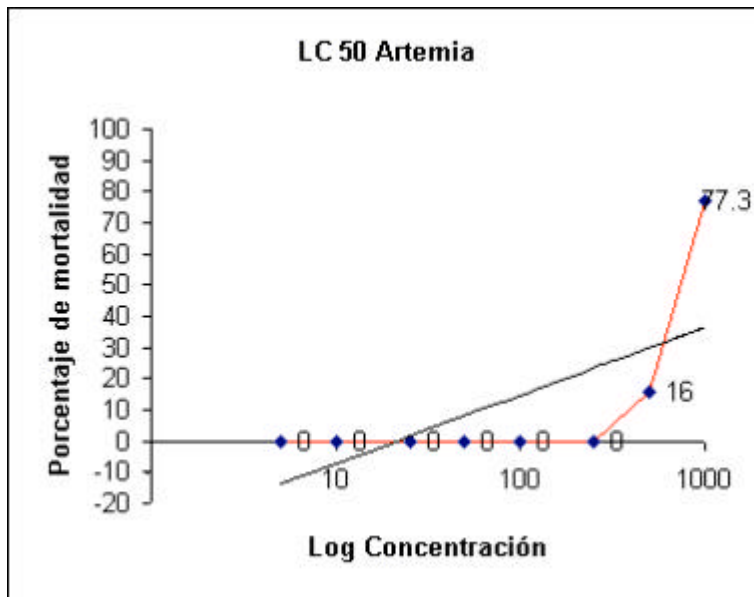


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Catharantus roseus (Chula).

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	77.3	3
500	16	2.698970004
250	0	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

Valor de r	log	LC 50
0.656407101	2.617412036	414.3926424

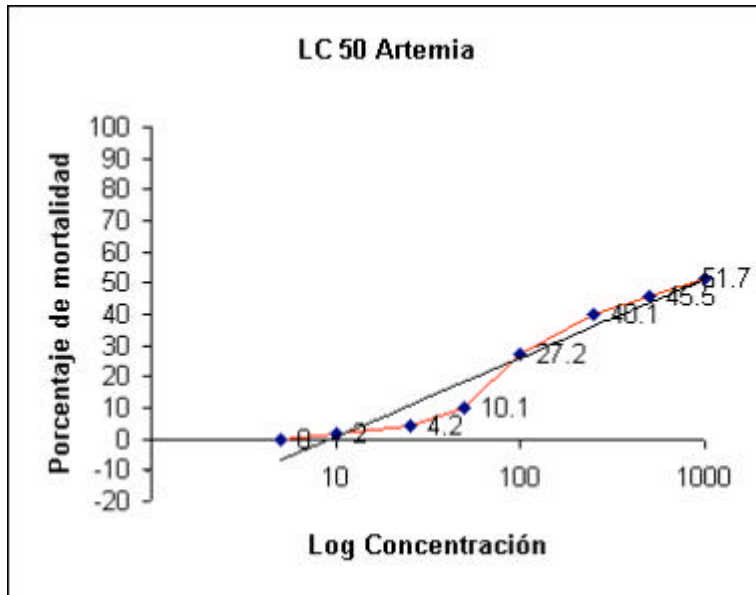


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Yucca elephantipes (Izote)

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	51.7	3
500	45.5	2.698970004
250	40.1	2.397940009
100	27.2	2
50	10.1	1.698970004
25	4.2	1.397940009
10	2	1
5	0	0.698970004

Valor de r	log	LC 50
0.970426318	2.885537916	768.3125307

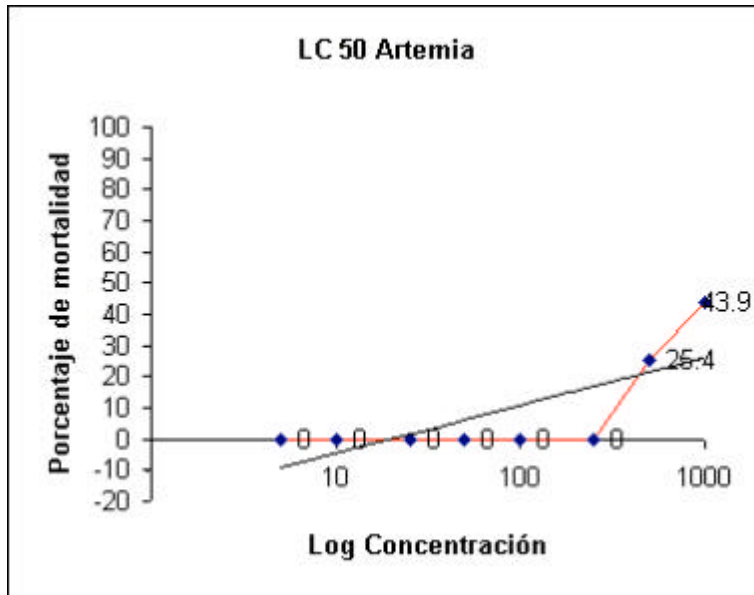


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Punica granatum (Granado).

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	43.9	3
500	25.4	2.698970004
250	0	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

Valor de r	log	LC 50
0.744837388	3.355008636	2264.689342

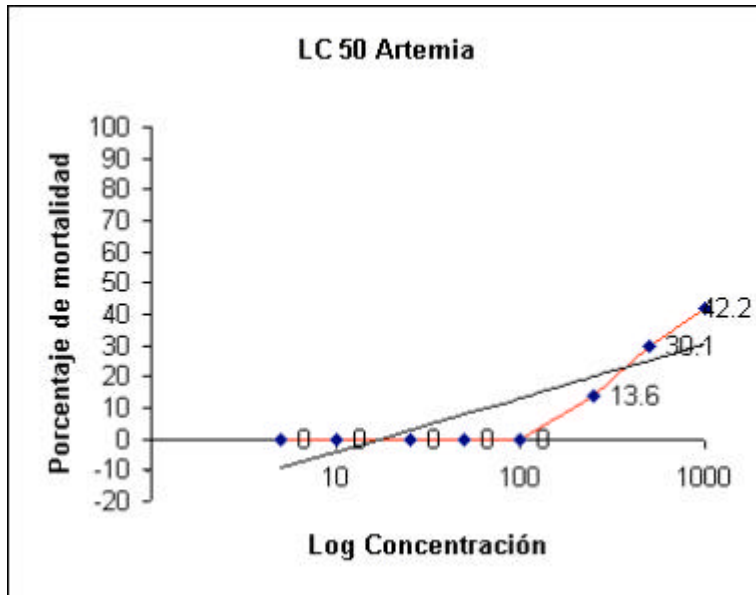


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Hymenaea courbaril (Copinol).

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	42.2	3
500	30.1	2.698970004
250	13.6	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

Valor de r	log	LC 50
0.846875238	3.483683828	3045.676891

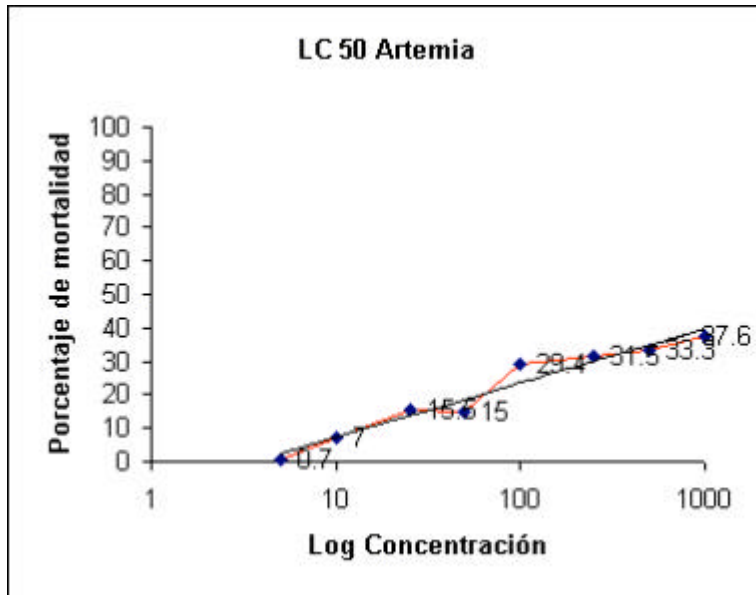


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Tridax procumbens (Hierba del toro).

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	37.6	3
500	33.3	2.698970004
250	31.5	2.397940009
100	29.4	2
50	15	1.698970004
25	15.5	1.397940009
10	7	1
5	0.7	0.698970004

Valor de r	log	LC 50
0.975023484	3.548256203	3533.915843

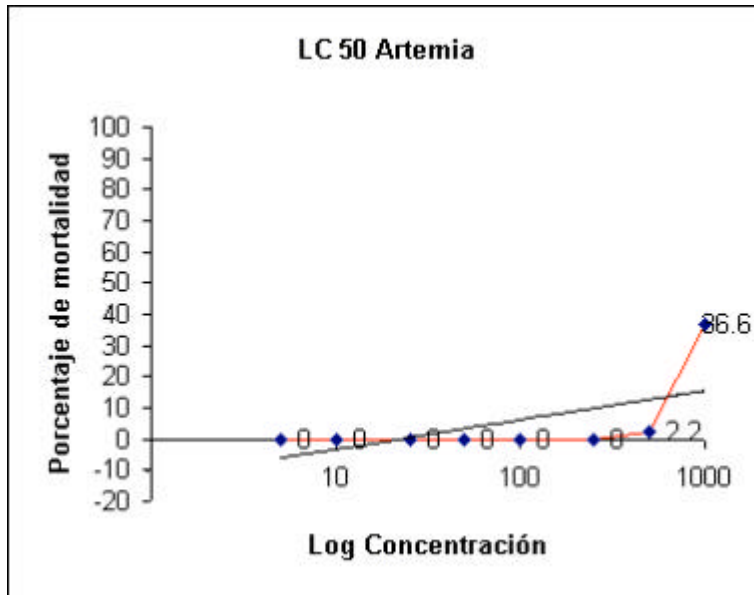


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Sanseviria guineensis (Curarina).

