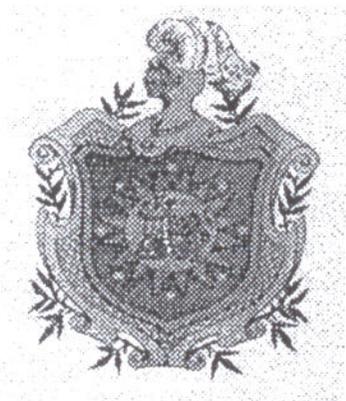


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN – LEÓN**

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA



MONOGRAFÍA

PREVIA OPCIÓN AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA.

TEMA

**MARCHA FITOQUIMICA Y ACTIVIDAD CITOTÓXICA CON
ARTEMIA SALINA DE LA CORTEZA DEL ARBOL
BURSERA SIMARUBA
(JIÑOCUABO)**

INTEGRANTES:

**Bra. Digna Yadira Martínez Mayorga.
Bra. Jasmina del Socorro Rojas Vargas.**

TUTOR:

MSc. Zandra Jirón Aguilar.

León, Enero del año 2002



190.597
c.1

Q01
378.2
M385
2002



DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Jehová Dios fuente inspiradora de todo conocimiento, a Jesucristo que por su sangre derramada, aún continuó con vida y por la bondad inmerecida que ellos me han brindado hasta la conclusión de mis estudios.

A mis padres Marcelino José Martínez Baca y Sra. Petrona Ileana Mayorga de Martínez por su paciencia y Cariño por que ellos siempre han estado conmigo en los momentos más difíciles de mi vida y mi carrera y gracias a ello hoy están recogiendo el fruto de su esfuerzo.

A mis hermanos Jaron A., Marvin F., Darwin, Ileana María Martínez Mayorga por que a pesar de todo me han dado su apoyo de una u otra manera.

A mi tía Sra. María Cleofé Mayorga Serrano por su apoyo porque estuvo conmigo siempre brindándome su ayuda incondicional.

Digna Yadira Martínez Mayorga.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Jehová Dios fuente inspiradora de todo conocimiento, a Jesucristo que por su sangre derramada, aún continuó con vida y por la bondad inmerecida que ellos me han brindado hasta la conclusión de mis estudios.

A mis padres Jorge Domingo Rojas Amador y Sra. Salvadora Vargas de Rojas por su paciencia y Cariño por que ellos siempre han estado conmigo en los momentos más difíciles de mi vida y mi carrera y gracias a ello hoy están recogiendo el fruto de su esfuerzo.

A mis hermanos Jorge Luis y Xiomara Rojas Vargas por que a pesar de todo me han dado su apoyo de una u otra manera.

Jasmina Rojas Vargas.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer muy encarecidamente a todas aquellas personas que de una u otra manera ayudaron a la realización de esta tesis.

A mi tutora Msc. Zandra Jirón Aguilar por la confianza depositada en mi al brindarme este tema de tesis y su incansable ayuda para la culminación de la misma.

A las licenciadas y amigas que siempre van a estar en mi corazón por el cariño recibido a través de los años Claudia Campos, Rosa Emilia Ramos, Eveling Meza, Digna, Jasmina, Karla, Manuel, William, Freddy, etc.

A los licenciados Erick Amaya y Samuel Vilchez por su apoyo, amistad incondicional, además de su gran ayuda y tiempo prestado.

A las licenciadas del laboratorio de agua por su apoyo, al Sr. Rafael Olivas, Doña Maura por su ayuda.

Por último agradecer al personal de la biblioteca por su amable atención especialmente a Doña Ligia, a todos ustedes muchas gracias.

*Digna Yadira Martínez Mayorga.
Jasmina Rojas Vargas.*

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION

OBJETIVOS

	Pág.
I. MARCO TEORICO	1
1.1 Clasificación Taxonómica del Arbol Bursera Simaruba	1
1.2 Descripción Botánica	1
1.3 Distribución Geográfica y Ecológica	1
1.4 Usos Medicinales	1
1.5 Farmacología y Actividad Biológica	3
1.6 Información General acerca de la Anemia	3
1.7 Fármacos Usados en el Tratamiento de la Anemia	6
1.8 Estructuras de Fármacos Usados en el Tratamiento de la Anemia	8
1.9 Método de Investigación Fitoquímica	9
1.10 Técnica de Extracción y Separación	9
1.11 Metabolitos Primarios y Metabolitos Secundarios	10
1.12 Taninos	11
1.13 Cromatografía	12
1.14 Color de los Reactivos Orgánicos	14
1.15 Prueba de Artemia Salina	15
1.16 Determinación de Hierro a través del Método Espectrofotocolorimétrico O-Fenantrolina en la Corteza Bursera Simaruba	18
II. PARTE EXPERIMENTAL	
2.1 Material Vegetal Estudiado	22
2.2 Equipo Utilizado	22
2.3 Cristalería	23
2.4 Reveladores	23
2.5 Reactivos y Solventes Utilizados	24
2.6 Procedimiento Experimental (Diagrama de Flujo)	25
2.7 Marcha Fitoquímica	26
2.8 Estructuras Químicas de los Estándares Usados en la Marcha Fitoquímica	29
2.9 Fraccionamiento del Material Vegetal por C.L.B.P	33
2.10 Resultado de la C.C.D. de las Fracciones Obtenidas por C.L.P.M.	33
2.11 Ensayo de Toxicidad con Artemia Salina	34
2.12 Bioensayo	36
2.13 Determinación de la Dosis Letal Media DL50	38
2.14 Determinación de Hierro. Método O-Fenantrolina	55
2.15 Preparación de la Muestra Vegetal	55
2.16 Preparación de los Reactivos	56
2.17 Procedimiento del Método O- Fenantrolina	57
2.18 Calibración y Medición	58
2.19 Preparación de la Curva de Calibración	58
2.20 Medición de la Muestra Problema	61

III.	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	
3.1	Análisis de los Resultados de la Marcha Fitoquímica	66
3.2	Análisis de la Prueba de Toxicidad	66
3.3	Análisis de los Resultados de la Determinación de Hierro	67
IV.	CONCLUSIONES	68
V.	RECOMENDACIONES	69
VI.	BIBLIOGRAFIA	70
VII.	GLOSARIO	72
VIII.	ANEXOS	74

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un estudio fitoquímico preliminar en la corteza del árbol *BURSERA SIMARUBA* conocida comúnmente como “Jiñocuabo” el cual crece en todas las zonas de Nicaragua.

Se inició el procedimiento con la búsqueda de metabolitos secundarios haciendo uso de reactivos de coloración y precipitación así como del monitoreo por cromatografía de capa delgada (MARCHA FITOQUIMICA).

En una segunda etapa la muestra seca y finamente dividida es sometida a un proceso de separación por cromatografía líquida de columna de baja presión, eluida con solventes de polaridad creciente, hexano, acetato de etilo, etanol y agua, obteniéndose las correspondientes fracciones individuales.

En una tercera etapa se evaluó la actividad citotóxica DL₅₀ mediante el bioensayo con *ARTEMIA SALINA*, se utilizó el extracto crudo etanólico (Soxhlet) y las fracciones cromatográficas. Para el tratamiento de los datos, nauplios vivos y muertos después de 24 horas de exposición, se empleó el Método de Reed-Muench, por las gráficas correspondientes se dedujo el valor DL₅₀.

Finalmente se hizo uso de el método espectrofotocolorimétrico 1, 10 fenantrolina para evaluar el contenido de hierro en la corteza del árbol *BURSERA SIMARUBA* (L. Sargent), atendiendo al uso etnobotánico de esta especie como revitalizador anémico.

INTRODUCCION

En nuestro país existe una importante tradición etnobotánica esto es un uso frecuente de las plantas por grandes sectores de la población. Particularmente nuestro propósito es contribuir en el estudio científico-técnico de la flora nicaragüense, con el fin de aumentar las validaciones para el uso popular de las plantas. Es conocido el hecho de que la mayor parte de las especies vegetales de la flora nacional no han sido estudiados en sus aspectos químicos, biológicos y farmacológicos de tal modo que existe un potencial de recursos naturales que se ignoran y podrían satisfacer necesidades de la población.

Las plantas medicinales son especies vegetales que tienen propiedades curativas, constantemente se realizan investigaciones etnobotánicas y farmacológicas en las que se establece la relación existente entre el hombre y las plantas .

El estudio de las plantas adquiere una gran importancia debido a que estas presentan una alternativa de curación principalmente para personas de escasos recursos.

Todo esto nos motiva a realizar una marcha fitoquímica del género *BURSERIA SIMARUBA* (LINNEO) SARGENT en conjunto con pruebas de bioactividad con *ARTEMIA SALINA*.

Durante mucho tiempo se ha usado el *BURSERIA SIMARUBA* (LINNEO) SARGENT como una de las formas de curar un sin número de enfermedades tales como: quemaduras, resfriados, sangrados nasales, abscesos, anemia, etc. Se sabe de su empleo durante la época precolombina y su uso actual es generalizado a nivel nacional, debido a que la madera por su suavidad no se explota es por tanto abundante. La corteza exuda una gomaresina llamada elequeme con propiedades insecticidas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio fitoquímico de la corteza del árbol BURSERA SIMARUBA (LINNEO) SARGENT.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Llevar a cabo una marcha fitoquímica en la corteza del árbol BURSERA SIMARUBA haciendo uso de reacciones de coloración y precipitación, así como el uso de cromatografía plana.
2. Hacer uso de cromatografía de columna de baja presión combinado con gradientes de elución para el fraccionamiento de la corteza del árbol Bursera simaruba.
3. Realizar pruebas de bioactividad DL₅₀ al extracto crudo de la corteza y fracciones cromatográficas através de nauplios de Artemia salina. El método gráfico Reed-Muench servirá para encontrar el valor DL₅₀.
4. Realizar un análisis semi-cuantitativo de hierro en la corteza del árbol Bursera simaruba, haciendo uso del método espectrofotocolorimétrico 1, 10 Fenantrolina-Fe²⁺.

I. MARCO TEORICO

1.1 CLASIFICACIÓN TAXONOMICA DEL ARBOL BURSERIA SIMARUBA

Familia:	Burseraceae
Nombre Científico:	Bursera Simaruba (Linneo) Sargent
Nombre Común:	Indio Desnudo (Costa Rica, Nicaragua)
	Jiñocuabo (Nicaragua)
	Copon (Honduras)
	Jiote (Guatemala)

1.2 DESCRIPCION BOTANICA

Arbol de hasta veinte metros de alto, corteza verde o café rojiza lisa, desprendibles en capas finas y que lo protege de otras plantas que se podrían adherir a su corteza y crecer sobre él. Es más abundante en bosques secos. Las flores son pequeñas de color verde o amarillo es una especie dióico (árbol con flores de ambos sexos). Fruto pequeño rojo, su semilla es dispersada por aves y monos, cuando madura toda la planta tiene un olor a gasolina. Es llamado también árbol de corteza anaranjada, este árbol aún en la época seca cuando ha votado sus hojas sigue realizando la fotosíntesis mediante la corteza es decir que al igual que las hojas, tiene clorofila. Esto le permite evitar pérdida de humedad en el proceso de fotosíntesis que todas las plantas realizan para vivir, es caducifolio (pierde las hojas como respuesta a la falta de agua).

1.3 DISTRIBUCION GEOGRAFICA Y ECOLOGICA

Nativo desde México, Florida y las Antillas hasta el norte de América del Sur. Pricipalmente se le encuentra en bosques secos, pero también lo podemos encontrar en bosques húmedos y crece en todas las zonas de nuestro país.

1.4 USOS MEDICINALES

Nicaragua. La corteza de esta planta es usada en cocción para fortalecer la sangre. El cocimiento de la corteza es usado para curar afecciones ulcerosas.

Cuba. Sus usos populares fundamentales se enfocan en la diarrea, resfriados, como tónico estomacal, diurético y purgante, se emplea las hojas, raíz, corteza, cogollo en decocción.

Guatemala. Se usa para calambres estomacales y para lesiones dermatomucosales .

México. La corteza fresca se usa para quemaduras, sangrados nasales, sarampión, fiebre.

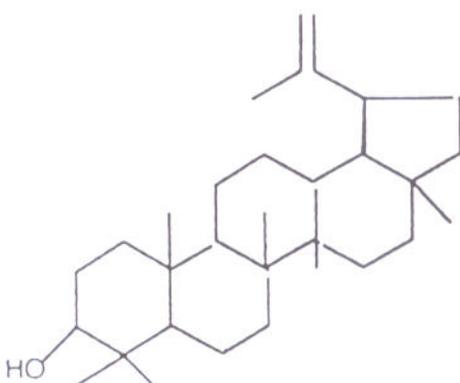
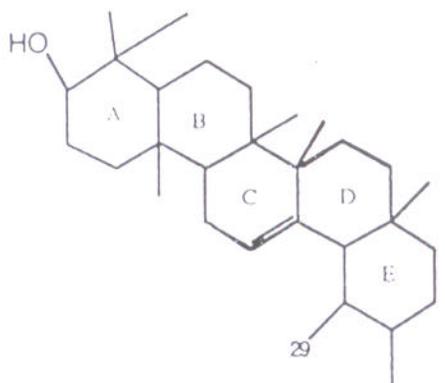
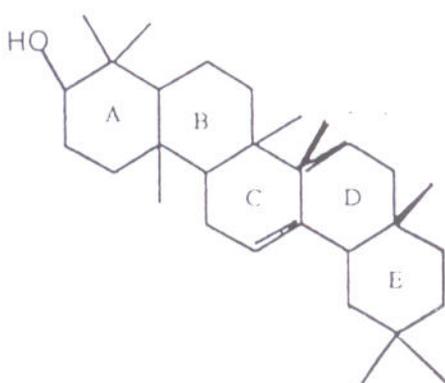
Jamaica. Las hojas, raíces y tallos se usan en el tratamiento de la hipertensión, la resina sirve para absceso y ganglios inflamados.

Costa Rica. La goma-resina es usada para la curación de úlceras y de enfermedades venéreas.

Panamá. La savia de este árbol se usa para curar heridas infectadas como antidiarréico.

QUIMICA DE LA ESPECIE BURSELA SUMARUBA

La resina contiene triterpenos: alfa y beta Amirin, glutinol-epi-20(29)-ene-3-β-23-diol, lupeol-epi (Peraza at al 1992).

Estructura	Nombre del Triterpeno	F.M	Punto de Ebullición
	Lupeol	$C_{30}H_{50}O$	215° C
	Alfa- Amirin	$C_{30}H_{50}O$	186° C
	Beta -Amirin	$C_{30}H_{50}O$	197° C

1.5 FARMACOLOGIA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA

El extracto de los tallos en etanol al 95 % mostró actividad fungicida frente a *neurospora crassa* (López Abraham, et al 1981); un triterpeno presente en el árbol, ha demostrado alguna actividad antitumoral en carcinosarcoma; el extracto acuoso de las partes aéreas presenta un efecto espasmolítico; el extracto de las partes aéreas en etanol al 95% presentó actividad estimulante del músculo liso (Gupta ed 1995).

Hojas y tallo presentan actividad relajadora de músculos lisos, actividad espasmolítica y vasodilatadora (Gupta ed 1995); la corteza seca tiene actividad mulusquicida, inhibe la germinación de la planta. Los taninos contenidos presentan acción astringente, antídoto y antiséptico, los glucósidos en cantidades mínimas actúan como sedantes y el hierro que contiene sirve para curar anemia⁽¹⁾.