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	36.6	3
500	2.2	2.698970004
250	0	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

Valor de r	log	LC 50
0.594035831	3.560559818	3635.463745

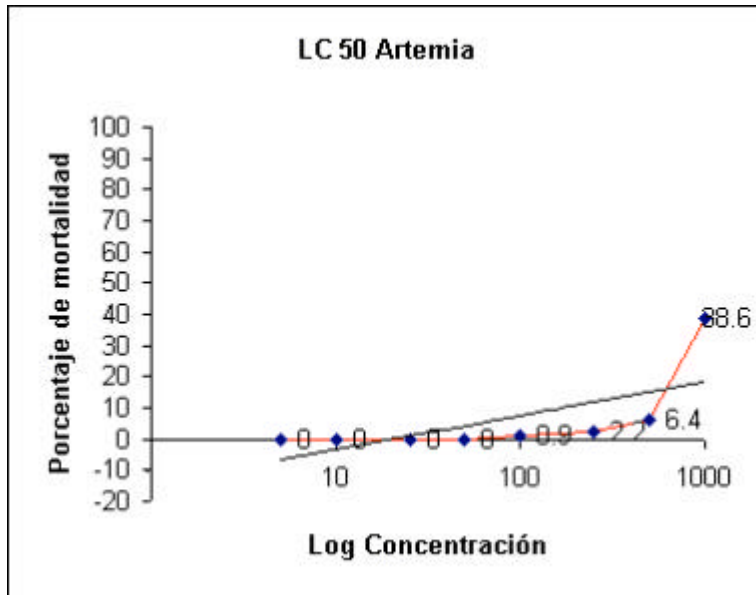


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Justicia carthaginensis (Hierba del susto).

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	38.6	3
500	6.4	2.698970004
250	2.2	2.397940009
100	0.9	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

Valor de r	log	LC 50
0.665228897	3.646179592	4427.714315

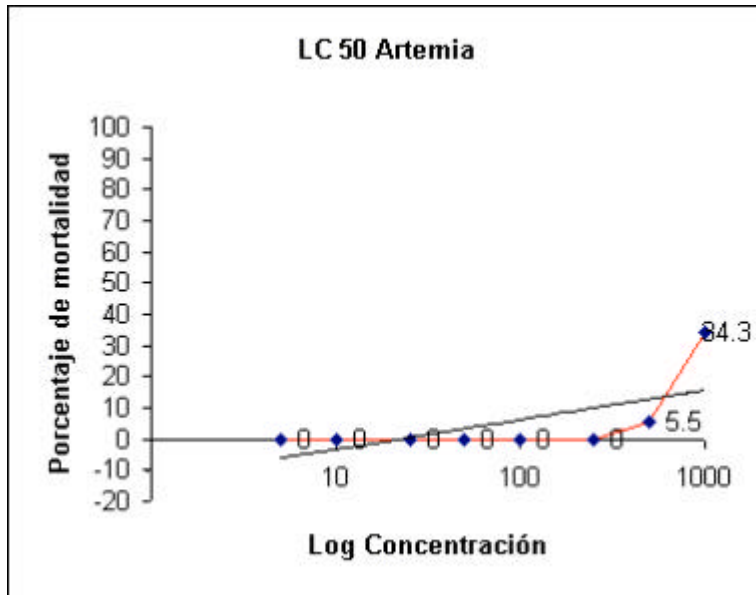


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Lycopersicum esculentum (Tomate).

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	34.3	3
500	5.5	2.698970004
250	0	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

Valor de r	log	LC 50
0.638100879	3.810042127	6457.168605

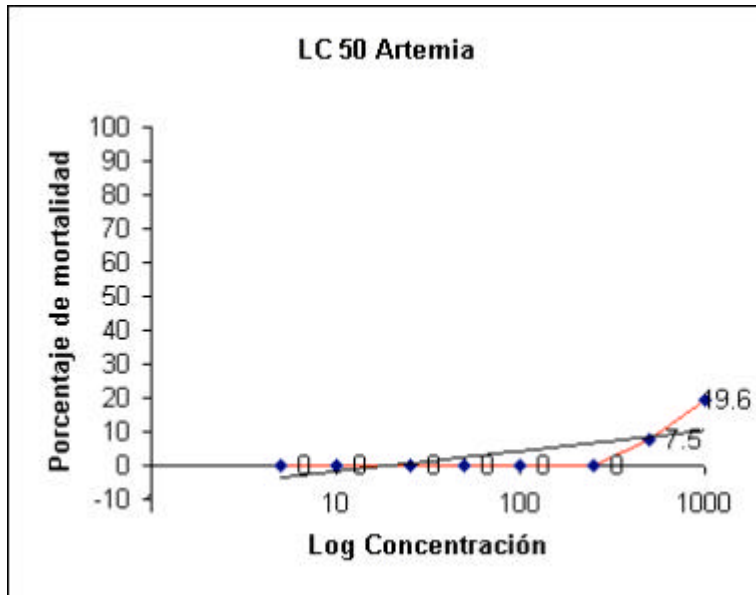


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Plunchea odorata (Siguapate).

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	19.6	3
500	7.5	2.698970004
250	0	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

Valor de r	log	LC 50
0.710978611	5.68476391	483909.2347

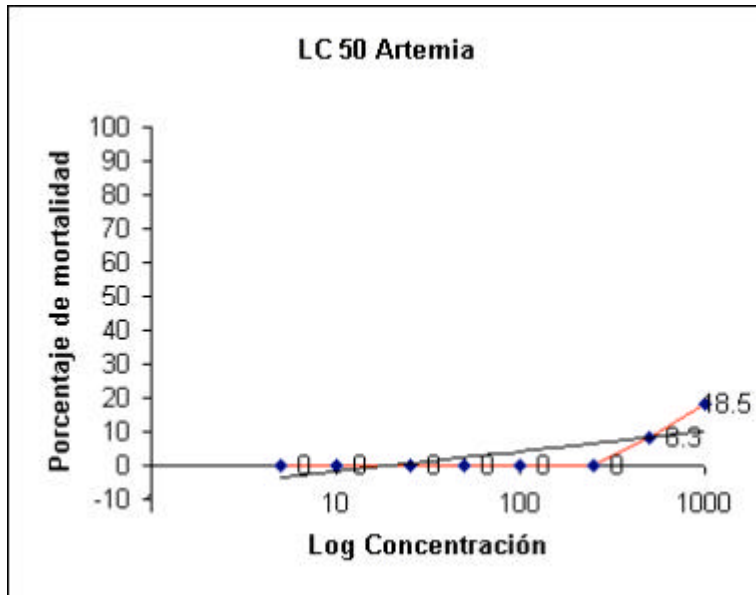


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Paspalum notatum (Grana).

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	18.5	3
500	8.3	2.698970004
250	0	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

Valor de r	log	LC 50
0.725426309	5.927738587	846717.6

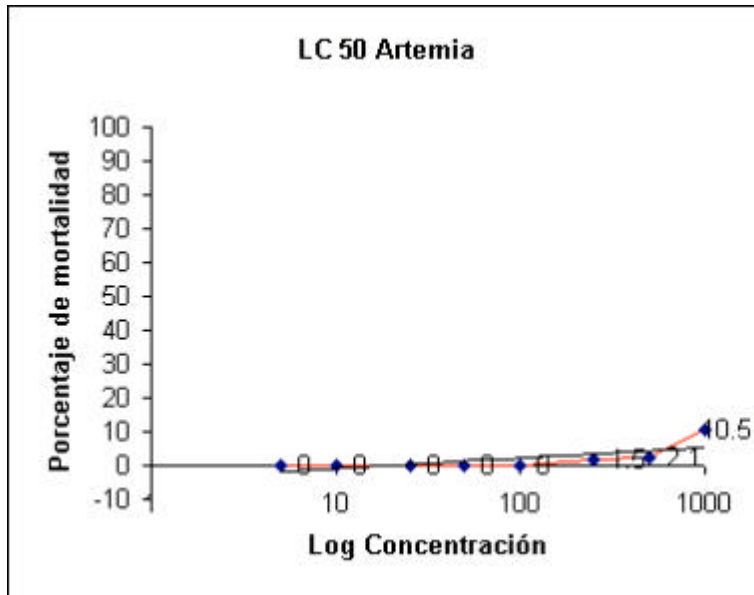


CALCULO DE LC50 CON Artemia salina para Murraya paniculata (Mirto).

CONCENTRACION ug/ml Porcentaje de Mortalidad Logaritmo de la concentración

1000	10.5	3
500	2.1	2.698970004
250	1.5	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

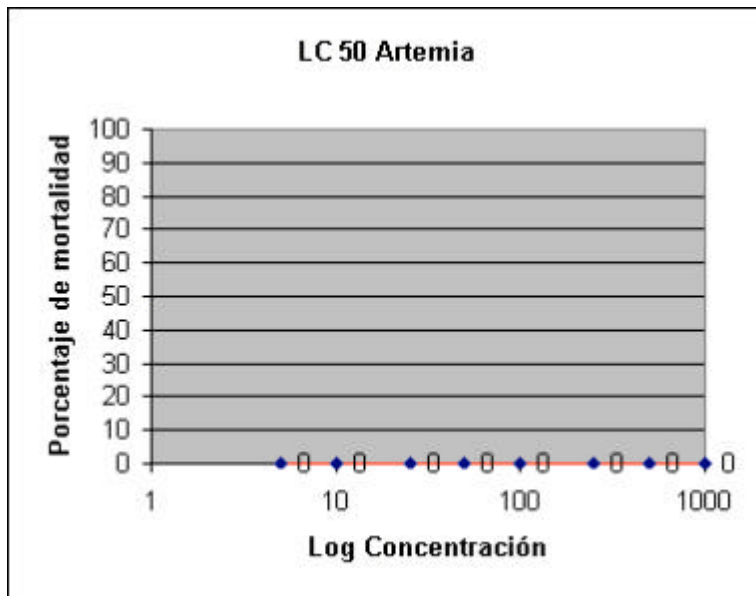
Valor de r	log	LC 50
0.702404483	9.467887337	2936887675



CALCULO DE LC50 con Artemia salina para Chenopodium ambrosioides (Epazote)

CONCENTRACION mg/ml	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
1000	0	3
500	0	2.698970004
250	0	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

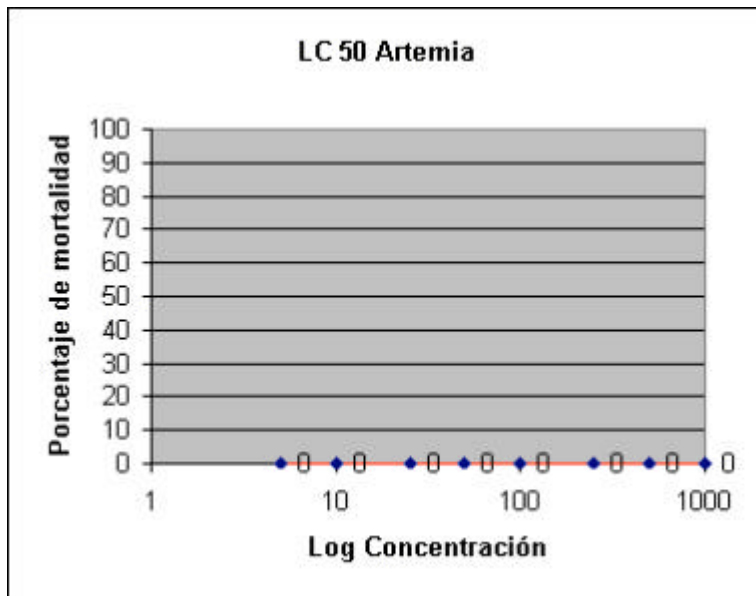
Valor de r	LC 50
#¡DIV/0!	#¡DIV/0!



CALCULO DE LC50 con Artemia salina para Eujenia jambos (Manzana rosa)

CONCENTRACION mg/ml	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
1000	0	3
500	0	2.698970004
250	0	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	1	1
5	0	0.698970004

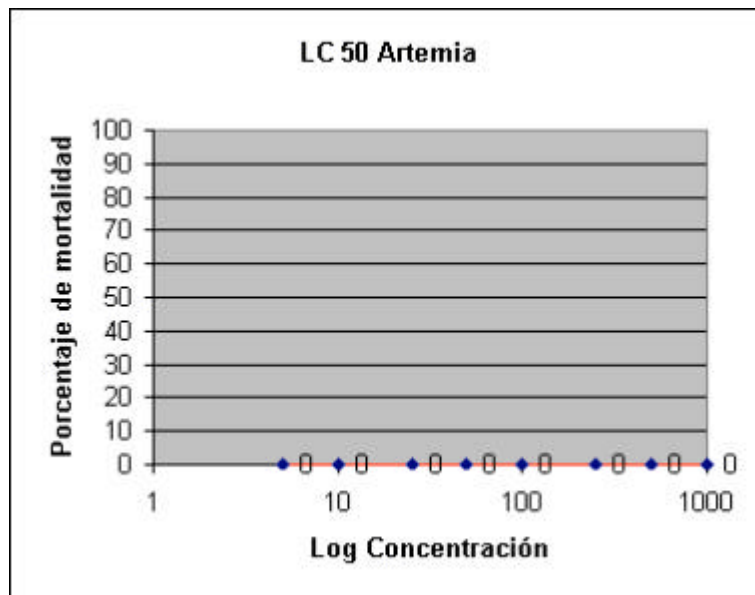
Valor de r	LC 50
#¡DIV/0!	#¡DIV/0!



CALCULO DE LC50 con Artemia salina Ricinos comunis (higuerillo)

CONCENTRACION mg/ml	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
1000	0	3
500	0	2.698970004
250	0	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

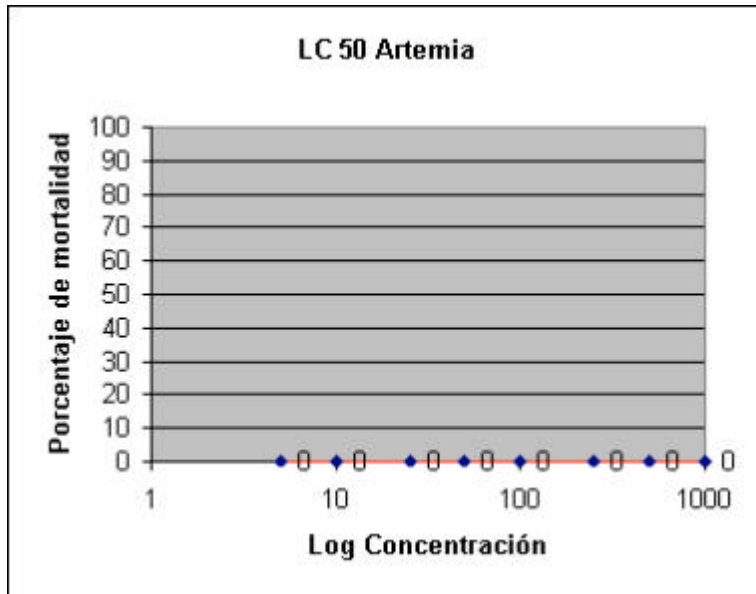
Valor de r	LC 50
#¡DIV/0!	#¡DIV/0!



CALCULO DE LC50 con Artemia salina Eryngium foetidum (Alcapate)

CONCENTRACION mg/ml	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
1000	0	3
500	0	2.698970004
250	0	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

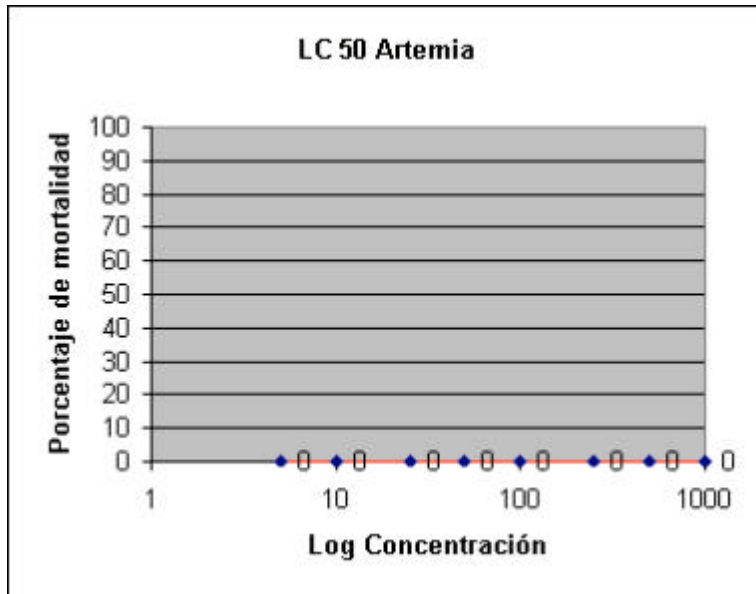
Valor de r	LC 50
#¡DIV/0!	#¡DIV/0!



CALCULO DE LC50 con Artemia salina Achillea millefolium (Alhucema)

CONCENTRACION mg/ml	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
1000	0	3
500	0	2.698970004
250	0	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

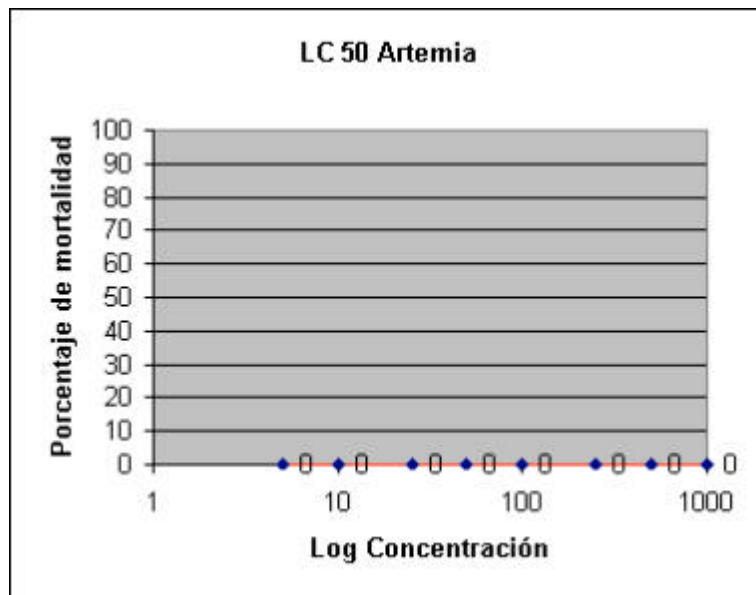
Valor de r	LC 50
#¡DIV/0!	#¡DIV/0!