Toxicidad. Se ha reportado actividad citotóxica en frutos secos en concentraciones de 3.75 µg/ml; conteniendo glicósidos cianogénicos que se caracterizan por presentar toxicidad en dosis altas. Al extracto acuoso de hojas y tallos se les realizó pruebas de toxicidad aguda en ratas encontrándose para el mismo una dosis tóxica mínima de 0.5ml /rata, el extracto etanólico de la corteza seca tiene actividad mulusquicida en concentraciones de 50 ppm.

1.6 INFORMACION GENERAL ACERCA DE LA ANEMIA

Una de las aplicaciones más importantes que tiene la planta *Bursera simaruba* en el uso medicinal natural es aumentar el nivel de hierro en la sangre evitando así una de las enfermedades provocadas por la deficiencia de hierro conocida comúnmente como ANEMIA.

Anemia. La anemia (del griego sin sangre) es una enfermedad de la sangre caracterizada por la disminución anormal en el número de glóbulos rojos (eritrocitos o hematíes) o en su contenido de hemoglobina. Los hematíes son los encargados de transportar el oxígeno al resto del organismo, y los pacientes anémicos presentan un cuadro clínico causado por el déficit de oxígeno en los tejidos periféricos. La anemia puede deberse a :

- Defecto en la formación de glóbulos rojos, ocasionados por déficit de nutrientes, hormonas, enfermedades crónicas, genéticas y otras situaciones.
- Excesiva destrucción de glóbulos rojos, debido a determinadas enfermedades hereditarias.
- Sangrado excesivo (traumático) por hemorragia interna.

La anemia presenta los siguientes datos clínicos: Palidez. Cansancio. Fátiga con el ejercicio y detención en su crecimiento.

La anemia más frecuente es la ferropénica, por déficit de hierro, elemento esencial para la fabricación de glóbulos rojos, se produce cuando aumentan las demandas de hierro del organismo para otras funciones, como en la infancia, adolescencia y gestación o cuando existe un déficit de hierro en la ingesta (dietas mal controladas). La anemia ferropénica debe tratarse con suplemento de hierro.(2)

Función del hierro. El hierro se encuentra en todo el ambiente, es un elemento vital en el proceso respiratorio de muchos animales y en pequeñas cantidades es esencial para la nutrición del hombre. Estas y otras funciones son hechas por sustancias químicas que se encuentran en nuestra alimentación llamada “nutrientes”. Los nutrientes son clasificados como esenciales y no esenciales. Los nutrientes no esenciales son biosintetizados en el cuerpo y no son obtenidos necesariamente de las comidas, los nutrientes esenciales sí se pueden obtener de las comidas.

Los minerales y distintas cantidades de elementos metálicos son vitales para el crecimiento saludables de dientes y huesos. Dichos minerales se encuentran en algunos nutrientes tales como nutrientes minerales que son clasificados como elementos mayores y elementos en traza (elementos que se encuentran en mínimas cantidades).

Elementos del bloque d en sistemas biológicos. Juegan un papel importante en los sistemas biológicos. Un adulto saludable, por ejemplo contiene cerca de 4 g de hierro y cerca de 2/3 se encuentra en forma de hemoglobina. Este es el pigmento rojo de la sangre. La hemoglobina es una sustancia encargada de llevar el oxígeno a todo el cuerpo humano, además de regresar a los pulmones el dióxido de carbono que se produce en las células.(Ver Anexo Contenido total de minerales en el cuerpo humano).(2)

Hemoglobina. La hemoglobina es el componente principal del eritrocito, por lo que su determinación es una de las pruebas más frecuentes que se hacen en los laboratorios clínicos. Se ha descubierto que es más útil en términos de diagnósticos y tratamiento de la anemia que la cuenta de eritrocitos, debido a que es el recurso más sencillo disponible para detectar anemias y su gravedad. Se puede usar como índice de la capacidad de la sangre para transportar oxígeno. La hemoglobina es expresada con mayor precisión en gramos por decilitro (ó en gramos por 100ml). La hemoglobina se produce por el eritrocito inmaduro, el cual tiene núcleo. Las células maduras pierden el núcleo y así su capacidad citoplasmática para sintetizar proteínas.

La hemoglobina es una proteína pigmentada de color rojo que se encuentra sólo en los eritrocitos y les da su color característico. El hierro es esencial en la formación de la hemoglobina. La función principal de la hemoglobina es el transporte de oxígeno a las células del cuerpo desde los pulmones.

La molécula de hemoglobina contiene cuatro moléculas Hem, cada una de las cuales puede reaccionar con el oxígeno y fijarse a una molécula de él: el oxígeno se une directamente al hierro (oxihemoglobina). La cantidad de oxígeno que cada molécula de hemoglobina puede transportar está influida por tres factores principales:

1. Presión parcial de oxígeno.
2. pH.
3. Temperatura.

La hemoglobina contiene ciertas proteínas como parte de su estructura, un grupo no protéico llamado grupo prostético. Un ejemplo es la proteína transportadora de oxígeno, la hemoglobina. Cada una de las cuatro cadenas polipeptídicas posee un grupo prostético llamado hemo.

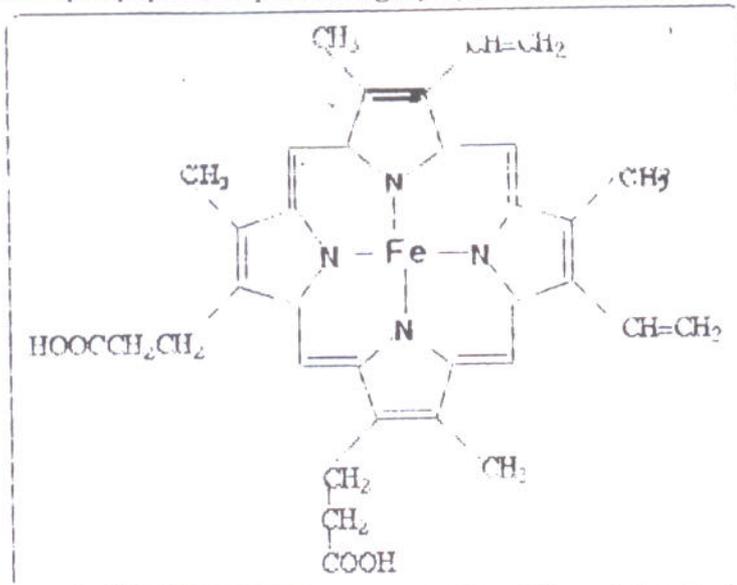
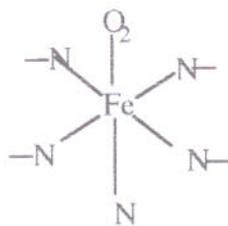


Fig. 1. Estructura del grupo prostético hemo de la hemoglobina.

El hemo tiene una estructura similar a la de la clorofila, ya que ambas moléculas se derivan de una estructura anular heterocíclica, la porfirina. Esas cadenas se agrupan luego de modo que le proporcionen a la hemoglobina una forma esférica aproximada. Por otra parte, cada grupo hemo se aloja en un hueco con los grupos vinílicos hidrófobos de su estructura porfirínica rodeados por las cadenas laterales de aminoácidos igualmente hidrófobos. Los dos grupos propanoato del grupo hemo se localizan cerca de los grupos positivamente cargados de la lisina y la arginina [aminoácidos].

El hierro de los grupos hemo tiene el estado de oxidación +2 (ferroso) y forma un enlace coordinado con un nitrógeno del grupo imidazol de la histidina de la cadena polipeptídica. Esto deja libre una valencia del ión ferroso, que se utiliza para fijar el oxígeno, así como se muestra a continuación.



Una porción de la hemoglobina oxigenada

Imidazol

El hecho de que el ión ferroso del grupo hemo se combine con el oxígeno no tiene nada de particular; muchos compuestos similares también lo hacen. Lo extraordinario de la hemoglobina es que cuando el grupo hemo se combina con el oxígeno del ión ferroso no se oxida con facilidad al estado férrico. Los estudios con compuestos hemo experimentales en el agua demuestran por ejemplo, que éstos sufren rápida oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} . Sin embargo cuando estos mismos compuestos son embebidos en el ambiente hidrófobo de una resina de poliestireno, el hierro se oxigena y desoxigena con facilidad y sin que ocurra un cambio en el estado de oxidación del hierro. En este aspecto es en particular sugerente el hecho de que los estudios por rayos X de la hemoglobina revelen que las cadenas polipeptídicas le dan a cada grupo hemo un ambiente igualmente hidrófobo.⁽¹⁶⁾

1.7 FARMACOS USADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA ANEMIA

ANTIEMICOS: Ácido fólico. Sal ferrosa. Cobalamina o Vitamina B₁₂.

Sal ferrosa + ácido fólico. Complementario.

ACIDO FOLICO ó VITAMINA B₉

Tipo de medicamento: Vitamina necesaria para la formación de glóbulos rojos.

Indicaciones: Para tratar la anemia por falta de ácido fólico provocada por:

Malnutrición grave.

Parasitosis intestinal.

Para prevenir la anemia en mujeres embarazadas y lactantes se da junto con las sales de hierro.

Precaución: No darlo cuando se está tomando antiepilépticos, puede aumentar las crisis.

Presentación: Tabletas de 1mg ó 5mg. Existen también tabletas con dosis más bajas de ácido fólico, a veces mezcladas con dosis de hierro, que sólo sirven para la prevención.

Dosis: Debe ser determinada por el médico. Para la prevención, dosis de 0.1mg a 0.3mg por día, se da junto con sales de hierro.

Duración: Durante todo el embarazo. Según indicaciones del médico en otras condiciones.

SAL DE HIERRO II ó SULFATO FERROSO

Tipo de medicamento: Mineral necesario para la fabricación de globulos rojos.

Indicación: Para tratar anemia por falta de hierro causadas por hemorragias, mala alimentación y paracitosis intestinal. El médico tendrá que determinar primero la causa de la anemia antes de iniciarse el tratamiento. Para prevenir la anemia en mujeres embarazadas (junto al ácido fólico).

Precaución: No dar junto con tetraciclina, el hierro disminuye su absorción. No darlo con antiácidos, ni con leche, impide la absorción de hierro. No usar durante la lactancia y el embarazo.

Presentación: Tabletas de 300mg de sulfato de hierro II contiene de 60 a 70mg de hierro elemental, jarabe de 30ml con 15 mg de hierro elemental por 0.6ml equivale a 25mg/ml, 5mg por 4 gotas.

Dosis: Tratamiento curativo :Adultos 2 a 3 mg/Kg por día, niños 5mg/Kg por día.

Duración: De 3 a 6 meses si es posible.

COBALAMINA ó VITAMINA B₁₂. Es la vitamina usada contra la anemia. Todos los compuestos de vitamina B₁₂ contienen el átomo cobalto en su estado trivalente. Finalmente, existen tres formas activas de la Vitamina B₁₂: Cianocobalamina, Hidroxocobalamina, Nitrocoalamina. La Vitamina B₁₂ es un componente de una coenzima que toma parte en el transporte de los grupos carboxílos dentro de las moléculas. Como tal tiene influencia en la síntesis de ácidos nucleicos, metabolismo de las grasas, conversión de carbohidratos en grasas.

1.9 MÉTODO DE INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA

Existen una gran variedad de sustancias químicas presentes en las plantas o en el reino vegetal, de tal manera que desde la antigüedad las plantas han sido un recurso de alimentación y curación de enfermedades que se encuentran al alcance del ser humano éstas son las llamadas plantas medicinales.

Dedido a la gran importancia de las plantas medicinales en la vida diaria de los seres humanos se han propuestos métodos para poder conocer los principios activos responsables de aliviar dichas enfermedades, éstos deben de ser separados de la plantas que la contienen, determinarle su estructura química, procurar su síntesis y darle a conocer a la humanidad los resultados de los estudios realizados.

Los constituyentes químicos en las plantas pueden ser clasificados:

- Por el origen biosintético.
- Por sus propiedades de solubilidad.
- Por la presencia de ciertos grupos funcionales claves.

Para la detección preliminar de estos constituyentes se han desarrollados métodos basados en la extracción de estos con solventes apropiados y en la aplicación de pruebas de coloración combinado con cromatografía plana.

En términos generales un análisis fitoquímicos debe comprender cuatro etapas bien definidas.

1. Recolección y clasificación botánica de la especie en estudio.
2. Extracción, separación y purificación de constituyentes químicos.
3. Determinación estructural.
4. Ensayos biológicos y farmacológicos.

Los ensayos biológicos y farmacológicos deben de ser realizados a lo largo de todo el análisis fitoquímico.⁽³⁾

1.10 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN

La extracción es una operación que tiene por objeto separar una sustancia del material sólido o líquido que la contiene, con objeto de purificarla mediante el uso de un disolvente inmiscible con el material. La extracción puede ser discontinua (agitar una disolución acuosa con éter etílico en un embudo de separación) o continua (extractor tipo soxhlet). La forma de extracción más frecuente es por maceración .

Maceración. La maceración consiste en la extracción de los principios activos de una plantas o parte de ella a temperatura ambiente, utilizando el agua como disolvente (puede hacerse también con alcohol o aceite). Se trata sencillamente de poner a remojo, lo mejor trituradas que sea posible, las partes de las plantas a utilizar.

La maceración es el método preferible para los siguientes casos:

1. Plantas cuyos principios activos se destruyen con el calor.
2. Plantas muy ricas en taninos.

La maceración tiene la ventaja de extraer la mayor parte de los principios activos, dejando los taninos en la plantas.

Técnicas de Maceración. Para realizar una maceración se procede de la siguiente forma:

1. Colocar las partes a usar, con la proporción de solvente requerido (a la temperatura ambiente), en un recipiente opaco (que no deje pasar la luz).
2. Dejar reposar en un lugar fresco. Remover de vez en cuando.
3. Si la maceración es de partes blandas (hojas, flores, etc.) es suficiente con 12 horas, si se trata de partes duras (raíces, corteza, semillas) hay que esperar 24 horas. Tiempos más largos favorecen la fermentación o el enmohecimiento.

Conservación de los Macerados. Los macerados pueden conservarse durante bastante tiempo (hasta un mes) especialmente cuando el líquido extractivo utilizado como disolvente es el alcohol o el aceite en lugar del agua.

1.11 METABOLITOS PRIMARIOS Y METABOLITOS SECUNDARIOS

Metabolitos Primarios. Son producidos por casi todas las plantas verdes, son esenciales para los caminos biosintéticos los cuales controlan el crecimiento, los trabajos de fotosíntesis, respiración, y otros procesos básicos. Los metabolitos primarios incluyen a los carbohidratos, proteínas, grasas, los cuales son los componentes básicos de la nutrición humana. Los metabolitos primarios presentan estructuras uniformes.

Metabolitos Secundarios. Son los responsables de las características del olor, aroma y propiedades medicinales y venenosas. Presentan estructuras variadas y se distribuyen en el reino vegetal por algunas características modelos como la actividad fisiológica.