CALCULO DE LC50 con Artemia salina Cassia grandis (carao)

CONCENTRACION mg/ml	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
1000	0	3
500	0	2.698970004
250	0	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

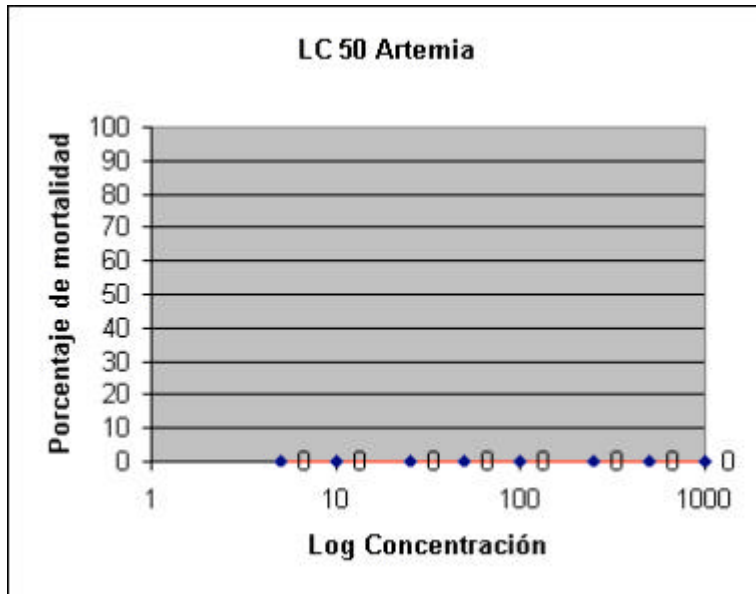
Valor de r	LC 50
#¡DIV/0!	#¡DIV/0!



CALCULO DE LC50 con Artemia salina Guazuma ulmifolia (Caulote)

CONCENTRACION mg/ml	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
1000	0	3
500	0	2.698970004
250	0	2.397940009
100	0	2
50	0	1.698970004
25	0	1.397940009
10	0	1
5	0	0.698970004

Valor de r	LC 50
#¡DIV/0!	#¡DIV/0!



1 DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR.

Posterior al análisis fitoquímico preliminar, es importante destacar que: De las 25 plantas ensayadas, el 92% dan positivas las pruebas de Taninos; mientras que únicamente el 8% dan positivo las pruebas de Antraquinonas. En cuanto a los demás metabolitos están presentes en porcentajes intermedios, por ejemplo: los Alcaloides se encuentran en un 76% en los 25 extractos vegetales; los Flavonoides en un 48% al igual que las Sesquiterpenlactonas ; las Saponinas en un 28% y los Glicosidos Cardiotonicos en 16%.

En cuanto a las plantas que mayor metabolitos posee: se encuentra el Carao, con 6 metabolitos exceptuando las Saponinas; mientras que el Alcapate y Albahaca, presentan únicamente positivas las pruebas de Flavonoides. Y con las demás especies vegetales: el Copinol posee 5 metabolitos secundarios(ver Tabla N° 5); el Jiote, Manzana Rosa, Chula, Amatillo, Jengibre, poseen 4 metabolitos(ver Tabla N°5); el Tempate, Epazote, Curarina, Hierba mora, Mirto, Hierba del Toro, Tomate, Higuierillo, Salvia Santa, Alhucema, Izote, Siguapate, Granado y Caulote poseen 3 metabolitos secundarios cada uno de ellos.(ver Tabla N°5) Y 2 metabolitos la Hierba del Susto y la Grama.(ver Tabla N°5)

2 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR.

Sin duda alguna la presencia o ausencia de metabolitos secundarios, es la responsable no solo de la actividad tóxica, y por consiguiente de cualquier efecto que pueda provocar en el ser humano; por tal razón el estudio de la presencia de estos se convierte en una de las bases de la investigación, los metabolitos investigados fueron: Taninos, Glicósidos saponínicos, Glicósidos cardiotónicos, Antraquinonas, Sesquiterpenlactonas, Alcaloides y Flavonoides, para los cuales se utilizaron técnicas y procedimientos específicos para cada uno de ellos.

En la tabla N° 5 de resultados fitoquímicos de las especies estudiadas, se puede observar que la mayoría contiene Taninos, esto es porque los taninos son metabolitos que le sirven a la planta como mecanismo de defensa y para la formación de los ácidos de los frutos, en cuanto a Glicósidos Cardiotónicos y Antraquinonas, la mayoría de plantas carecen de ellos, ya que estos compuestos son más escasos en la naturaleza.

Los resultados de Flavonoides son positivos en el 50% aproximadamente de las plantas; estos le proporcionan el color ó la pigmentación a los diferentes órganos de la planta, específicamente a las flores.

Saponinas y Sesquiterpenlactonas dieron positivas en algunas especies, ya que estos compuestos son específicos para ciertas especies los cuales le confieren a la planta sus usos farmacológicos.

Dichos procedimientos identifican los metabolitos presentes en forma general , por ejemplo: los Taninos se dividen en Hidrolizables como los galitaninos y elagitaninos, Condensados y Pseudotaninos. Las pruebas realizadas con Agua de bromo, Tricloruro de hierro, solución de gelatina,... y subacetato de plomo(Tabla N°3) son para identificar a los taninos en forma general y no específicamente a un tipo de ellos, como pueden ser los galitaninos ó elagitaninos, por tal razón no se puede especificar de que metabolito depende la actividad citotóxica, ya que también existe la posibilidad de un sinergismo entre todos los componentes de todos los metabolitos secundarios.

3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS SOBRE EL BIOENSAYO.

Es importante mencionar que de los 25 especies vegetales estudiadas, 18 de ellas presentaron actividad citotóxica; por consiguiente 7 extractos vegetales no lo hicieron.(Tabla N°6)

De los 18 extractos con actividad citotóxica, solamente 9 poseen una concentración letal 50 menor de 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla N° 7), la cual se considera toxica; los 9 restantes aunque con actividad toxica, no es lo suficiente para poseer una concentración letal 50 toxica, ya que ésta excede de 1000 $\mu\text{g/ml}$. Osea que se necesitaría una cantidad de extracto mucho mayor para poder alcanzar una concentración que sea toxica.

Se grafican el porcentaje de mortalidad en el eje de las ordenadas, en una escala lineal y la concentración 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 1, 10, 100, 1000 que se observan en el gráfico (siendo entonces 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , respectivo); para trazar los puntos.

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

- Plantas que presentan una LC 50 menor de 1000 $\mu\text{g/ml}$ (tóxica):
Chula, Tempate, Amatillo, Hierba mora, Jiote, Jengibre, Salvia santa e Izote
- Plantas que presentan una LC 50 mayor de 1000 $\mu\text{g/ml}$ (no tóxica):
Curarína, Mirto, Hierba del toro, Tomate, Hierba del susto, Sigupate, Grama, Granado y Copinol.

4 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DEL BIOENSAYO.

Esta es la parte medular de la investigación, ya que determinará si el uso de una planta es seguro o no como tratamiento médico, por tal razón este procedimiento debe ser estricto y minucioso en cada una de las partes que lo conforman.

El valor de la LC50 es el parámetro que nos determinará el peligro de una especie vegetal, bibliográficamente se conoce que si el valor numérico de la LC 50 de una especie vegetal es menor de 1000 ug/ml, se considera citotóxica y si los excede no citotóxica, ya que se necesita una concentración mayor de la necesaria para poder alcanzar el nivel de toxicidad.

Dicho procedimiento para conocer la LC 50 es un programa computarizado llamado "Se prohibit" Para utilizar dicho programa únicamente se introducen datos de concentración con su respectivo porcentaje de mortalidad; obteniéndose una grafica de concentración letal 50(LC 50) con su respectivo valor (Tabla N° 7).

Es apremiante mencionar que una LC 50 considerada no toxica, no significa que el extracto a concentraciones diversas no haya matado, ya que existen muestras con LC 50 no toxicas (mayores de 1000 μ g/ml) que han matado a concentraciones tanto de 1000 como a 5 ug/ml, con la característica que lo han hecho en bajos porcentajes (menores de 50 %) en las diferentes concentraciones; también existen casos donde a existido actividad citotóxica solo en las primeras tres concentraciones(1000, 500 250 μ g/ml) con la característica de ser en un alto porcentaje, obteniéndose una LC 50

toxica, en este ultimo caso el valor de “r” no es tan próximo a la unidad, por no existir una secuencia entre el porcentaje de mortalidad y su respectiva concentración.

Este procedimiento determina la capacidad de las especies vegetales en destruir o matar un organismo vivo(Artemia salina), y a la vez si una planta es citotóxica o no, dicha relación es debida, ó esta fundamentada en resultados de experimentos que determinaron que la Artemia salina es semejante en comportamiento a las células humanas; por tal motivo si una planta presenta resultados citotóxicos en el Bioensayo, esta podría ser capaz de destruir células humanas a bajas dosis, lo cual es perjudicial, pero benéfico en el caso de destruir células humanas malignas como las cancerigenas, por tal razón los siguientes resultados son una pauta para estudios posteriores sobre la peligrosidad o beneficio que involucra la utilización de especies vegetales como tratamientos médicos.

En el caso del Tempate y Amatillo, según el cuadro se observa que son las plantas cuyo valor de toxicidad se considera bien alto; en el caso del Tempate es una planta utilizada más que todo para uso externo. Pero en el caso de la semilla, muestra toxicidad ya que existen antecedentes de muerte ocasionada por la ingesta de estas. Con este resultado se previene también el uso de tallo y hojas en forma oral, por los daños que ocasiona al humano.

El Amatillo según bibliografía no hay datos de utilización medicinal solo del aspecto toxico de ella, lo cual se comprueba con los resultados obtenidos.

En el caso de la Salvia Santa no se han encontrado estudios toxicológicos para esta planta, pero sí posee efecto tóxico el aceite esencial, el cual puede estar presente en pocas cantidades, pero al ser utilizada en altas dosis puede ocasionar nauseas, diarreas y vómitos. Sin embargo se necesitan más estudios de toxicidad ya que esta es una planta muy utilizada para efectos medicinales.

La Hierba Mora según la bibliografía se reporta como toxica en algunos países, por ser causante de envenenamientos en niños. Sin embargo se necesitan más estudios de toxicidad como para no ser recomendadas en el uso humano desde el punto de vista alimenticio por su riqueza en hierro y por consecuencia el fortalecer la sangre. Igual consideración debe hacerse para el caso del Jengibre, Jiote, Chula y Albahaca quienes numéricamente están mas bajos en toxicidad que el Tempate y el Amatillo.

Hay factores que por su importancia en las graficas (ver pag. 65, 66,..., 89), son de mucho interés, como graficar porcentaje de mortalidad vrs logaritmo de la concentración, el valor de la concentración letal 50 se obtiene en ug/ml, y su respectivo logaritmo, dicho programa presenta el coeficiente de relación “r”, el cual expresa la certeza que el valor de LC 50 obtenido es el correcto si, y solo si el coeficiente “r” se encuentre lo más próximo a la unidad, lo cual es el reflejo de la relación descendente que existe entre el porcentaje de mortalidad y las concentraciones.

CONCLUSIONES

1. El método de maceración es el más adecuado para obtener los extractos vegetales, por no existir la posibilidad de destrucción de los componentes termolábiles.
2. El análisis fitoquímico preliminar se realizó de forma cualitativa, por lo que se utilizaron técnicas y procedimientos de identificación específicos para cada metabolito secundario.
3. Los puntos críticos, que se deben tomar en cuenta para la realización del Bioensayo son:
 - Periodo de incubación de la Artemia (Nauplio)
 - Condiciones optimas del agua..
 - Tiempo de lectura de resultados.
4. Se determino la actividad biológica in vivo a concentraciones de 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5 μ /ml. En cuanto a citotóxicidad que presentan 25 especies vegetales de uso materno infantil mediante el ensayo simple con Artemia salina debido al uso excesivo de dichas especies vegetales.

5. Se realizó el bioensayo de citotoxicidad utilizando Artemia salina por el método de los micropozos, porque proporciona resultados rápidos, confiables y reproducibles.
6. El estudio realizado con Artemia salina es útil para la selección de aquellas plantas que poseen actividad tóxica en células humanas, sean malignas ó benignas, pero debe ser complementado con bioensayos in vitro, para recomendar su administración como alternativa segura en el área materno infantil.
7. Los extractos obtenidos de las especies vegetales: Punica granatum(Granado), Hymenaea courbaril(Copinol), Tridax procumbens(Hierba del toro), Sansevieria quineensis(Curarían), Justicia carthaginensis(Hierba del susto), Lycopersicum esculentum(Tomate), Plunchea odorata(Siguapate), Paspalum notalum(Gramma), Murraya paniculata(Mirto), pueden ser utilizados, ya que no presentaron una LC50 menor de 1000 ug/ml., pero con la debida precaución en el uso oral de las especies vegetales.
8. El uso en el área materno infantil de los extractos vegetales por vía oral: Jatropha curcas(Tempate), Rauwolfia tetraphilla(Amatillo), Ocimum bacilicum(Abahaca), Solanum nigrum(Hierba mora), Zingiber officinalis(Jengibre), Lippia alba(Salvia

santa), Bursera simarouba(Jiote), Catharantus roseaus(Chula), Yucca elephantipes(Izote), no son seguras por presentar citotoxicidad, según el bioensayo de Artemia salina.

9. No se encontró una relación directa entre algún componente de las especies vegetales con su respectiva toxicidad, ya que las pruebas de análisis únicamente determinan el metabolito secundario existente, en ningún momento el tipo de ese metabolito y mucho menos la cantidad presente de este.

RECOMENDACIONES

1. Debido a que las especies vegetales poseen componentes termolábiles es conveniente utilizar métodos de extracción en los cuales la temperatura sea la mas baja posible (40°C); como el método de maceración ó percolación.
2. Para conocer de forma certera, cual y que cantidad de metabolito secundario es el causante de la actividad citotóxica de una especie vegetal, es necesario la realización de otras investigaciones las cuales determinen el tipo de metabolito que causa dicha acción.
3. El estudio con Artemia salina es la etapa primaria de una serie de investigaciones que en conjunto nos determinarán si una especie vegetal presenta citotoxicidad, por tal razón se recomienda realizar estudios más específicos en cuanto al mecanismo por el cual la especie vegetal actúa en las células humanas, y poder determinar así de forma más certera la toxicidad de estas.
4. Se recomienda realizar programas educativos que vayan encaminados a concientizar a las personas de el peligro que significa la mala utilización de especies vegetales en procesos preventivos o curativos de enfermedades.

5. Por los resultados obtenidos en esta investigación, se recomienda no utilizar por vía oral las plantas que presentaron una LC 50 toxica, Jatropha curcas(Tempate), Rauwolfia tetraphilla(Amatillo), Ocimum bacilicum(Abahaca), Solanum nigrum(Hierba mora), Zingiber officinalis(Jengibre), Lippia alba(Salvia santa), Bursera simarouba(Jiote), Catharantus roseaus(Chula), Yucca elephantipes(Izote) por la posible producción de procesos degenerativos en células humanas.

6. En el caso de las especies vegetales que presentan una concentración letal 50 mayor de 1000 µ/ml: Punica granatum(Granado), Hymenaea courbaril(Copinol), Tridax procumbens(Hierba del toro), Sansevieria quineensis(Curarían), Justicia carthaginensis(Hierba del susto), Lycopersicum esculentum(Tomate), Plunchea odorata(Siguapate), Paspalum notalum(Gramma), Murraya paniculata(Mirto), se recomienda ser precavidos en el uso oral de dichas plantas.

7. Para obtener un resultado completo del riesgo – beneficio que presenta el uso de especies vegetales en procesos preventivos y curativos, es recomendable realizarles otros análisis a: Jatropha curcas(Tempate), Rauwolfia tetraphilla(Amatillo), Ocimum bacilicum(Abahaca), Solanum nigrum(Hierba mora), Zingiber officinalis(Jengibre), Lippia alba(Salvia santa), Bursera simarouba(Jiote), Catharantus roseaus(Chula), Yucca elephantipes(Izote), como la utilización de

líneas celulares (células KB) para realizarles interacción con ADN por cromatografía líquida de alta resolución y así determinar si el extracto produce destrucción o curación de dichas células.

8. Lo más importante que debe tener presente la población es que el uso de cualquier especie vegetal o sustancia química para prevenir o curar una enfermedad debe ser prescrita por profesionales en la rama y no convertirse en una cifra más como estadística de muertes por automedicación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Base de datos de APROCSAL
2. CÁCERES, A. "Plantas de uso Medicinal en Guatemala" 1ª Edición, Editorial Universitaria. Guatemala C.D. 1996.
3. COLL M. J. "Acuicultura Marina Animal", 2ª Edición, Ediciones Mundi Prensa Madrid, 670 p. 1986.
4. DOMÍNGUEZ, X. A. "Métodos de Investigación Fitoquímica", 1ª Edición, Editorial Limusa, México D. F., 1973
5. EVANS, W. C. "Farmacognosia", 13ª Edición, Editorial Interamericana Mc Graw Hill, México D. F. 1991
6. GALLEGOS GONZÁLEZ, C. I.; MELÉNDEZ LÓPEZ, D. I. "Determinación de la bioactividad de 26 especies de la Flora Salvadoreña mediante el Bioensayo Interacción con ADN por Cromatografía Líquida de alta resolución", Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, El Salvador, 2000

7. GUPTA, M. P. "270 Plantas Medicinales Iberoamericanas" 1ª Edición, Edición Presencia Ltda.. Colombia 1995.
8. <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/index/mesodP.html>
9. LATHROP STEDMAN, T. "Diccionario de Ciencias Medicas Ilustrado" Editorial Medica Panamericana, 25a Edición 1993.
10. MARTÍNEZ, M. "Las Plantas Medicinales de México" 6ª Edición, Ediciones Botas S. A. México D. F. 1990.
11. MENA GUERRERO, M. G. "Obtención y Aprovechamiento de Extractos vegetales de la Flora Salvadoreña", 2ª Edición, Editorial Universitaria, 1994, UES, Ciudad Universitaria, San Salvador, El Salvador.
12. MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; POTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICOLAS, D. E. AND J.L. MACLAUGHLIN "A convenient General Boiassay for Active Plant Constituents". 1982.

13. MORALES HERNÁNDEZ, R. E. “Principales Plantas Medicinales Utilizadas en los Municipios de Santa Ana, Coatepeque, Chalchupa y Texistepeque”, Departamento de Santa Ana, Universidad de El Salvador, San Salvador, Enero 1990.
14. PABLO N. S.; COLIN W. W.; MARGARET M. A.; MAHABIR P. G. AND DAVID, J. P. “A Microwell Cytotoxicity Assay Using Artemia salina (Brine Shrimp)”. 1992.
15. PAHLOW M.”El gran libro de las plantas medicinales. La salud mediante las fuerzas curativas de la naturaleza”, 5ª Edición, Editorial Everest, S.A. España.
16. Plantas Alimenticias y Medicinales de la zona semiárida de Guatemala, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá.(INCAP).1988
17. TORTORA, J. G. “Introducción a la Microbiología” Editorial ACRIBIA, S. A. ZARAGOZA(España) 1993.
18. TUÑÓN N.”La Artemia salina: Uso y Manejo”

GLOSARIO

- Alcaloide: Base salificable nitrogenada, de procedencia orgánica y propiedades alcalinas.
- Alcaloide: Nombre que reciben diversas sustancias de origen vegetal que, en pequeñas dosis, ejercen efectos farmacológicos sobre el organismo.
- Antifúngica: Que evita el desarrollo de hongos o los destruye.
- Antihelmíntica: Que destruye o expulsa gusanos.(Generalmente los del intestino).
- Basca: Ansia, inquietud en el estomago, cuando se quiere vomitar.
- Carminativa: Medicamento que favorece la expulsión de los gases intestinales.
- Carminativo: Agente que previene la formación de gases en el tubo digestivo o provocan la expulsión de los mismos.
- Catarro: Inflamación de una mucosa de las vías respiratorias acompañada de secreción.
- Citotóxico: Agente toxico para las células, no muestra efecto selectivo sobre células de cáncer y células normales.
- Cocimiento: Cocción, liquido cocido con hierbas u otras sustancias medicinales.
- Emético: Sustancia que induce al vomito. Vomitivo.
- Empacho: Ingestión.
- Glucósido: Molécula derivada de la glucosa, muchas de las cuales ejercen alguna acción farmacológica sobre el organismo.
- Infección: Enfermedad

Inflorescencia: Agrupación de flores en las ramificaciones de la planta.