1.12 TANINOS

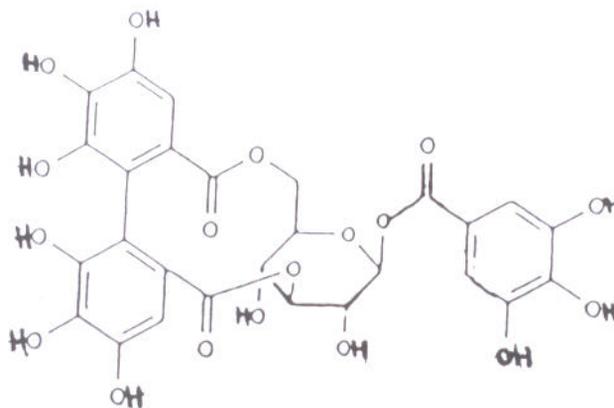
Los taninos son compuestos fenólicos que cuagulan la gelatina y otras proteínas, formando una capa seca y resistente a la putrefacción sobre la piel y mucosas. Poseen propiedades astringentes, hemostática, antisépticas y tonificantes. Secan y curten la piel y las mucosas favoreciendo la resolución de procesos inflamatorios y la cicatrización. Su sabor es muy amargo y áspero, y en algunas plantas puede resultar excesivo o indeseable. Llegan a provocar intolerancia en estómagos delicados ingeridos en dosis elevadas, los taninos pueden impedir la absorción de ciertos minerales como el calcio y el hierro, así como las vitaminas los taninos se encuentran muy repartidos por todo el reino vegetal. Las plantas más ricas en taninos son: culantrillo, madroño, roble, zarza entre otras.

Los taninos están presentes en la corteza y frutos de muchas plantas. Los taninos son considerados productos de excreción de muchas plantas, pero están actualmente involucrados en el mecanismo de defensa contra parásitos y animales de pastoreo. (3)

Corteza y corazón de la madera ricas en estos compuestos irritantes se desarrolla por el ataque de ciertos insectos. Los taninos forman complejos relativamente insolubles con las proteínas de las pieles las cuales les da suavidad y resistencia, por tanto convirtiendo las pieles en cuero. La química de los taninos es muy compleja y no uniforme, los taninos pueden ser derivados en dos grupos:

- Los derivados de los flavonoles, los así llamados taninos condensados.
- Los taninos hidrolizables (el grupo más importante), los cuales son ésteres de un azúcar, usualmente la glucosa, con una o más ácidos trihidroxibenceno- carboxílico (ácido gálico).

A continuación se da, a manera de ejemplo, la estructura del tanino llamado CORILAGINA. (3)



1.13 CROMATOGRAFIA

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La muestra es distribuida entre dos fases una estacionaria y otra móvil, de tal forma que los componentes de la mezcla son dinámicamente y selectivamente distribuidos entre la fase estacionaria y la fase móvil.

Cromatografía Plana. La separación cualitativa se lleva a efecto en tiras de papel o en placas planas que pueden ser de vidrios, metálicas, plásticas, recubierta con una capa de adsorbente (sílica gel) de unos 250 μm de grosor. Las sustancias a separar, disueltas se aplican con una micropipeta a una distancia de aproximadamente 1.5 cm del borde inferior de la placa o papel. Después de la evaporación del disolvente, se colocan las placas o papel en una cámara de separación adecuada, que contiene el eluyente apropiado hasta una altura de 0.5 cm. Antes, se ha procurado que la atmósfera de la cámara este saturada con vapor del eluyente. El eluyente que también se denomina medio de elución, disolvente, mezcla y medio de desarrollo avanza en el caso de la cromatografía monodimensional ascendente, que se emplea la mayor parte de las veces sobrepasando la mancha de origen. Las diferentes sustancias de la solución aplicada son arrastradas con velocidades diferentes formándose zonas de sustancias. Esta separación se puede producir por procesos de adsorción, reparto, intercambio iónico o por una combinación de estas posibilidades.

Después de que el frente del eluyente ha recorrido un trayecto suficiente se saca la placa ó papel de la cámara y se seca. Las sustancias separadas se comprueban entonces en forma adecuada. Sustancias coloreadas se pueden ver inmediatamente, algunas combinaciones fluorescen ó absorben en la luz UV, otras se hacen visible asperjándolas con reactivos de coloración. Como medida de la velocidad de desplazamiento de cualquier combinación en un eluyente determinado sirve para cualquiera de las alternativas de cromatografía plana, el valor R_f (Factor de Retardación).

$$R_f = \frac{\text{Distancia de la sustancia al origen}}{\text{Distancia del frente del eluyente al origen}}$$

Cromatografía Líquida de Columna de Baja Presión (C.L.B.P.)

Este método es utilizado para la extracción, separación y purificación de productos naturales así como purificación de productos sintéticos. El método esta basado en la elución de los componentes utilizando como fase móvil diferentes tipos de solventes o mezclas de solventes, una elución isocrática ocurre cuando la composición de la fase móvil permanece constante y se llama elución por gradiente cuando la composición de la fase móvil varía con el tiempo, durante el proceso cromatográfico.

C.L.B.P. ofrece varias ventajas:

1. Se puede usar desde la escala microanalítica hasta la industrial.
2. Se puede obtener un registro permanente del análisis, es una técnica poco o nada destructiva que puede aplicarse a sustancias lábiles.
3. Evita el calentamiento de la muestra.
4. Constituye una técnica sencilla y rápida que, en muchos casos no requiere aparatos complicados.

El equipo completo está constituido por los siguientes módulos:

1. Depósito y mezclador de la fase móvil.
2. Bombas impulsadoras de líquidos.
3. Columna cromatográfica.
4. Colector de fracciones.
5. Detectores (celdas de flujo).
6. Registrador.

Figura 2 muestra un equipo de C.L.B.P.

Modo Operativo del Equipo C.L.B.P.

Empaque de la Columna Cromatográfica. Se utilizan columnas de vidrios de 15-20 mm de diámetro interno. El empaque de la columna se describe de la siguiente manera:

Se cierra la parte inferior de la columna con una terminal (pistón) que lleva adaptada una manguera delgada de Teflón que conduce la fase móvil de la columna a los tubos colectores de fracciones. Después de terminar de ajustar la terminal se coloca un filtro que podría ser un trozo de algodón, o papel filtro adaptado a la geometría del cilindro.

Con ayuda de un embudo (cuello largo), primero se coloca el adsorbente seco, una cantidad que alcance un rango de altura entre 5 y 10 cm. Segundo, la muestra se coloca mezclando previamente con adsorbente en una relación 1:1 se consolida el material procurando no dejar espacios vacíos, a continuación se coloca un filtro. Se cierra la parte superior de la columna con una terminal que lleva adaptado una manguera delgada de Teflón que va conectada a la bomba impulsadora de líquido. La bomba impulsadora del líquido lleva adaptada una manguera delgada de teflón que va conectada al depósito de la fase móvil.

Eluyente. Para realizar las eluciones se puede utilizar un solo tipo de solvente o también mezclas de solvente (binarias, ternarias, cuaternaria). Con frecuencia se necesita usar mezclas de solventes, se podría mantener constante la composición de la mezcla de solventes (fase móvil) durante el proceso cromatográfico (elución isocrática). Otra alternativa es comenzar la elución con el solvente menos polar, luego se incrementa la composición en la mezcla del solvente más polar (gradiente polar de elución).⁽⁴⁾

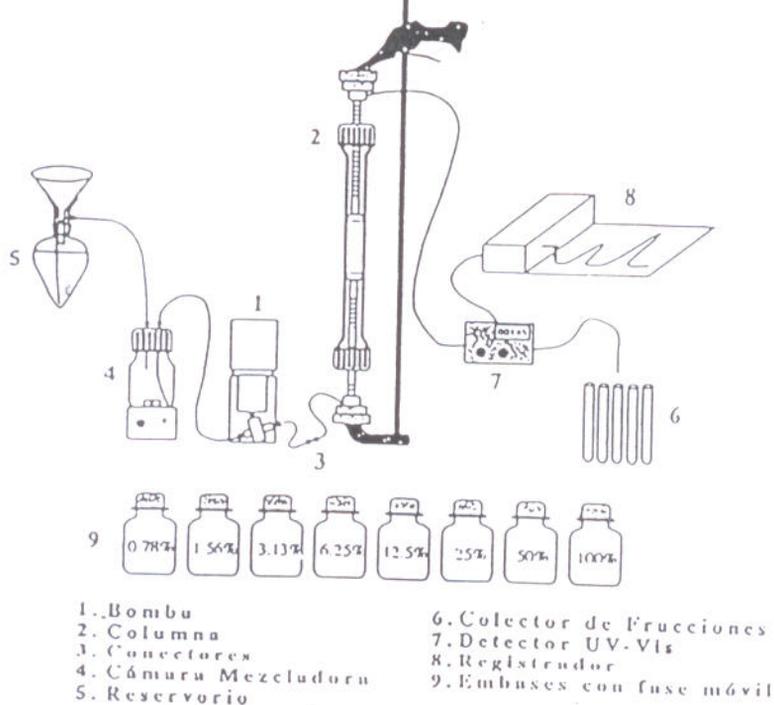


Figura 2. Equipo de Cromatografía Líquida de Presión Media.

1.14 EL COLOR DE LOS REACTIVOS ORGÁNICOS

Una de las causas que más ha contribuido a la extensión y desarrollo de los reactivos orgánicos en análisis inorgánico se debe sin duda a las intensas y brillantes coloraciones que pueden conseguirse con los mismos. Por esta razón es interesante para el químico el conocimiento de las relaciones entre estructuras de un reactivo orgánico y color que puede originar con los iones con los que reacciona, manera de actuar los grupos activos, modificaciones que hay que efectuar en la molécula orgánica para conseguir un reactivo más adecuado.

En general todas las moléculas orgánicas absorben luz en más o menos la misma proporción, pero la mayoría lo hacen en la región ultravioleta del espectro por lo que aparecen incoloras. Pero si una molécula orgánica tiene electrones lábiles o móviles (pi electrones ó electrones unidos por enlaces pi en la hibridación de orbitales Px de los átomos de carbono), bastará la energía proporcionada por las bajas frecuencias del espectro visible para lograr una transición o modificación electrónica en la molécula. De aquí que el color de molécula orgánicas esté asociado, frecuentemente a la existencia de centro de insaturación (dobles enlaces) o la posibilidad de resonancia entre dos o más configuraciones moleculares; es decir, a agrupaciones de labilidad electrónica causada.

Este hecho fué intuido por Witt en 1876, el cual, al revisar los distintos colores conocidos los denominó cromóforos (llevar el color), la denominación ha prosperado y actualmente se considera cromóforo a todo sistema con enlaces multiples.

Las moléculas que poseen dicho grupos cromóforos se llaman cromógenos, o sea, capaces de engendrar color, en general se necesita más de un grupo cromóforo para la aparición de color. A medida que aumenta el número de cromóforos se intensifica el color. El mismo Witt observó que ciertos radicales del tipo salinógenos son capaces de reforzar la acción de un cromóforo, aunque de por sí no puede comunicar color alguno a las moléculas incoloras. A estos radicales los llamó auxócromos (aumentar el color). Se consideran grupos auxócromos positivos (ejemplo: $\ddot{O}H$, NR_2 , NH_2) que son los que producen una exaltación del color en medio ácido y negativo (ejemplo: NO_2 , NO , CO) que son los que ejercen su acción en medio básico. En un anillo bencénico que contenga un cromóforo, la posición del auxócromo en orto y para tiene un efecto mucho más notable que en meta, posición que apenas ejerce influencia cromática. El efecto de los auxócromos se atribuye a un aumento de las posibilidades de resonancia en las moléculas donde se verifica la sustitución.

1.15 PRUEBA DE LA ARTEMIA SALINA

El camarón salino, cuyo nombre científico es *Artemia salina*, es un pequeño crustáceo usado como un bioensayo preliminar y barato, para evaluar la actividad tóxica general no específica de los extractos vegetales en búsqueda de agentes biológicamente activos especialmente anticancerígenos, puesto que se ha demostrado que existe una directa relación con las pruebas anticancerígenas *in vitro*. En este sentido, esta prueba se usa para determinar agentes antitumorales de una gran variedad de especies vegetales, obteniéndose los niveles de actividad citostática y citotóxica de las mismas, siendo el parámetro de referencia los valores de la dosis letal media (DL_{50}), obtenidos durante la prueba utilizando *Artemia salina*.

El camarón salino pertenece al orden ANOSTRACA de la clase BRANQUIOPODA y representa la más primitiva forma del crustáceo. Entre sus características principales, está su sistema nervioso en forma de escalera con ganglios dispuesto de manera segmentada, el corazón es largo tubular, con huesos pares en cada segmento. El desarrollo del nauplio (larva) es gradual, sin ninguna metamorfosis compleja; a esta edad desarrolla antenas y mandíbulas, las que mueve con sus tres pares de apéndices y persiste un color rojo debido a la presencia de la yema. Las larvas pueden ser alimentadas (con células de levaduras o algas unicelulares).

La facilidad de incubar los huevos, la disponibilidad de los mismos, el rápido crecimiento del nauplio y la relativa facilidad del mantenimiento de estos bajo las condiciones de laboratorio han hecho del camarón salino un bioensayo simple, rápido, efectivo y de mayor importancia, reproductivo y barato.

Durante la incubación de los nauplios se desarrollan tres etapas las que influyen en la reproducibilidad de los resultados, existiendo una diferencia significativa de sensibilidad entre la primera y segunda etapa de la larva que ha sido demostrado usando la toxicidad del ácido crómico.(patrón de referencia).

El nauplio de la primera etapa es significativamente más resistente que el nauplio de la segunda y tercera etapa, esta diferencia puede ser explicada debido a que los nauplios de la primera etapa se alimentan de vitelium embrionario, mientras que las larvas en la segunda y tercera etapa ingieren partículas del material que expone el epitelio de su tracto digestivo al medio externo. La sensibilidad del camarón salino también puede variar considerablemente de una clase a otra esto es dependiendo de su origen. A las 24 horas los nauplios son considerados de la primera etapa, a las 48 horas y 72 horas ó mas son considerados de la segunda y tercera etapa respectivamente.