Maceración: Operación consistente en mantener la planta sumergida en un líquido (agua, vino, alcohol, vinagre u otros), a temperatura ambiente durante un tiempo determinado.

Perenne: Se dice de las plantas que viven más de dos años.

Taninos: Sustancia astringente que abunda en los frutos verdes (no maduros), y se confieren su característico sabor.

Terpenos: Sustancias aromáticas que forman parte de la composición de esencias y resinas.

Metrorragia: Cualquier sangrado acíclico irregular del útero entre períodos.

Blenorragia: Es toda descarga mucosa, especialmente de la uretra a la vagina.

Emenagoga: Agente que induce o aumenta el flujo menstrual.

Galactogoga: Agente que promueve la secreción y el flujo de leche.

ANEXO N° 1

PROGRAMA DE COMPUTADORA PARA CALCULO “PROBIT” PARA ARTEMIA SALINA

Estudiar simultáneamente dos o más variables con el objeto de determinar si dichas variables guardan algún grado de relación o asociación, es lo que mide la **Regresión** y la **Correlación**. La regresión mide, a través de una ecuación, la posible relación entre las variables con el objeto de predecir una de ellas en función de la o de las otras variables; si se trata de dos variables la regresión y la correlación son simples.

El objeto principal del análisis de la regresión lineal es establecer una relación funcional entre dos variables relacionadas, tomando datos muestrales que constituyen buenos estimadores de la correspondiente relación poblacional. Una vez que se ha establecido cuantitativamente esta relación (mediante la correspondiente ecuación) es posible predecir o estimar el valor de una de las variables (la dependiente) en función de la otra.(independiente)

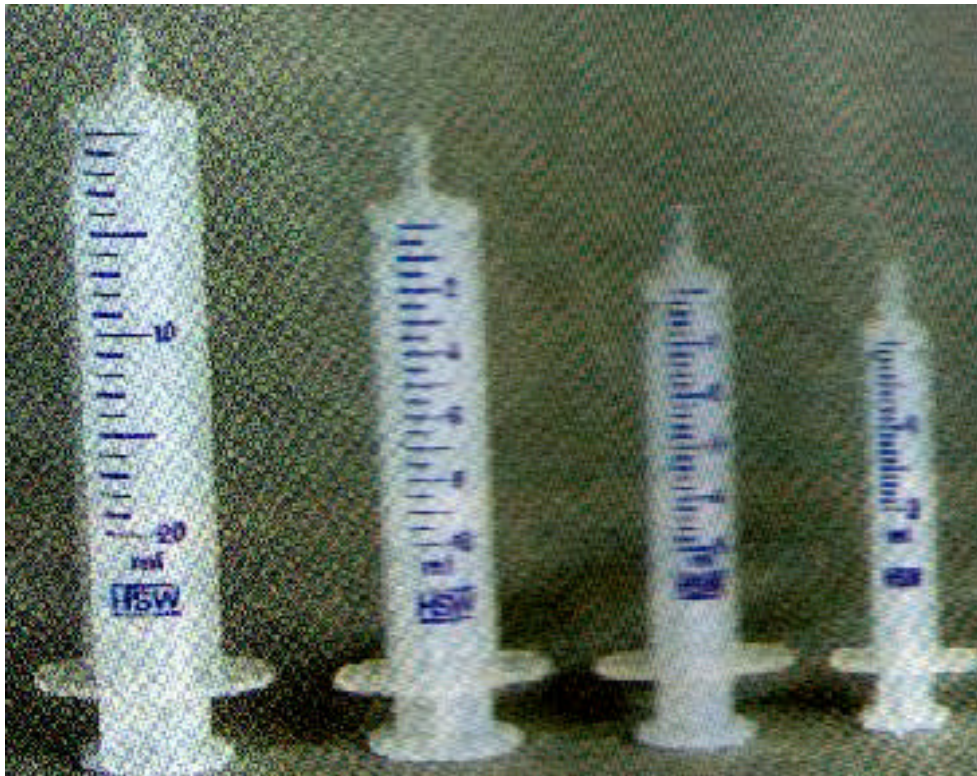
La correlación mide la intensidad o fuerza con que están relacionadas las variables, y será expresada como coeficiente de relación (r). La correlación perfecta entre las variables está indicada por un valor de $r = 1$, esto es cuando por aumentos en la variable independiente ocurre también aumentos en la variable dependiente, o si disminuye la variable independiente, ocurren disminuciones en la variable dependiente.

La regresión y la correlación guardan una íntima relación, ya que entre mayor sea el valor del coeficiente de correlación r , mayor será la utilidad de la ecuación de regresión para hacer estimaciones de la variable dependiente, y viceversa, entre menor sea el valor de r (valor absoluto), menos útil es la ecuación de regresión para efectos de estimaciones de la variable dependiente. Se recomienda que antes de calcular la ecuación de regresión entre dos variables, se debe calcular primero el coeficiente de correlación entre dichas variables, y si el valor de r es del orden de $r=0.70$ ó más se recomienda el cálculo de la ecuación de regresión, ya que si el coeficiente de correlación es menor de $r=0.70$ el cálculo de la ecuación de regresión no

estimara acertadamente el valor de las variables dependientes que interesen conocer, porque las variables no estarán relacionadas adecuadamente entre sí.

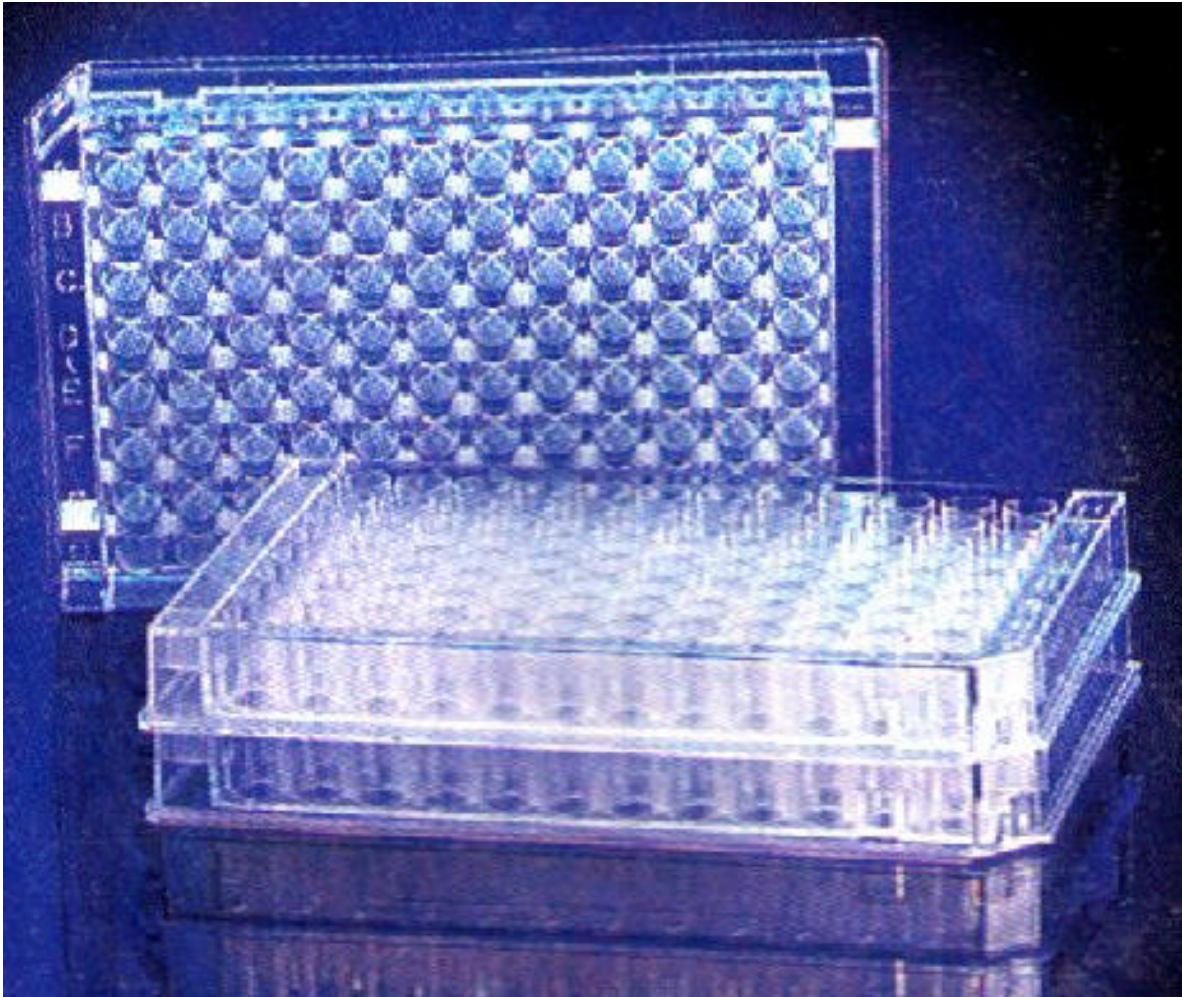
El procedimiento para calcular la ecuación de regresión y el valor del coeficiente de correlación para obtener la concentración letal 50 (LC50) de los extractos vegetales ensayados se puede evitar si se utiliza el **Programa de computadora para Cálculo “Probit”**, el cual con la simple introducción de las concentraciones de los extractos(variable independiente) y los respectivos porcentajes de mortalidad de Artemia salina (variable dependiente), calcula los logaritmos base 10 de cada concentración para dar un valor más exacto tanto de la Concentración Letal 50 como del coeficiente de Correlación, el cual indica la confiabilidad que el valor calculado como Concentración Letal 50 presenta tanto mas cercano este a la unidad.