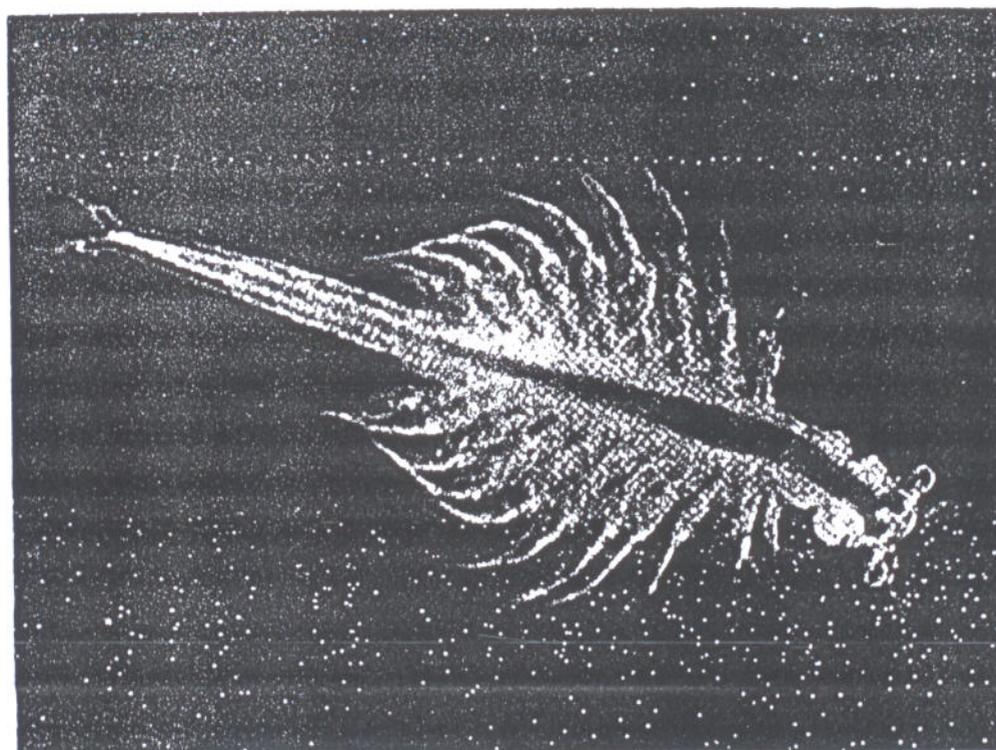
En 1956, Michael y colaboradores publicaron el primer artículo sobre el uso de *Artemia salina* como organismo de bioensayo en el cual los autores describen la evaluación de la toxicidad de insecticidas contra el camarón salino de todo grupo de edades, variando desde nauplios de 24 horas de edad hasta larvas adultas, posteriormente a esta investigación se publicaron nuevos artículos por otros autores los que desarrollaron sus propios métodos tales como de W.Tarpley (1958), Brown et al (1968), Benesch (1969), Finney(1971), Ashton et al (1972), Persoon y Sarselooy (1980), Vanhaecke et al (1981), Meyer et al (1982) y Mc loughlin et al (1982).(5)

El 95% del intervalo de confianza de la dosis letal (DL_{50}) se determina utilizando el conteo de análisis indagado a las 24 horas de exposición de *artemia salina* con la muestra de interés. También existen otras vías para tratar la información cuantitativa derivada de una serie de pruebas biológicas, tales como el método logarítmico de Probit, Miller, Tainer, el procedimiento de D-Beer y el método de Reed-Muench que es el más conveniente. Este procedimiento asume que un animal que sobrevive a una dosis alta podría también sobrevivir a una dosis más baja y viceversa, que un animal que muere a una cierta dosis baja podría también morir a cualquier dosis alta, de este modo la información de cualquier grupo puede ser adicionado a otro grupo dentro del rango de las dosis ensayadas.

Fig. 3 Artemia salina en su primera etapa

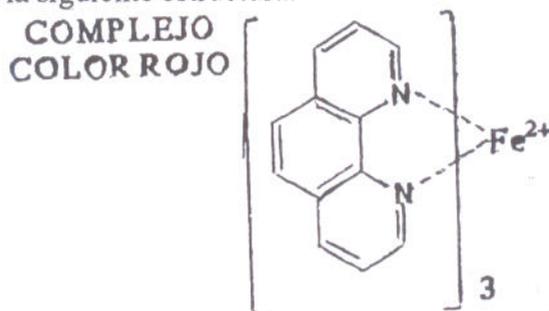


Fig. 4 Artemia salina en su etapa adulta



1.16 DETERMINACIÓN DE HIERRO A TRAVÉS DEL MÉTODO ESPECTROFOTO-COLORIMETRICO O-FENANTROLINA EN LA CORTEZA BURSERIA SIMARUBA

Principio del Método. El hierro reducido a estado ferroso, por ebullición con ácido e hidroxilamina se determina espectrocolorimétricamente utilizando la coloración roja dada por las sales ferrosas con la ortofenantrolina. Un tipo de compuestos orgánicos conocido como 1,10-fenantrolina (u ortofenantrolina) forma complejos estables con el hierro (II) y otros iones. El compuesto original tiene un par de átomos de nitrógenos localizados en posición tal que cada uno forma un enlace covalente con el hierro (II). Tres moléculas de 1,10-fenantrolina se combinan con el ión de hierro para formar un complejo que tiene la siguiente estructura.



Este complejo llamado a veces "ferroina", por conveniencia se expresa como $(Fen)_3Fe^{2+}$.

La formación del complejo se describe mejor por la reacción.



El reactivo es una base débil que reacciona para formar el ión 1,10-fenantrolinio, $FenH^+$, en medio ácido. La constante de formación para el equilibrio entre $FenH^+$ y Fe^{2+} es 2.5×10^6 a $25^\circ C$. El hierro (II) es complejado cuantitativamente en el intervalo de pH entre 3 y 9. Usualmente se recomienda un pH alrededor de 3.5 para evitar la precipitación de sales de hierro, por ejemplo, fosfatos. Se necesita un exceso de agente reductor por ejemplo hidroxilamina o hidroquinona para mantener el hierro en el estado +2. Una vez formado el complejo es muy estable. Esta determinación se puede llevar a cabo con un espectrofotómetro ajustado a 508 nm ó en un fotómetro que esté equipado con un filtro verde.

El complejo rojo-naranja que se forma es un quelato de tres moléculas de fenantrolina por cada átomo de hierro ferroso. Generalmente, los ligandos polidentados forman complejos metálicos más estables que los formados por ligandos monodentados similares, el incremento en la estabilidad de los complejos con ligandos polidentados provienen de un efecto entrópico.

Interferencias. Entre las sustancias que interfieren están los oxidantes fuertes, cianuro, nitritos, fosfatos (más los polifosfatos que el orto fosfato), cinc en concentraciones 10 veces superior a la del hierro, cobalto, cobre por encima de 5 mg/L y níquel por encima de 2 mg/L. El bismuto, el cadmio y el mercurio precipitan la fenantrolina. La ebullición inicial con ácido convierte los polifosfatos en ortofosfatos y elimina el cianuro y el nitrilo, que por otra parte, podrían interferir.

Concentración mínima detectable. El límite de detección es de 0.1mg/L. (8).

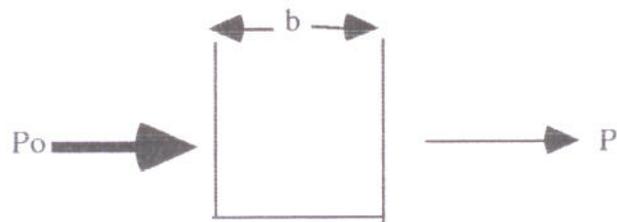
ESPECTROFOMETRIA

Espectrofotómetro. Hoy en día existen numerosos espectrofotómetros comerciales. Algunos se han diseñado sólo para la región visible; otros se aplican en las regiones ultravioleta y visible. Unos pocos pueden realizar medidas desde el ultravioleta hasta el infrarrojo cercano (185 a 3000 nm).

Instrumentos de doble haz. Los espectrofotómetros basados en diseños de doble haz tiene un intervalo de longitudes de onda de 195 a 850 nm, una anchura de banda de 4 nm, una exactitud fotométrica del 0.5 % de transmitancia (T), y reproducibilidad del 0.2% de absorbancia(A). En los espectrofotómetros de doble haz se forman dos haces en el espacio por un espejo en forma de V, llamado divisor de haz. Un haz pasa a través de la solución de referencia a un fotodetector, y el segundo atraviesa simultáneamente la muestra a un segundo fotodetector acoplado. Los dos haces producidos son amplificados y su proporción (o el logaritmo de su proporción) se determinan electrónicamente y se exhibe en el dispositivo de lectura o en la grafica del registrador. Las aplicaciones cualitativas de espectrofotometría Ultravioleta / Violeta son limitadas porque el espectro de la mayoría de los compuestos en solución consisten de uno o, cuando mucho, unos pocos picos amplios sin estructuras fina que podrían ser requeridos para su identificación precisa.

En contraste, el método es uno de los más poderosos y más utilizados para el análisis cuantitativo. Entre las características importantes de espectrometría cuantitativa Ultravioleta/Visible están la amplia aplicabilidad en sistemas orgánicos, inorgánicos y bioquímicos, buena sensibilidad, límites de detección de 10^4 a 10^7 M, selectividad de moderada a elevada, exactitud y precisión razonables.

La trasmitancia de una solución se define como la fracción de radiación incidente transmitida por la solución: $T = P/P_0$



Solución absorbente de concentración C .

La absorbancia de una solución se define como: $A = -\log_{10} T = \log P_0/P$.

De acuerdo con la ley de Beer, la absorbancia está relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente (c) y con la longitud de la trayectoria (b) de la radiación en el medio absorbente. Ecuación de la ley de Beer se describe como:

$A = \log(P_0/P) = abc$ (a es una constante de proporcionalidad denominada absorptividad).

Variables que influyen en la absorbancia. Las variables comunes que influyen en el espectro de absorción de una sustancia incluyen el tipo de disolvente, pH de la solución, la temperatura, concentración elevada de electrolitos y la presencia de sustancias que interfieren. Se deben conocer los efectos de estas variables así como las condiciones que se han seleccionado para el análisis, de modo que la absorbancia del analito no sea afectada materialmente por variaciones incontroladas, de pequeña magnitud.

Selección de la longitud de onda. Una primera etapa en cualquier método fotométrico o espectrofotométrico es el desarrollo de condiciones que permitan una reacción reproducible entre absorbancia y concentración del analito. Para obtener una sensibilidad máxima, las mediciones de absorbancia espectrofotométrica por lo general se hacen a una longitud de onda correspondiente a un pico de absorción, porque la sensibilidad (cambio en la absorbancia por unidad de concentración) es la mayor en este punto. Además, la curva de absorción con frecuencia es plana en un máximo, lo cual lleva a una buena adhesión a la ley de Beer y menos incertidumbre de falla para producir precisamente el ajuste de la longitud del instrumento.

Limpieza y manejo de las celdas. Para un análisis espectrofotométrico exacto se necesitan celdas de alta calidad, deben estar calibrada una contra la otra para detectar posibles diferencias que pueden provenir de rayaduras, marcas y desgaste. También es importante emplear técnicas apropiadas para la limpieza de las celdas.

Barrido Espectral. Después de determinar la longitud de onda a la cual deben realizarse las medidas, se calibra el método (lo que incluye el instrumento utilizado) midiendo una serie de patrones del constituyente estudiado. Las medidas de absorbancia (o transmitancia) se realizó ajustando la escala de medida del instrumento a una absorbancia cero (100% de transmitancia) cuando el rayo luminoso pasa a través de un blanco, que debe ser idéntico a la muestra en todo, excepto en que no debe contener el constituyente que se ha de determinar. De esta manera, las lecturas de la muestran están corregidas automáticamente para cualquier absorbancia pequeña por acción de los reactivos y del disolvente.

Con los datos de transmitancia o absorbancia para las diferentes concentraciones de la serie patrón se construye una curva de calibrado, en la cual se determinan las concentraciones de la muestra desconocidas. El cambio de pendiente de la curva a concentraciones bajas debe tomarse como indicio de una exactitud alta, ya que pequeñas diferencias de concentraciones dan lugar a grandes diferencias en la radiación transmitidas. Las concentraciones elevadas son poco aptas para este método debido al aplanamiento de la curva que da lugar a errores muy grandes en la determinación. Debe recordarse, sin embargo, que el error relativo solamente tiene significado real al evaluar la veracidad de una determinación.

Errores en los Análisis Espectrofotométricos. Los errores instrumentales se suelen detectar y corregir mediante una calibración con materiales estándares adecuados. Siempre debe hacerse una calibración periódica de los instrumentos ya que la respuesta de la mayoría de los instrumentos varía con el tiempo a consecuencia del desgaste, la corrosión o de un trato inadecuado. En la mayoría de los métodos analíticos se ha considerado que el error relativo sobre el resultado se puede relacionar directamente con el error relativo al instrumental asociado con la medición. El error relativo es diferente a distintos niveles de concentración y transmitancia. Para obtener una exactitud máxima o un error relativo mínimo, debe tomarse las medidas sobre una muestra de concentración tal, que la transmitancia quede comprendida en el intervalo de 20% a 60%.

El error relativo lo podemos calcular mediante la ecuación : $\frac{\Delta C/C}{\Delta T} = 0.434 / T \log T$

$\Delta C/C$ es el error relativo en la concentración que corresponde a ΔT , que es un intervalo determinado de transmitancia. Puede calcularse fácilmente el error relativo del análisis $\Delta C/C$ para cualquier valor de T.

II. PARTES EXPERIMENTALES Y RESULTADOS

2.1 MATERIAL VEGETAL ESTUDIADO

La planta en estudio, de donde se obtuvo el material vegetal, para esta investigación, fue la corteza de la planta, *Bursera simaruba* (L) Sargent conocida comúnmente en Nicaragua como Jiñocuabo. La clasificación e identificación de este material, estuvo a cargo del Dr. Ricardo Rueda responsable del Herbario Miguel Ramírez Gollena de la UNAN-LEON, el material vegetal fue colectado en la última semana del mes de febrero de 1997, en las localidades de la Reserva Indio - Maíz, municipio de el Castillo, a 3 Km al norte de la desembocadura del caño Chontaleño en el departamento de Rio San Juan. Código número: 08759.

2.2 EQUIPO UTILIZADO

- Molino eléctrico modelo # 3 Wiley Mill hecho en USA.
- Sistema de extracción Soxhlet.
- Cocina Buchi 461 Water Bath, made in Switzerland.
- Lámpara de luz ultravioleta (UV) 254 nm ultra -violeta productos INC. San Gabrie, California, USA.
- Balanza Analítica Sartorius 6 MH, botigen. Type AC 2LSD.
- Cocina Fisher Scientific model No 11 - 500 - 12 - SH.
- Refrigerador White - Westing - House.
- Trampa refrigeradora Savan model Rt - 100.
- Bomba de vacío Edwards mode E 2M5 hecho en Inglaterra.
- Campana extractora de gases Labconco corporation Kansa City Missouri 64132.
- Bomba aereadora Elite 799 hecho en Malasia.
- Platos de 96 micropozos de 300 μ l Costar.
- Atomizador marca Merck, made in Germany tipo:GW.
- Placas cromatográfica de sílica gel 60 F254, con soporte de aluminio, Merck.
- Espectrofotómetro UV/Vis .Perkin -Elmer. Lambda Computer.

EQUIPO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE COLUMNA DE BAJA PRESION (C.L.B.P.)

- Columna de vidrio Pyrex de 2.5 cm de diámetro interno y 30 cm de largo, (2 pistones de acero inoxidable).
- Colector de fracciones modelo Gibson 201 con pizarra programadora.
- Bomba modelo QA 1800 .
- Depósito de eluyente.

2.3 CRISTALERIA

- Tubos de ensayos de vidrio Pyrex grandes y pequeños .
- Viales 20 ml .
- Balones de 25, 50, 100 ml
- Embudo separador de 100 ml
- Erlenmeyer 125 ml
- Beaker 100, 500, 1000 ml.
- Probeta 10 y 100 ml.
- Micropipetas de 100 y 200 μ l .
- Fuente de luz de 25 watts marca Phillips.
- Espátula .
- Vidrio reloj pequeño .

2.4 REVELADORES

- Lámpara UV / 234nm (Mineral light).
- Vainillina - ácido sulfúrico.
- Liebermann - Buchard.
- Reactivo de Mayer.
- Reactivo de Wagner.

2.5 REACTIVOS Y SOLVENTES UTILIZADOS

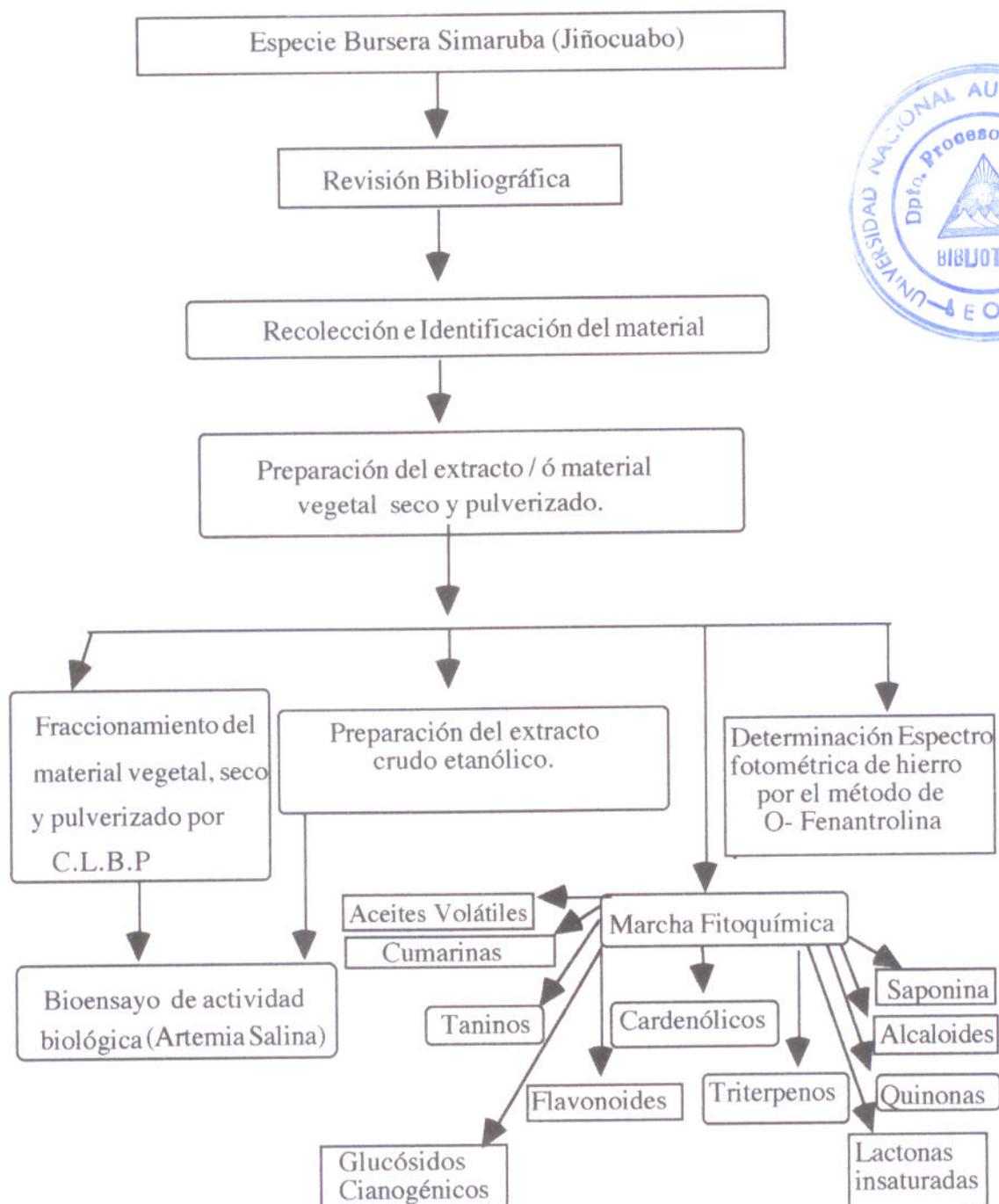
REACTIVOS					
Nombre	Fórmula	Peso Molecular	Densidad	% Pureza	Marca
Ácido acético	CH ₃ CO ₂ H	60.050	1.049	99.4	MERCK
Ácido clorhídrico	HCl	36.460	1.187	38.0	MERCK
Ácido nítrico	HNO ₃	63.010	1.397	80.0	MERCK
Ácido pícrico	C ₆ H ₃ N ₃ O ₇	229.11	-	99.0	MERCK
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	98.080	1.841	98.0	MERCK
Ácido Fluorhídrico	HF	20.00	-	99.9	MERCK
Anhidrido acético	(CH ₃ CO ₂) ₂	102.09	1.080	98.0	MERCK
Amoniaco	NH ₃	17.030	-	25.0	MERCK
Cloruro ferrico	FeCl ₃	162.21	2.898	98.0	MERCK
Cloruro de sodio	NaCl	58.440	2.165	99.0	MERCK
Hidróxido de potasio	KOH	56.120	2.044	92.0	MERCK
Hidróxido de sodio	NaOH	40.000	2.130	97.8	MERCK
Sulfato de cobre II pentahidratado	Cu ₂ SO ₄ ·5H ₂ O	223.14	3.605	99.0	MERCK
Vainillina	C ₈ H ₈ O ₃	152.15	1.056	99.0	MERCK
Yoduro de potasio	KI	166.01	3.130	99.0	MERCK
Nitrato de bismuto	BI(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O	485.07	2.830	98.5	MERCK
Cloruro de mercurioII	HgCl ₂	472.07	5.440	99.5	MERCK
Cloruro de tionilo	Cl ₂ SO	118.97	1.635	99.0	MERCK
Timol	C ₁₀ H ₁₄ O	150.22	-	99.0	MERCK
Piridina	C ₅ H ₅ N	79.100	0.982	99.0	MERCK
Fosfato dihidrogenado de potasio	KH ₂ PO ₄	136.09	2.338	99.5	MERCK
Cromato de potasio	K ₂ CrO ₄	194.20	-	99.5	MERCK
1-10 Fenantrolina	C ₁₂ H ₉ ClN ₂ ·H ₂ O	234.69	-	99.0	MERCK
Hidrocioruro de hidroxilamina	HONH ₂ Cl	69.49	-	99.0	MERCK
Picrato de sodio	C ₆ H ₇ (NO ₂)ONa·H ₂ O				MERCK

SOLVENTES					
Nombre	Fórmula	Peso Molecular	Densidad	% Pureza	Marca
Acetato de etilo	CH ₃ CO ₂ C ₂ H ₅	88.11	0.901	98.0	MERCK
Benceno	C ₆ H ₆	78.11	1.501	99.0	MERCK
Cloroformo	CHCl ₃	32.04	0.791	99.4	MERCK
Dicloro metano	CH ₂ Cl ₂	84.93	1.335	99.5	MERCK
Dimetil sulfóxido	(CH ₃) ₂ SO	78.30	1.101	99.9	MERCK
Etanol	C ₂ H ₅ OH	46.07	1.361	98.0	MERCK
Hexano	C ₆ H ₁₄	86.18	0.659	95.0	MERCK
Metanol	CH ₃ OH	32.04	0.791	99.8	MERCK
Tolueno	CH ₃ C ₆ H ₅	92.13	0.867	99.5	MERCK

2.6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL (DIAGRAMA DE FLUJO)

Se siguió para el procedimiento experimental las etapas descritas, a manera de diagrama de flujo, propuesto por la Figura 5, donde se describe una metodología de trabajo para llevar a cabo un estudio fitoquímico, en concordancia con los recursos disponibles en el laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química (UNAN-León).

Figura 5. Procedimiento Experimental.



2.7 MARCHA FITOQUIMICA

La maceración del material vegetal a temperatura ambiente se realiza para asegurar la esterilidad del fitoconstituyente. El extracto etanólico obtenido por maceración se concentró en un rota vapor a presión reducida. El uso del alcohol etílico al 95% como disolvente en la maceración garantiza la extracción de la mayoría de los constituyentes fitoquímicos de interés. Esta metodología satisface a los investigadores de plantas medicinales, pues se practican el análisis de modo que responda al uso etnomédico reportado. Para tener elementos que orientaran al análisis de los resultados, se realizó la llamada marcha fitoquímica. Las técnicas empleadas fueron ante todo las que aparecen en la obra de la Dra. Olga Lock y el Tamizaje Fitoquímico de Ingeborg Berger.

A continuación se presentan los procedimientos y resultados de la marcha fitoquímica llevado a cabo en la corteza de la planta *Bursera simaruba* describiendo, para cada grupo de compuestos ensayados, el método empleado para su detección .

ALCALOIDES. Extraer 0.5g del material seco y molido con 10 ml de HCl 0.2 N en baño maría (60°) durante 2 minutos, enfriar, filtrar y dividir en cuatro tubos de ensayo.

Tubo 1: 5 gotas de reactivo de Mayer.

El reactivo de Mayer se prepara de la siguiente manera.

Solución a: 1.36 gramos de cloruro de mercurio(HgCl_2) / 60 ml de H_2O .

Solución b: 5 gramos de KI / 10 ml de H_2O .

Mezclar a y b, y diluir a 100 ml con agua.

Resultado esperado : Precipitado blanco a crema.

Resultado:No hubo formación de precipitado de color blanco-crema.

Tubo 2: 5 gotas de reactivo de Dragendorff.

El reactivo de Dragendorff se prepara de la siguiente manera.

Solución a : 8 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ / 20 ml de HNO_3

Solución b: 27.2 g de KI en 50 ml de agua.

Mezclar a y b, reposar, decantar el super nadante y diluir a 100 ml con agua.

Resultado esperado: Precipitado rojo a naranja

Resultado: No hubo formación de precipitado color naranja.

Tubo 3: Agregar 5 gotas de Reactivo de Wagner.

El reactivo de Wagner se prepara de la siguiente manera: 1.27 g de I_2 + 2g de KI en 5 ml de agua y diluir a 100ml.

Resultado esperado: Precipitado marrón.

Resultado: No hubo formación de precipitado color marrón.

Tubo 4: Sin tratamiento (Blanco).

SAPONINAS. Prueba de la espuma. Se prepararon tres tubos de ensayo.

Tubo 1: 0.1g del material vegetal seco y pulverizado.

Con el material vegetal se preparó el extracto acuoso, se filtró y se agitó vigorosamente de 30-40 seg.

Resultado esperado: Capa de espuma persistente de 3 a 5 cm por más de 30 seg.

Resultado: No hay formación de capa de espuma.

ACEITES VOLATILES. Extraer 1g del material vegetal pulverizado con 10ml de dicloro metano agitando por 15 minutos, filtrar y evaporar en baño maría (60°C) a sequedad, pero luego se disuelve en Tolueno.

Resultado esperado: Zonas violetas en UV-365nm. Para el estándar esta prueba resulta positiva.

Resultado: No se observó zonas violetas.

LACTONAS INSATURADAS (PRINCIPIOS AMARGOS). Extraer 1g del material vegetal pulverizado con 10ml de metanol. Cromatografía de capa delgada: Vainillina- ácido sulfúrico.

Resultado esperado: Zonas fluorescentes en UV-365nm.

Resultado: No se observó para el caso de la muestra fluorescencia.

CARDENOLICOS Y BUFADIENOLICO. Extraer 1g del material vegetal pulverizado con 5ml de etanol. Cromatografía de capa delgada: Reactivo de Kedde

Resultado esperado: Presencia de Lactonas Insaturadas

Resultado: Negativo.

FLAVONOIDES. Extraer 1g del material vegetal pulverizado con 10ml de etanol.

Reactivo de Shinoda: Muestra + limaduras de Mg +HCl concentrado.

Resultado esperado: Coloración roja intensa, amarilla, azul.

Resultado: No hay formación de precipitados ni cambios de coloración. .

QUINONAS. Extraer 1g del material vegetal pulverizado con 10ml de etanol.

Reactivo de Bornträger modificado.

Resultado esperado: Precipitación y cambios de coloración en la fase alcalina.

Resultado: No se observó precipitación, ni cambios de coloración en la fase alcalina.

CUMARINAS. Extrer 1g del material vegetal pulverizado con 10ml de etanol.

Cromatografía de capa delgada: KOH etanólico al 5%.

Resultado esperado: Fluorescencia azul en UV-365 nm.

Resultado: Negativo.

TANINOS. Extraer 10g del material vegetal pulverizado con 30ml de etanol 95%, filtrar y evaporar a sequedad. Añadir 25ml de agua caliente al residuo, agitar y filtrar. Agregar 1ml de solución de NaCl 10 %, filtrar y dividir en 4 tubos de ensayo (incluyendo el blanco).

Tubo 1: Reactivo de Gelatina al 1%. Se le agregó de 4 a 5 gotas del reactivo.

Resultado esperado: Formación de precipitado rojo.

Resultado: Se observó la formación del precipitado rojo.

Tubo 2: Gelatina - Sal. Se le agregaron 4 a 5 gotas del reactivo.

Resultado esperado: Formación de precipitado de rojo.

Resultado: Se observó la formación del precipitado rojo.

Tubo 3: Reactivo de cloruro férrico 10%. Se le agregaron 3 a 4 gotas del reactivo.

Resultado esperado: Formación de precipitado o cambio de coloración.

Resultado: Se observó un cambio de coloración de rojo a grisáceo - negro con formación de precipitado.

GLUCOSIDOS CIANOGENICOS. Prueba de Guinard: Picrato de Sodio. Se prepara de la siguiente manera: Disolver 5g de carbonato de sodio y 0.5g de ácido pícrico en agua destilada y diluir a 100ml.

Resultado esperado: Cambio de coloración del papel filtro.

Resultado: No hubo cambio de coloración

TRITERPENOS. Prueba del Anhidrido-Acido sulfúrico-Cloroformo (10:1:25).

Resultado esperado: Aparición de colores rojos, rosas, púrpura, o azul.

Resultado: Negativo.

2.8 ESTRUCTURAS QUIMICAS DE LOS ESTANDARES USADOS EN LA MARCHA FITOQUIMICA

La siguiente Tabla 1 muestra los nombres y en algunos casos estructuras químicas de los estándares utilizados en la marcha fitoquímica preliminar.

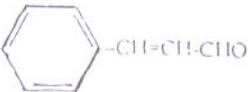
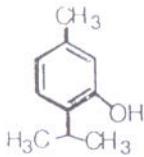
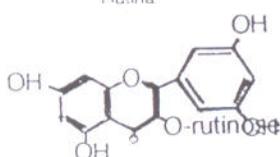
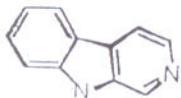
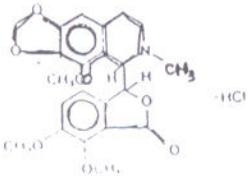
Nombre	Nombre Científico	Método	Estructura (Ejemplo)
Canela	Cinnamomum Zeylanicum	Cumarinas	
Timol		Aceites Volátiles	<p style="text-align: center;">Timol</p> 
Salvia	Pluchea Carolinensis	Flavonoides	<p style="text-align: center;">Rutina</p> 
Hombre Grande	Quassia Amara	Principios Amargos	<p style="text-align: center;">Beta-Carbolina.</p> 
Cloruro de Noscapinium		Alcaloides	<p style="text-align: center;">Cloruro de Noscapina</p> 

TABLA I. RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA LLEVADA A CABO EN LA CORTEZA DEL ARBOL BURSERIA SIMARUBA.

ALCALOIDES

REACCIONES DE PRECIPITACIÓN

MÉTODO	PROCEDIMIENTO	CAMBIO ESPERADO	RESULTADO	
			M	EST.
Mayer	A: 1.30 g HgCl ₂ / 60 ml H ₂ O. B: 5 g KI / 10 ml H ₂ O Mezclar A y B. Diluir a 100 ml	Blanco a Crema	---	+++
Dragendorff	A: 0.85 g Bi(NO ₃) ₃ · 5 H ₂ O / 40 ml H ₂ O B: 10 ml CH ₃ COOH / 8 g KI / 20 ml H ₂ O. Mezclar A y B.	Naranja	---	+++
Wagner	1.27 g I ₂ + 2g KI / 5 ml H ₂ O. Diluir a 100 ml.	Marrón	---	+++

Muestra: 1 g de material vegetal extraído con NH₄OH 10% y luego con HCl 2 N.