ANEXO N° 2



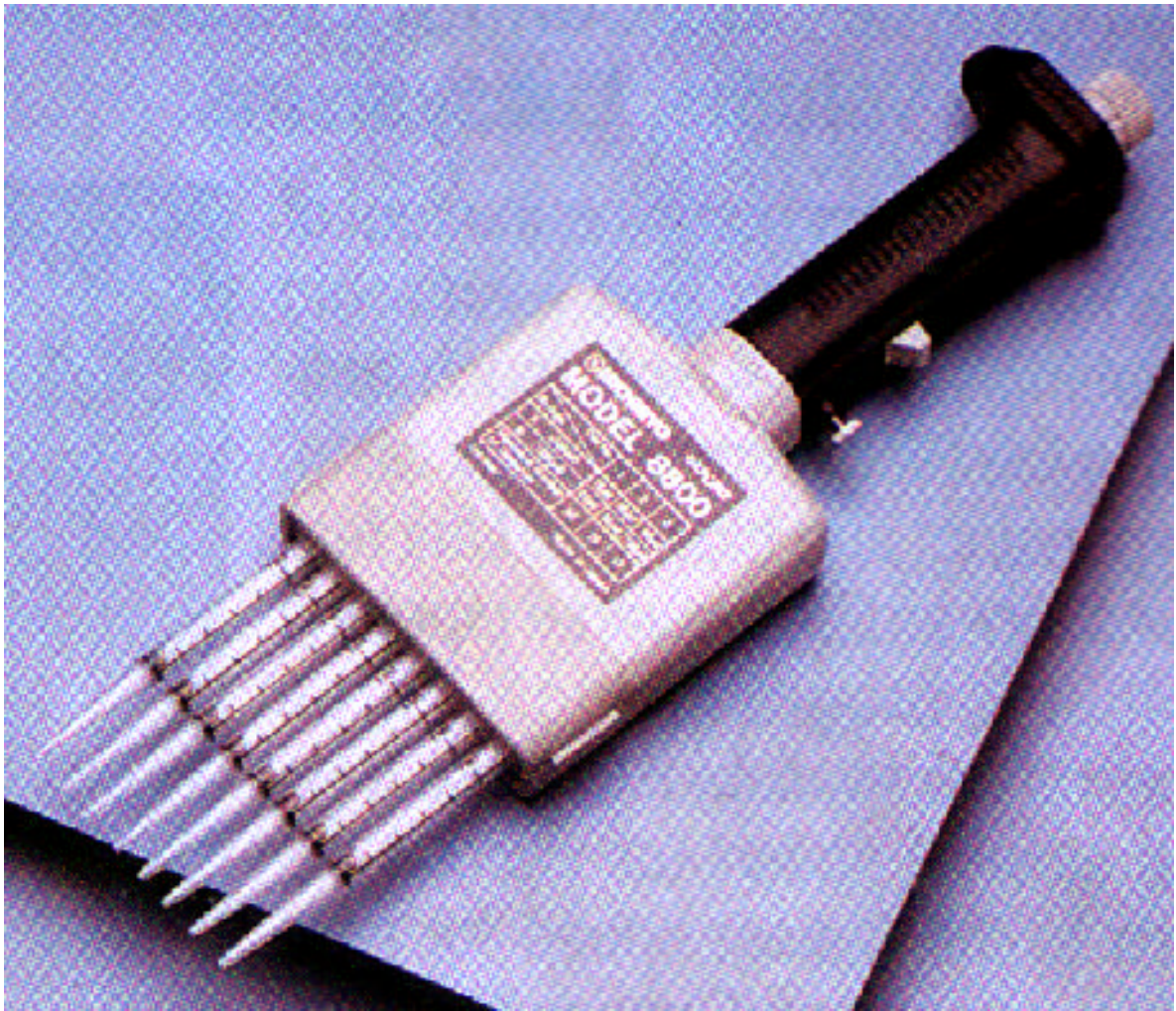
JERINGAS, Utilizadas para filtrar el extracto etanólico.

ANEXO N°3



MICROPOZOS, Utilizados para el Bioensayo de Mortalidad de Artemia Salina.

ANEXO N° 4



MICROPIPETA DE OCHO CANALES Utilizada para el llenado de las placas de micropozos en los Bioensayos de Citotoxicidad con Artemia salina.

ANEXO N° 5



MICROPIPETA REGULABLE Y FIJA, Utilizadas para el Bioensayo de mortalidad de Artemia salina.



PUNTAS Para micropipetas Utilizadas en el Bioensayo de Citotoxicidad con Artemia salina.

ANEXO N° 6



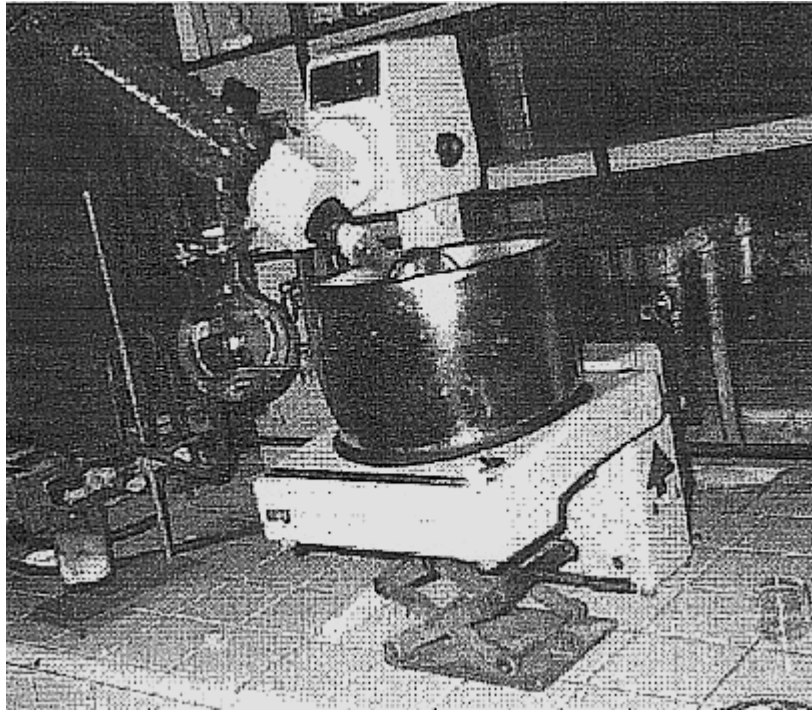
HIDROMETRO O SALINOMETRO, usado para medir el grado de salinidad del agua de mar utilizada para la eclosion de los huevos de Artemia salina.

ANEXO N° 7



ESTEREOSCOPIO Utilizado para realizar el recuento de Artemia salina muerta y/o viva en cada bioensayo realizado para los extractos vegetales.

ANEXO N° 8



ROTAVAPOR, utilizado para la obtención de los extractos.