SAPONINA

REACCIONES DE COLORACIÓN

MÉTODO	PROCEDIMIENTO	CAMBIO ESPERADO	RESULTADO	
			M	EST.
Prueba de Espuma	Tubo 1. 100 mg de muestra. Tubo 2. 2 ml estandar (saponina). Tubo 3. 2 ml de Agua 10 ml de agua por cada tubo/ 60 °C en baño María por 1/2 hora.	Espuma de 3 cm de longitud durante 30 minutos.	---	+++
Liebermann- Burchard	1 Mg. de muestra / gotas de HOAc + 3 ml de Ac ₂ O/ H ₂ SO ₄ (50:1).	Color verde, azul verdoso (via rojo o azul).	---	+++

CÁRDENOLICOS Y BUFADIENÓLICOS

MÉTODO	PROCEDIMIENTO	CAMBIO ESPERADO	RESULTADO	
			M	EST.
Legal	2 Mg. de muestra/ 3 gotas piridina + 1 gota de Nitroprusitato de Sodio 0.5% + 4 gotas KOH 2 N	Rojo oscuro	---	Sin est
Kedde	A: 3.5- dinitrobenzoico 2% en metanol B: KOH 5 % en H ₂ O R: Mezclar A + B volúmenes iguales 1 Mg. de muestra + gotas de R	Purpura o Violetas	---	+++

FLAVONOIDES

MÉTODO	PROCEDIMIENTO	CAMBIO ESPERADO	RESULTADO
Shinoda	Muestra + limaduras de Mg. + HCl conc.	Presencia de tonos rojos	---

QUINONAS

METODO	PROCEDIMIENTO	CAMBIO ESPERADO	RESULTADO
Borntrager	3 g de muestra + 10 ml de EtOH filtra/ baño maria 60°C. Disolver el residuo en 30 ml H ₂ O/ filtrar y extraer 10 ml de benceno. A la fase bencénica añadir 5 ml de solución test de amonio, agitar.	Color en la fase alcalina (Rojo-Rosado)	---

CUMARINAS

METODO	PROCEDIMIENTO	CAMBIO ESPERADO	RESULTADO
KOH/ Etanol 5%	5 ml extracto metanólico + 1 ml H ₂ O en ebullición. Mancha en papel filtro. Mancha muestra/ KOH 0.5 N.	Fluorescencia azul o verde	---

ACEITES VOLÁTILES

MÉTODO	PROCEDIMIENTO	CAMBIO ESPERADO	RESULTADO	
			M	Est.
Vainillina-H ₂ SO ₄ en cromatografía de capa delgada.	-5 µl del extracto en tolueno en cromato placa. -5 µl estándar solución de mentol o timol en tolueno (1:30). Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo(93:7) Detección: Vainillina-H ₂ SO ₄	Zonas azules-verdes, rojas y café	---	+++

LACTONAS INSATURADAS (PRINCIPIOS AMARGOS)

MÉTODO	PROCEDIMIENTO	CAMBIO ESPERADO	RESULTADO	
			M	Est.
Baljet	a) 1 g de Pterico/ EtOH 9%. b) 10 g NaOH/ 100 ml H ₂ O. R: a + b Muestras + gotas de R Estándar: Extracto metanólico de hombre grande.	Rojo claro a oscuro.	---	+++
Legal	2 mg de muestra / 3 gotas piridina + 1 gota de nitroprusiato de sodio 0.5 % + 4 gotas KOH 2N. Estándar: Extracto metanólico de hombre grande.	Rojo oscuro	---	+++
Kedde	a) ác. 3,5 -dinitrobenzoico % en MeOH. b) KOH 5% en H ₂ O. R: Mezclar a + b Volúmenes iguales. 1 mg de muestra + gotas de R. Estándar: Extracto metanólico de hombre grande.	Púrpura o violáceo	---	+++

TANINOS

REACCIONES DE PRECIPITACIÓN

METODO	PROCEDIMIENTO	CAMBIO ESPERADO	RESULTADO
Gelatina 1%	Solución de prueba +5 gotas gelatina 1%.	Formación de precipitado o cambio de color.	+++
Gelatina -Sal.	Solución de prueba +5 gotas gelatina - sal.	Formación de precipitado o cambio de color.	+++
Cloruro férrico 10%	Solución de prueba +4 gotas de cloruro férrico 10%	Precipitado café - negrozco	+++

GLUCÓSIDOS CIANOGENICOS

METODO	PROCEDIMIENTO	CAMBIO ESPERADO	RESULTADO
Gumard	5 g muestra , humedecerlo con agua +1 ml de cloroformo, introducir tira de papel filtro en picrato de sodio y secar, insertar la tira en el erlenmeyer conteniendo el material vegetal evitando que toque las paredes a una distancia de 1 cm de la muestra , doblar el papel y tapar el recipiente con corcho. Calentar en baño maria 37 °C por 3 horas o más .	Color amarillo -rojo o rojo -café.	---

TRITERPENOS

METODO	PROCEDIMIENTO	CAMBIO ESPERADO	RESULTADO
Anhídrido- Ác.Sulfúrico- Cloroforme	Se disolvió una porción del residuo con un reactivo preparado con Anhídrido Acético - Ácido Sulfúrico - Cloroforme (10:1:25) v/v durante 1-2 minutos.	Aparición de colores rojos, rosa, púrpura, o azul.	---

2.9 FRACCIONAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL POR C.L.B.P.

En una columna de vidrio Pyrex de 2.5 cm de diámetro interno, del equipo de cromatografía líquida a baja presión, empacada en sílica gel 60, tamaño de partícula 0.040 -0.063 mm, hasta una altura de 8 cm, se cargaron 30g de material vegetal seco y molido homogéneamente mezclado con porciones del mismo adsorbente en una relación (1:1). Los solventes utilizados fueron : Hexano, Acetato de etilo, Etanol y Agua, eluidos en orden creciente de polaridad con una velocidad de flujo 48 ml / minuto.

La columna fue primero eluida con hexano con un volumen de 150 ml, recolectándose el eluato en un beaker. Se continuó con Acetato de Etilo con un volumen de 175 ml recolectándose el eluato en un beaker. Se continuó con 400 ml de etanol 95% recolectandose el eluato en dos beakeres. Se concluyó con 200ml de agua destilada recolectandose el eluato en un beaker. Despues de efectuar el monitoreo con cromatografía de capa delgada, todas las fracciones se llevaron a sequedad, con ayuda del rota vapor a presión reducida.

2.10 RESULTADOS DE CROMATOGRAFIA DE CAPA DELGADA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR C.L.B.P.

Para el análisis de los eluatos obtenidos por cromatografía de columna (C.B.L.P). se utilizó cromatografía plana (cromatofolios).

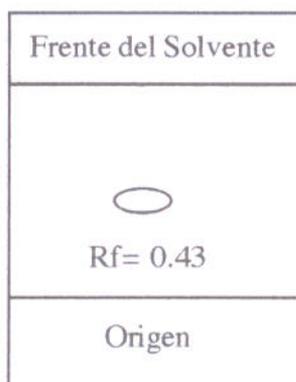
Para la fracción de hexano se utilizó como fase móvil una mezcla de Hexano-Acetato de Etilo (15:10).

Para la fracción de acetato de etilo, se usó como fase móvil Acetato de Etilo-Etanol (15:15).

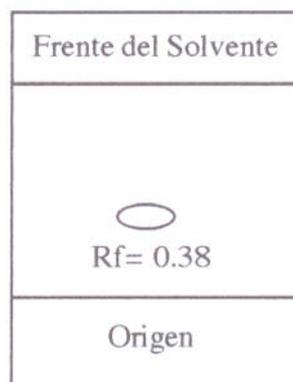
Para la fracción etanol se usó como fase móvil Acetato de etilo-Etanol (15:15).

Para la fracciones de agua se uso como fase móvil Agua- Acetato de Etilo (20:5)

CROMATOGRAMAS DE LAS FRACCIONES HEXANO Y ACETATO DE ETILO.

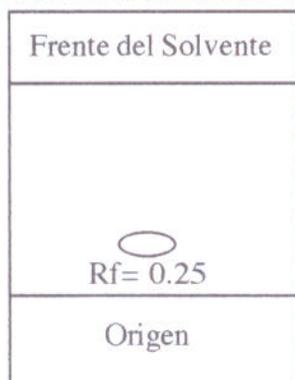


Fase móvil: Hexano-Acetato de etilo
Detección: Vainillina- Ac. Sulfúrico

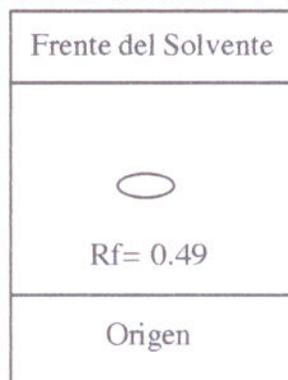


Fase móvil: Acetato de etilo -Etanol
Detección: Vainillina- Ac. Sulfúrico

CROMATOGRAMAS DE LAS FRACCIONES ETANOL Y AGUA.



Fase móvil: Acetato de Etilo-Etanol
Detección: Vainillina- Ac. Sulfúrico



Fase móvil: Agua-Acetato de etilo
Detección: Vainillina- Ac. Sulfúrico

2.11 ENSAYO DE TOXICIDAD CON ARTEMIA SALINA

La metodología seguida para el bioensayo *Artemia salina* es el descrito en el protocolo de trabajo propuesto por el Dr. Pablo Solís (Panamá) en la escala microanalítica, en la que se emplean Platos de 96 micropozos usado generalmente para cultivos de tejidos.

Preparación del Medio de Cultivo. El agua de mar utilizada para el ensayo fue obtenida en el laboratorio artificialmente: Pesando 35g de NaCl (sal) y disolviéndolo en un litro de agua destilada. Se pesaron 6 mg de levadura (ácido adenélico) y se disolvió en 20 ml de agua destilada. Se mezclaron ambas soluciones y se aforó hasta obtener 1000ml de solución con agua destilada.

Incubación de los Nauplius.

Paso 1. En un recipiente, para nuestro caso, envase plástico de coca-cola de 2 L previamente lavado, se colocaron alrededor de 600 ml de agua de mar (a temperatura ambiente) y exactamente 300 mg de huevecillos de *Artemia salina*.

Paso 2. La mezcla se airea con la ayuda de una bomba de aire para acuario y se ilumina con una lámpara durante 30 horas aproximadamente a una temperatura de 22-29 °C.

Paso 3. Al cabo de las 30 horas los nauplios fueron separados de los huevecillos, deteniendo el aireo y dejando que los nauplios se reúnan en una esquina del recipiente debido a su movimiento fototrópico, los nauplios fueron removidos con la ayuda de una pipeta y colocado en un recipiente con agua de mar fresca, previamente aireada.

Paso 4. Transcurrido unas 18 horas del paso 3, ó 48 horas del paso 1, se colocó una cantidad de nauplios en un vaso químico de 100 ml con aproximadamente 50 ml de agua de mar fresca y previamente aireada, se continuó el aireo en forma tal que los nauplios formaran una suspensión homogénea.

Paso 5. Con la ayuda de una fuente de luz y una pipeta automática fijada a $100 \mu\text{l}$, se contaron cuantos nauplios en promedio de cinco intentos se colectaban, lo recomendado es que las cantidades de nauplios no excedan de 15 ni sean menos de 10.

Preparacion de la Muestra. Se utilizan dos métodos de extracción para obtener las muestras a ensayar en el Bioensayo.

-Extracción tipo Soxhlet.

-Cromatografía de columna a baja presión .

Extracción Soxhlet. Se pesaron 60 g de muestra seca y molida, la muestra se colocó en los dedales (cartucho de extracción) de 30 mm de diámetro por 100mm de largo, se utilizaron tres dedales los cuales cada uno contenia 20g de muestra, luego se procedió a medir el disolvente puro (se usó 200 ml de etanol al 95%), el material extraído se acumula en el balón de destilación del disolvente. La extracción duro aproximadamente 6 horas. El extracto total fue sometido a evaporación en un rota vapor a presión reducida hasta sequedad para asegurar que el extracto este libre de solventes que interfirieran en la evolución de su actividad biológica.

En el caso de Cromatografía de Columna a Baja Presión los eluatos fueron llevados a sequedad. Se prepararon las condiciones para iniciar el bioensayo con Artemia salina. Se pesó la cantidad de las muestras (extracto crudo etanólico, fracción concentrada de hexano, acetato de etilo, etanol, agua), necesarias para obtener una concentración de 1000ppm a partir de las cuales se realizaron diluciones.

Se añadió 0.5 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) y se disolvió la muestra completamente por agitación. Se adicionó 9.5 ml de agua de mar preparada artificialmente.

Preparación del Blanco. La solución utilizada como blanco se prepara adicionando $50\mu\text{l}$ de DMSO en $950\mu\text{l}$ de agua de mar artificial previamente preparada con levadura.

Preparación del Patrón. Se preparó una solución con una concentración inicial de 250 ppm de sulfato de cobre II pentahidratado con agua de mar. Se realizaron diluciones a partir de la concentración inicial para evaluar el efecto positivo de este sobre Artemia salina a varias concentraciones. El sulfato cúprico pentahidratado se utiliza en la agricultura como fungicida. Debido a sus propiedades es utilizado como excelente patrón en el bioensayo con Artemia salina.

2.12 BIOENSAYO

El ensayo se realiza con nauplios de **Artemia salina** que tenían aproximadamente 48 horas de edad.

Técnica Utilizada. Se hizo uso de una micropipeta y un plato de 96 micropozos con capacidad de 300 μl cada pozo. A continuación se muestra una representación de un microplato de 96 micropozos.

	% DMSO			Patrón (ppm)		Muestra 1 (ppm)			Muestra 2 (ppm)			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		2.5			125			500			500	
B		1.25			62.5			250			250	
C		0.625			31.25			125			125	
D		0.3125			15.625			62.5			62.5	
E		0.15625			7.8125			31.25			31.25	
F		0.078125			3.90625			15.625			15.625	
G		0.0390625			1.953125			7.8125			7.8125	
H		0.0195312			0.9765625			3.90625			3.90625	

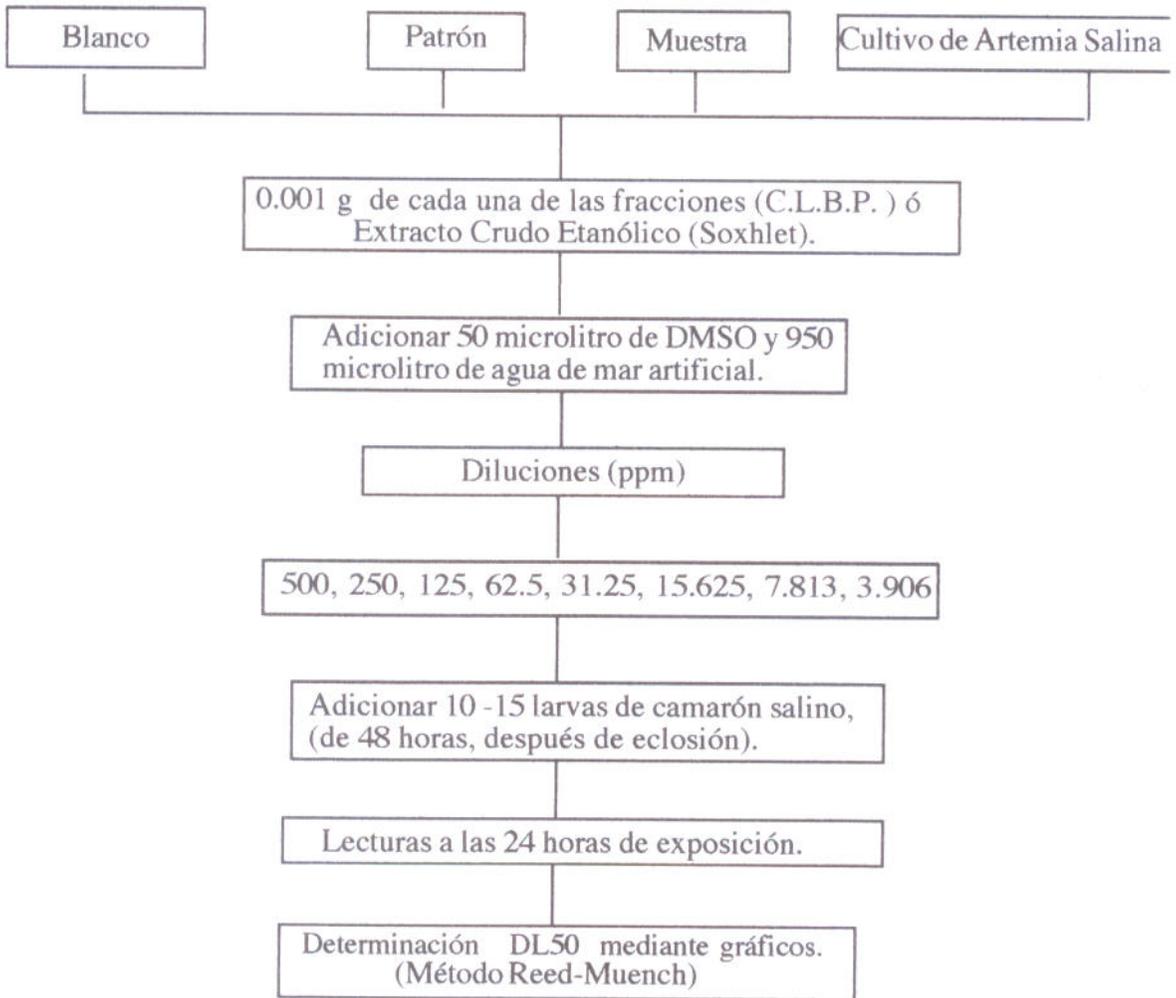
- En los pozos A₁, A₂ y A₃ se colocaron para cada pozo 200 μl de solución blanco (5% DMSO).
 - En los pozos A₄, A₅, A₆ se colocaron para cada pozo 200 μl de solución patrón de Sulfato de Cobre II pentahidratado, con una concentración inicial de 250 ppm.
 - En los pozos A₇, A₈ y A₉ se colocaron para cada pozo 200 μl de solución de muestra de una concentración de 1000 ppm en los pozos A₁₀, A₁₁ y A₁₂ se colocó una segunda muestra con la misma concentración de 1000 ppm.
 - Usando una micropipeta de 100 μl se removieron 100 μl de cada micropozo a lo largo de la línea A, los que fueron colocados en la línea B. mezclando por succiones repetidas de la solución, luego se removieron 100 μl de esta línea B y se colocaron en la línea C y se mezcló, este procedimiento de dilución se repitió hasta el final del plato (con lo que se logra diluciones al 50%).
- Con los 100 μl provenientes de la línea G se acumulan para la línea H (última dilución) 200 μl por lo que se desechan 100 μl quedando así para cada uno de los micropozos del plato 100 μl .

Finalmente para cada micropozo del plato se adicionan 100 μ l de solución de agua de mar conteniendo los nauplios, depositando a cada pozo entre 10 y 15 nauplios. Se incubó a 22-29 $^{\circ}$ C durante 24 horas.

Como la concentración inicial de la muestra es de 1000 ppm, por efecto de dilución la línea A tendrá una concentración de 500 ppm, por tanto la línea B de 250 ppm y así sucesivamente hasta la línea H con una concentración de 3.91 ppm. El mismo efecto de dilución ocurre para los micropozos conteniendo solución patron de Sulfato de Cobre II pentahidratado, y el Blanco (DMSO). Luego de 24 horas se contaron los nauplios muertos y vivos utilizando una lupa.

Como criterio generalizado los nauplios se consideran muertos si ellos permanecen inmóviles en el fondo del micropozo. El número de muerto se anotó para cada micropozo en un cuadro de datos simulando el microplato (resultados por triplicado). Las Tablas A, B, C, D, E, resumen los resultados finales.

Fig.6. ESQUEMA DEL BIOENSAYO DE ARTEMIA SALINA.



2.13 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA

El valor DL_{50} se determina utilizando el conteo de análisis indagado a las 24 horas de exposición (toxicidad crónica). El método de Reed-Muench será la vía usada para tratar los datos. Este procedimiento asume que un animal que sobrevive a una dosis alta podría también sobrevivir a una dosis baja o viceversa, que una animal que muere a cierta dosis baja podría también morir a cualquier dosis alta, de este modo la información de cualquier grupo puede ser añadida a otros grupos dentro del rango de las dosis ensayadas.

El primer procedimiento gráfico incluye el número de acumulado vivos y el número de acumulado muertos en la misma abscisa, (número de animales), en función del log de la dosis. Las curvas se entrecruzan (p. ej; log dosis), donde el número de acumulados vivos es igual al número de acumulados muertos. Esto puede ser utilizado para obtener un estimado rápido de la tolerancia media DL_{50} .

En el segundo método se grafica el porcentaje de mortalidad en función del logaritmo de la dosis, la dosis al 50% de mortalidad es obtenida por la intercepción a la curva. En contraste éste segundo método permite la utilización de la fórmula para estimar el error estándar (ES)

$$ES_{DL50} = \sqrt{0.79 \times h \times R/n}$$

R= Rango intercuartil (DL75-DL25) de los porcentajes acumulados.

n= Número de animales (promedio).

h= Promedio de intervalo entre dosificaciones (log de la dosis).

R puede ser obtenida de la gráfica del porcentaje de mortalidad en función de logaritmo de la dosis. %

$$M = [(AM) / (AM + AV)] \times (100).$$

Si el valor DL75 ó DL25 no pueden ser obtenidos de la gráfica, entonces R puede ser determinada (estimado) como dos veces DL75 a DL50, o dos veces DL50 á DL25.

El 95% del límite de confianza del valor DL50 puede ser derivado de la siguiente relación: $\text{Log DL}_{50} \pm 2\text{SEDL}_{50}$

Cualquier extracto vegetal resultando con un valor DL50 menor que 1000 ppm es considerada interesante para seguir su estudio.

Con los datos, se procedió con los gráficos según el método Reed- Muench. Se muestran los gráficos A, B, C, D y E, así como los respectivos Tablas A.1, B.1, C.1, D.1 y E.1 en donde se reportan los valores DL50.

TABLA A Resultados del bioensayo con Artemia salina para fracción de hexano (C.L.B.P.). Lectura después de 24 horas de exposición.

BIOENSAYO 1.													
Blanco				Patrón			Muestra			Método Reed-Muench			
	% DMSO	V	M	Dosis ppm	V	M	Dosis ppm	V	M	Log Dosis	AM	AV	% M
A	2.5	11	0	125	0	11	500	3	7	2.69897	29	3	90.625
B	1.25	11	0	62.5	0	14	250	5	5	2.39794	22	8	73.33333
C	0.625	12	0	31.25	0	11	125	6	5	2.09691	17	14	54.83871
D	0.3125	10	0	15.625	0	11	65.5	6	5	1.79588	12	20	37.50000
E	0.15625	12	0	7.8125	1	9	31.25	12	3	1.49485	7	32	17.94872
F	0.078125	10	2	3.90625	1	9	15.625	11	2	1.19382	4	43	8.51064
G	0.0390625	10	2	1.953125	0	12	7.8125	14	1	0.89276	2	57	3.38983
H	0.0195312	10	2	0.9765925	0	13	3.90625	11	1	0.59176	1	68	1.44928

BIOENSAYO 2													
Blanco				Patrón			Muestra			Método Reed-Muench			
	% DMSO	V	M	Dosis ppm	V	M	Dosis ppm	V	M	Log Dosis	AM	AV	% M
A	2.5	13	0	125	0	15	500	7	4	2.69897	14	7	66.66667
B	1.25	10	0	62.5	0	10	250	9	3	2.39794	10	16	38.46154
C	0.625	11	0	31.25	0	12	125	10	2	2.09691	7	26	21.21212
D	0.3125	11	0	15.625	0	14	65.5	9	2	1.79588	5	35	12.50000
E	0.15625	13	0	7.81250	0	10	31.25	8	2	1.49485	3	43	6.52174
F	0.078125	14	0	3.90625	0	11	15.625	13	1	1.19382	1	56	1.75439
G	0.0390625	11	0	1.953125	0	11	7.8125	10	0	0.89276	0	66	0.00000
H	0.0195312	9	1	0.9765925	0	10	3.90625	11	0	0.59176	0	77	0.00000

BIOENSAYO 3.													
Blanco				Patrón			Muestra			Método Reed-Muench			
	% DMSO	V	M	Dosis ppm	V	M	Dosis ppm	V	M	Log Dosis	AM	AV	% M
A	2.5	10	0	125	0	10	500	7	3	2.69897	11	7	61.11111
B	1.25	13	0	62.5	0	15	250	10	2	2.39794	8	17	32.00000
C	0.625	14	0	31.25	0	12	125	10	2	2.09691	6	27	18.18182
D	0.3125	11	0	15.625	0	12	65.5	8	2	1.79588	4	35	10.25641
E	0.15625	11	0	7.8125	0	10	31.25	14	1	1.49485	2	49	3.92157
F	0.078125	10	0	3.90625	0	15	15.625	12	0	1.19382	1	61	1.61290
G	0.0390625	10	2	1.953125	0	14	7.8125	11	1	0.89276	1	72	1.36986
H	0.0195312	10	1	0.9765925	2	10	3.90625	10	0	0.59176	0	82	0.00000

DMSO: Dimetil Sulfóxido

V : Vivo

M : Muerto

AM: Acumulado Muerto

AV: Acumulado Vivo

M : Mortalidad (AM / AM + AV)

TABLA B. Resultados del bioensayo con Artemia salina para la fracción acetato de etilo (C.L.B.P). Lectura después de 24 horas de exposición.

Método Reed – Muench.

BIOENSAYO 1.													
Blanco				Patrón			Muestra				Método Reed Muench		
	% DMSO	V	M	Dosis ppm	V	M	Dosis ppm	V	M	Log Dosis	AM	AV	% M
A	2.5	10	0	125	0	12	500	8	6	2.69897	32	8	80.00000
B	1.25	10	0	62.5	0	10	250	9	5	2.39794	26	17	60.46512
C	0.625	12	0	31.25	0	15	125	10	5	2.09691	21	27	43.75000
D	0.3125	14	0	15.625	0	11	65.5	10	5	1.79588	16	37	30.18868
E	0.15625	10	0	7.8125	0	10	31.25	6	4	1.49485	11	43	20.37037
F	0.078125	13	0	3.90625	0	15	15.625	11	3	1.19382	7	54	11.47541
G	0.0390625	14	0	1.953125	0	15	7.8125	9	2	0.89276	4	63	5.97015
H	0.0195312	13	0	0.9765925	1	9	3.90625	10	2	0.59176	2	73	2.66667

BIOENSAYO 2.													
Blanco				Patrón			Muestra				Método Reed-Muench		
	% DMSO	V	M	Dosis ppm	V	M	Dosis ppm	V	M	Log Dosis	AM	AV	% M
A	2.5	10	0	125	0	12	500	3	7	2.69897	37	3	92.50000
B	1.25	10	0	62.5	0	10	250	5	7	2.39794	30	8	78.94737
C	0.625	12	0	31.25	0	15	125	8	6	2.09691	23	16	58.97436
D	0.3125	14	0	15.625	0	11	65.5	6	5	1.79588	17	22	43.58974
E	0.15625	10	0	7.8125	0	10	31.25	8	5	1.49485	12	30	28.57143
F	0.078125	13	0	3.90625	0	15	15.625	8	4	1.19382	7	38	15.55556
G	0.0390625	14	0	1.953125	0	15	7.8125	9	2	0.89276	3	47	6.00000
H	0.0195312	13	0	0.9765925	1	9	3.90625	9	1	0.59176	1	56	1.75439

BIOENSAYO 3.													
Blanco				Patrón			Muestra				Método Reed-Muench		
	% DMSO	V	M	Dosis ppm	V	M	Dosis ppm	V	M	Log Dosis	AM	AV	% M
A	2.5	10	0	125	0	12	500	5	5	2.69897	25	5	83.33333
B	1.25	10	0	62.5	0	10	250	10	5	2.39794	20	15	57.14286
C	0.625	12	0	31.25	0	15	125	7	3	2.09691	15	22	40.54054
D	0.3125	14	0	15.625	0	11	65.5	7	3	1.79588	12	29	29.26829
E	0.15625	10	0	7.8125	0	10	31.25	6	4	1.49485	9	35	20.45454
F	0.078125	13	0	3.90625	0	15	15.625	9	3	1.19382	5	44	20.45500
G	0.0390625	14	0	1.953125	0	15	7.8125	8	2	0.89276	2	52	3.70370
H	0.0195312	13	0	0.9765925	1	9	3.90625	12	0	0.59176	0	64	0.00000

TABLA C. Resultados del bioensayo con Artemia salina para la fracción etanólica (C.L.B.P.). Lectura después de 24 horas de exposición.

Método Reed – Muench.

BIOENSAYO 1.													
Blanco			Patrón			Muestra				Método Reed-Muench			
	% DMSO	V	M	Dosis ppm	V	M	Dosis ppm	V	M	Log Dosis	AM	AV	% M
A	2.5	13	0	125	0	15	500	8	5	2.69897	15	8	65.21739
B	1.25	15	0	62.5	0	13	250	8	3	2.39794	10	16	38.46154
C	0.625	14	0	31.25	0	13	125	8	3	2.09691	7	24	22.58065
D	0.3125	10	0	15.625	0	11	65.5	8	2	1.79588	4	32	11.11111
E	0.15625	10	0	7.8125	0	14	31.25	11	2	1.49485	2	43	4.44444
F	0.078125	16	0	3.90625	0	14	15.625	13	0	1.19382	0	56	0.00000
G	0.0390625	12	0	1.953125	0	13	7.8125	11	0	0.89276	0	67	0.00000
H	0.0195312	12	0	0.9765925	0	15	3.90625	10	0	0.59176	0	77	0.00000

BIOENSAYO 2.													
Blanco			Patrón			Muestra				Método Reed-Muench			
	% DMSO	V	M	Dosis ppm	V	M	Dosis ppm	V	M	Log Dosis	AM	AV	% M
A	2.5	11	0	125	0	10	500	10	3	2.69897	16	10	61.53846
B	1.25	15	0	62.5	0	11	250	7	3	2.39794	13	17	43.33333
C	0.625	14	0	31.25	0	10	125	10	4	2.09691	10	27	27.02703
D	0.3125	10	0	15.625	0	10	65.5	8	2	1.79588	6	35	14.63415
E	0.15625	10	0	7.8125	0	15	31.25	8	2	1.49485	4	43	8.51064
F	0.078125	14	0	3.90625	0	14	15.625	10	2	1.19382	2	53	3.63636
G	0.0390625	10	0	1.953125	0	10	7.8125	15	0	0.89276	0	68	0.00000
H	0.0195312	14	0	0.9765925	0	13	3.90625	10	0	0.59176	0	78	0.00000

BIOENSAYO 3.													
Blanco			Patrón			Muestra				Método Reed-Muench			
	% DMSO	V	M	Dosis ppm	V	M	Dosis ppm	V	M	Log Dosis	AM	AV	% M
A	2.5	10	0	125	0	12	500	8	4	2.69897	20	8	71.42857
B	1.25	10	0	62.5	0	13	250	6	4	2.39794	16	14	53.33333
C	0.625	11	0	31.25	0	10	125	6	4	2.09691	12	20	37.50000
D	0.3125	12	0	15.625	0	10	65.5	7	3	1.79588	8	27	22.85714
E	0.15625	15	0	7.8125	0	12	31.25	10	3	1.49485	5	37	11.90476
F	0.078125	12	0	3.90625	0	14	15.625	11	1	1.19382	2	48	4.00000
G	0.0390625	12	0	1.953125	0	14	7.8125	11	1	0.89276	1	59	1.66667
H	0.0195312	12	0	0.9765925	0	10	3.90625	11	0	0.59176	0	70	0.00000

TABLA D. Resultados del bioensayo con Artemia para el extracto acuoso (C.L.B.P.).
Lectura después de 24 horas de exposición.