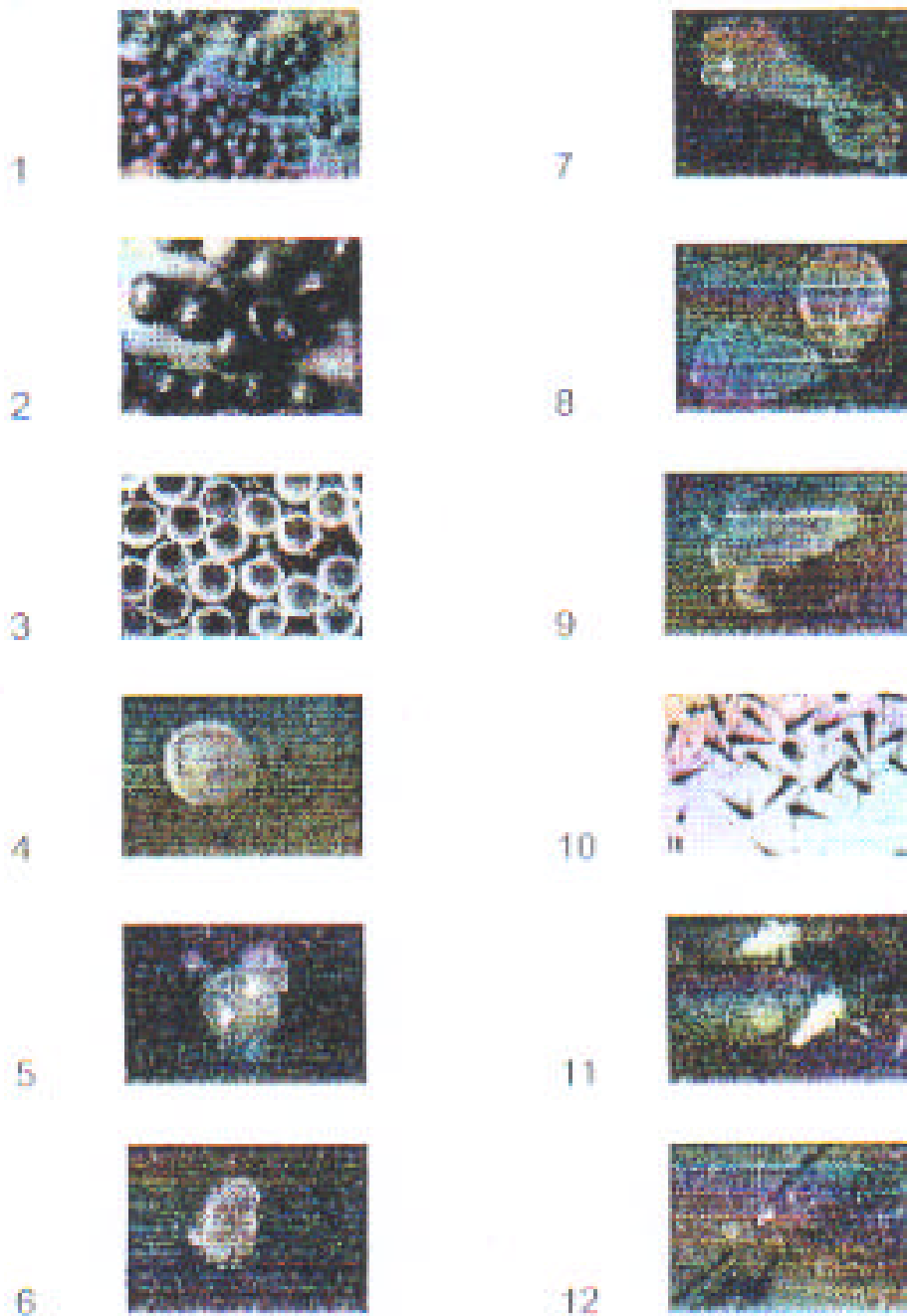
ANEXO N° 9

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

cm.	Centímetro.
mt.	Metro.
mg.	Miligramo.
min.	Minuto.
ml.	Mililitro.
ul.	Microlitro.
ug.	Microgramo.
mm.	Milímetro.
DMSO	Dimetilsulfoxido.
ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
UES	Universidad de El Salvador.
LC50	Concentración letal 50.
sp.	Especie.
ppt.	Partes por trillón
ppm.	Partes por millón.
mg/l.	Miligramo por litro.
ug/ml	Microgramo por mililitro.
KOH	Hidróxido de potasio.

Asterisco. Plantas que presentan sus monografías

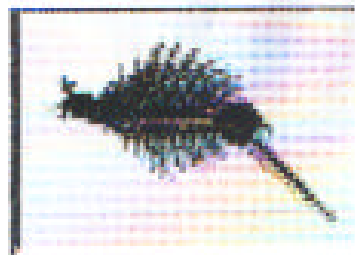
ANEXO N° 10



CICLO DE VIDA DE ARTEMIA SALINA

1,2,3 Cistos secos e hidratados de *Artemia* sp.; 4,5,6,7,8,9,10 Secuencia de Eclosion de un Nauplio de *Artemia* sp.; 11,12 Nauplio de *Artemia* sp.

ANEXO N° 11

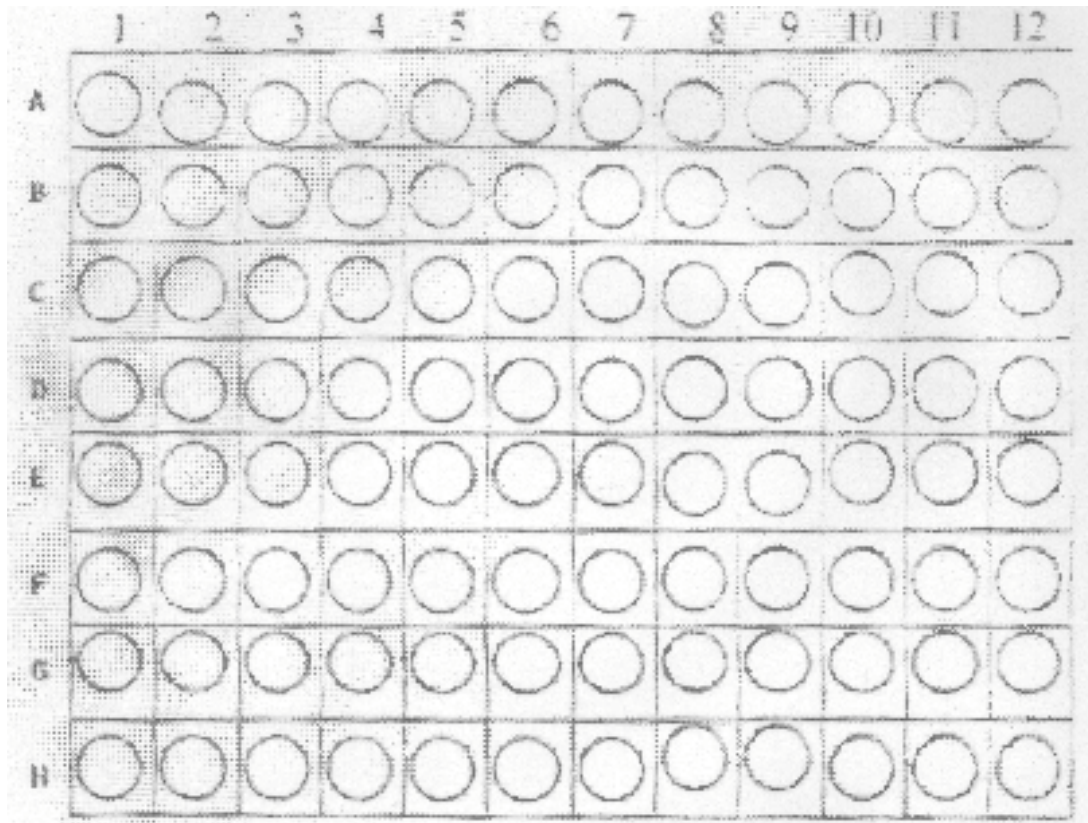


Artemia salina Adulta.

ANEXO N° 12

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	PARTE RECOLECTADA	LUGAR DE RECOLECCION
<u>Jatropha curcas</u>	Tempate	Tallo y Hojas	UES
<u>Chenopodium ambrosoides</u>	Epazote	Hojas	San Salvador
<u>Catharantus roseaus</u>	*Chula	Tallo y Hojas	Santa Ana
<u>Sanseviria quineensis</u>	Curarina	Hojas	Santa Ana
<u>Rauwolfia tetraphila</u>	*Amatillo	Tallo y Hojas	La Libertad
<u>Solanum nigrum</u>	Hierba mora	Tallo y Hojas	San Salvador
<u>Murraya paniculata</u>	*Mirto	Hojas	La Libertad
<u>Bursera simarouba</u>	Jiote	Hojas	San Salvador
<u>Eugenia jambos</u>	Manzana rosa	Tallo y Hojas	San Salvador
<u>Tridax procumbens</u>	Hierba del toro	Tallo y Hojas	Santa Ana, UES
<u>Lycopersicum esculentum</u>	Tomate	Tallo y hojas	Santa Ana
<u>Ricinus communis</u>	*Higuerillo	Tallo y Hojas	Sonsonate
<u>Ocimum basilicum</u>	Albahaca	Hojas	San Salvador
<u>Zingiber officinalis</u>	Jengibre	Rizomas	San Salvador
<u>Lippia alba</u>	Salvia santa	Tallo y hojas	La Libertad
<u>Eryngium foetidum</u>	Alcapate	Hojas	Santa Ana
<u>La andula officinalis</u>	Alhucema	Hojas	San Salvador
<u>Cassia grandis</u>	Carao	Tallo y hojas	San Salvador
<u>Yucca elephantipes</u>	Izote	Tallo y hojas	San Salvador
<u>Justicia carthaginensis</u>	Hierba del susto	Tallo y Hojas	La Libertad
<u>Plunchea odorata</u>	Siguapate	Hojas	San Salvador
<u>Paspalum notatum</u>	*Gramma	Tallo	Santa Ana
<u>Punica granatum</u>	*Granado	Tallo y Hojas	San Salvador
<u>Hymenaea courbaril</u>	Copinol	Hojas	San Salvador
<u>Guazuma ulmifolia</u>	Caulote.	Hojas	San Salvador
<u>Jatropha curcas</u>	Tempate	Tallo y hojas	San Salvador

ANEXO N° 13



MODELO DE MICROPOZOS para anotar la mortalidad de la Artemia salina.



APROCSAL

ASOCIACIÓN DE PROMOTORES COMUNALES SALVADOREÑOS

San Salvador, 22 de Octubre del 2001

A QUIEN CORRESPONDA

Por éste medio hacemos del conocimiento que en los Proyectos de Desarrollo que la Asociación de Promotores Comunales Salvadoreños-APROCSAL, realiza en diferentes comunidades de El Salvador, se han elaborado diagnósticos de la utilización de Plantas Medicinales en los cuales se encontró que el listado de 25 especies que aparecen en el trabajo de Investigación "Determinación de la Bioactividad Citotóxica de Extractos de 25 Especies Vegetales de Uso Materno Infantil, mediante el ensayo simple de Artemia Salina, son las mayormente utilizadas en el área materno-infantil para diferentes enfermedades, razón por la cual se tomaron como muestras para estudiar sus actividades biológicas. Por lo que damos nuestro completo respaldo a la investigación sobre estas plantas.

Atentamente,

Lic. Sandra Guerrero
Coordinadora del Área de
Investigación de APROCSAL