Método Reed - Muench.

BIOENSAYO 1.													
Blanco				Patrón			Muestra					Método Reed-Muench	
	% DMSO	V	M	Dosis ppm	V	M	Dosis ppm	V	M	Log Dosis	AM	AV	% M
A	2.5	10	0	125	0	12	500	6	4	2.69897	14	6	70.00000
B	1.25	10	0	62.5	0	10	250	8	3	2.39794	10	14	41.66667
C	0.625	12	0	31.25	0	15	125	10	2	2.09691	7	24	22.58065
D	0.3125	14	0	15.625	0	11	65.5	10	2	1.79588	5	34	12.82051
E	0.15625	10	0	7.8125	0	10	31.25	9	1	1.49485	3	43	6.52174
F	0.078125	13	0	3.90625	0	15	15.625	14	1	1.19382	2	57	3.38983
G	0.0390625	14	0	1.953125	0	15	7.8125	11	1	0.89276	1	68	1.44928
H	0.0195312	13	0	0.9765925	1	10	3.90625	15	0	0.59176	0	83	0.00000

BIOENSAYO 2.													
Blanco				Patrón			Muestra					Método Reed Muench	
	% DMSO	V	M	Dosis ppm	V	M	Dosis ppm	V	M	Log Dosis	AM	AV	% M
A	2.5	10	0	125	0	12	500	5	6	2.69897	26	5	83.87097
B	1.25	10	0	62.5	0	10	250	7	4	2.39794	20	12	62.50000
C	0.625	12	0	31.25	0	15	125	6	4	2.09691	16	18	47.05882
D	0.3125	14	0	15.625	0	11	65.5	9	3	1.79588	12	27	30.76923
E	0.15625	10	0	7.8125	0	10	31.25	7	3	1.49485	9	34	20.93023
F	0.078125	13	0	3.90625	0	15	15.625	10	3	1.19382	6	44	12.00000
G	0.0390625	14	0	1.953125	0	15	7.8125	10	2	0.89276	3	54	5.26316
H	0.0195312	13	0	0.9765925	1	9	3.90625	14	1	0.59176	1	68	1.44928

BIOENSAYO 3.													
Blanco				Patrón			Muestra					Método Reed Muench	
	% DMSO	V	M	Dosis ppm	V	M	Dosis ppm	V	M	Log Dosis	AM	AV	% M
A	2.5	10	0	125	0	12	500	11	4	2.69897	19	11	63.33333
B	1.25	10	0	62.5	0	10	250	11	4	2.39794	15	22	40.54054
C	0.625	12	0	31.25	0	15	125	7	3	2.09691	11	29	27.50000
D	0.3125	14	0	15.625	0	11	65.5	8	2	1.79588	8	37	17.77778
E	0.15625	10	0	7.8125	0	10	31.25	12	2	1.49485	6	49	10.90909
F	0.078125	13	0	3.90625	0	15	15.625	13	2	1.19382	4	62	6.06060
G	0.0390625	14	0	1.953125	0	15	7.8125	11	1	0.89276	2	73	2.66667
H	0.0195312	13	0	0.9765925	1	9	3.90625	11	1	0.59176	1	84	1.17647

TABLA E. Resultados del bioensayo con Artemia salina para el Extracto Crudo Etanólico. Lectura después de 24 horas de exposición.

Método Reed – Muench.

BIOENSAYO 1.													
Blanco				Patrón			Muestra				Método Reed-Muench		
	% DMSO	V	M	Dosis ppm	V	M	Dosis ppm	V	M	Log Dosis	AM	AV	% M
A	2.5	10	0	125	0	13	500	10	5	2.69897	24	10	70.58824
B	1.25	10	0	62.5	0	13	250	7	4	2.39794	19	17	52.77778
C	0.625	12	0	31.25	0	14	125	11	4	2.09691	15	28	34.88372
D	0.3125	11	0	15.625	0	15	65.5	10	4	1.79588	11	38	22.44898
E	0.15625	10	0	7.8125	0	11	31.25	7	3	1.49485	7	45	13.46154
F	0.078125	15	0	3.90625	0	10	15.625	9	2	1.19382	4	54	6.89655
G	0.0390625	14	0	1.953125	0	10	7.8125	13	2	0.89276	2	67	2.89855
H	0.0195312	8	2	0.9765925	0	15	3.90625	15	0	0.59176	0	82	0.00000

BIOENSAYO 2.													
Blanco				Patrón			Muestra				Método Reed-Muench		
	% DMSO	V	M	Dosis ppm	V	M	Dosis ppm	V	M	Log Dosis	AM	AV	% M
A	2.5	11	0	125	0	12	500	8	3	2.69897	14	8	63.63636
B	1.25	10	0	62.5	0	15	250	9	3	2.39794	11	17	39.28571
C	0.625	10	0	31.25	0	10	125	13	2	2.09691	8	30	21.05263
D	0.3125	10	0	15.625	0	10	65.5	10	2	1.79588	6	40	13.04348
E	0.15625	12	0	7.8125	0	10	31.25	14	1	1.49485	4	54	6.89655
F	0.078125	13	0	3.90625	0	11	15.625	14	1	1.19382	3	68	4.22535
G	0.0390625	15	0	1.953125	0	10	7.8125	11	1	0.89276	2	79	2.46914
H	0.0195312	10	1	0.9765925	0	15	3.90625	10	1	0.59176	1	89	1.11111

BIOENSAYO 3.													
Blanco				Patrón			Muestra				Método Reed-Muench		
	% DMSO	V	M	Dosis ppm	V	M	Dosis ppm	V	M	Log Dosis	AM	AV	% M
A	2.5	13	0	125	0	10	500	5	7	2.69897	38	5	88.37209
B	1.25	12	0	62.5	0	11	250	9	6	2.39794	31	14	68.88889
C	0.625	15	0	31.25	0	12	125	10	5	2.09691	25	24	51.02041
D	0.3125	10	0	15.625	0	14	65.5	7	5	1.79588	20	31	39.21569
E	0.15625	10	0	7.8125	0	10	31.25	10	5	1.49485	15	41	26.78571
F	0.078125	12	0	3.90625	0	12	15.625	11	4	1.19382	10	52	16.12903
G	0.0390625	10	2	1.953125	0	10	7.8125	12	3	0.89276	6	64	8.57143
H	0.0195312	9	1	0.9765925	2	11	3.90625	11	3	0.59176	3	75	3.84615

ANÁLISIS DE LOS GRÁFICOS

Gráfico A. Referido a la muestra fracción hexano (C.L.B.P.). Ensayos 1, 2, y 3 corresponden al gráfico de los datos Acumulados Muertos y Acumulados Vivos en función del logaritmo de la dosis. Ensayos 1.1, 2.2 y 3.3 corresponden al registro gráfico del dato % de Mortalidad en función del logaritmo de la Dosis. En la Tabla A.1 se presentan los resultados para DL₅₀. Se incluyen algunos datos estadísticos.

Tabla A.1. Resultados DL ₅₀ en la fracción Hexano (C.L.B.P.)									
Método Reed - Muench									
Log Dosis (1)	Log. Dosis (2)	Dosis ppm (1)	Dosis ppm (2)	DL ₅₀ med ppm (1)	DL ₅₀ med ppm (2)	IC (1)	ES (2)	LC (2)	
2.0148	2.0130	103.47	103.04	283.89	272.94	S = 159.07 t ₉₅ 4.30 n = 3 283.89±394.91	ESDL ₅₀ =0.31 h=1.81 R=0.82 n =12	2.01±0.62	
2.5369	2.5211	344.27	331.97				ESDL ₅₀ =0.35 h=2.34 R =0.74 n = 11		2.52±0.70
2.6063	2.5841	403.92	383.79				ESDL ₅₀ =0.30 h =2.32 R =0.53 n=11		2.58±0.60

(1)= Ensayos 1, 2 y 3 (Gráfico A)

(2)= Ensayos 1.1, 1.2 y 1.3 (Gráfico A)

IC= Intervalo de confianza ($X_{med} \pm t_{95} S / \sqrt{n}$).

(S = Desviación Estándar) (n = número de repeticiones)

ES= Error Estándar ($ESDL_{50} = \sqrt{(0.79) (h) (R) / n}$)

R= Rango intercuartil 2 (DL₅₀-DL₂₅) de los porcentajes acumulados.

h= Promedio de intervalo entre dosificación (Log de la dosis). [(Log DL₅₀ + Log DL₂₅) / 2]

n= Número promedio de nauplios

LC= Límite de confianza al 95% (Log DL₅₀ ± 2SEDL₅₀)

Gráfica A. Bioensayo de Artemia salina. Lectura a las 24 horas de exposición. Fracción Hexano (CLBP). DL₅₀ - Método Reed Muench.

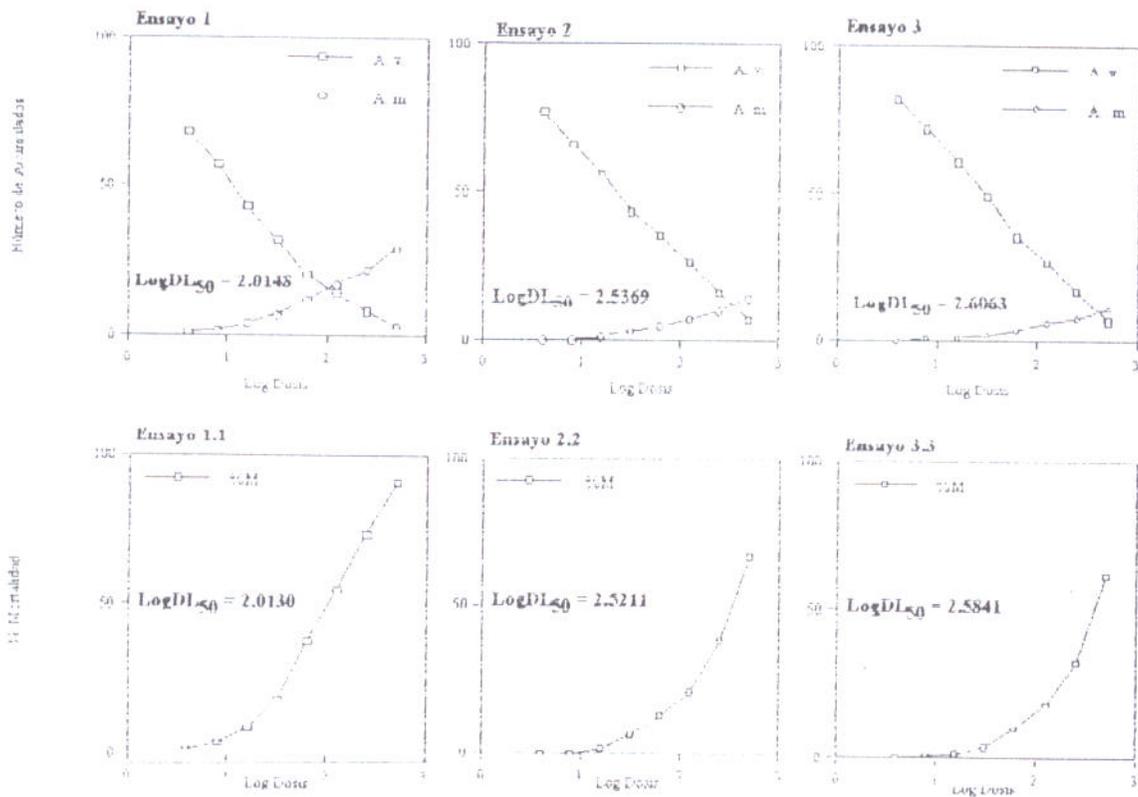


Gráfico B. Referido a la muestra fracción Acetato de Etilo (C.L.B.P.). Ensayos 1, 2, y 3 corresponden al gráfico de los datos Acumulados Muertos y Acumulados Vivos en función del logaritmo de la dosis. Ensayos 1.1, 2.2 y 3.3 corresponden al registro gráfico del dato % de Mortalidad en función del logaritmo de la Dosis. En la Tabla B.1 se presentan los resultados para DL₅₀. Se incluyen algunos datos estadísticos.

Tabla B.1. Resultados DL₅₀ en la fracción de Acetato de etilo (C.L.B.P.)..

Método Reed - Muench

Log Dosis (1)	Log. Dosis (2)	Dosis ppm (1)	Dosis ppm (2)	DL ₅₀ med ppm (1)	DL ₅₀ med ppm (2)	IC (1)	ES (2)	LC (2)
2.2173	2.2095	164.93	161.99	145.21	143.67	S = 54.66 t ₉₅ = 4.30 n = 3 145.21±135.70	ESDL ₅₀ = 0.36 h = 2.15 R = 1.0 n = 13	2.21±0.72
1.9213	1.9214	83.43	83.44				ESDL ₅₀ = 0.36 h = 1.88 R = 0.95 n = 11	
2.2725	2.2685	187.28	185.57				ESDL ₅₀ = 0.38 h = 2.13 R = 0.95 n = 11	

(1)= Ensayos 1, 2 y 3 (Gráfico B)

(2)= Ensayos 1.1, 1.2 y 1.3 (Gráfico B)

IC= Intervalo de confianza ($X_{med} \pm t_{95} S / \sqrt{n}$)

(S = Desviación Estándar) (n = número de repeticiones)

ES= Error Estándar ($ESDL_{50} = \sqrt{(0.79) (h) (R) / n}$)

R= Rango intercuartil (DL₇₅-DL₂₅) de los porcentajes acumulados.

h= Promedio de intervalo entre dosificación (Log de la dosis). [(Log DL₇₅ + Log DL₂₅) / 2]

n= Número promedio de nauplios

LC= Límite de confianza al 95% (Log DL₅₀ ± 2SEDL₅₀)

Gráfica B. Bioensayo de Artemia salina. Lectura a las 24 horas de exposición. Fracción Acetato de Etilo (CLBP). DL₅₀ - Método Reed Muench.

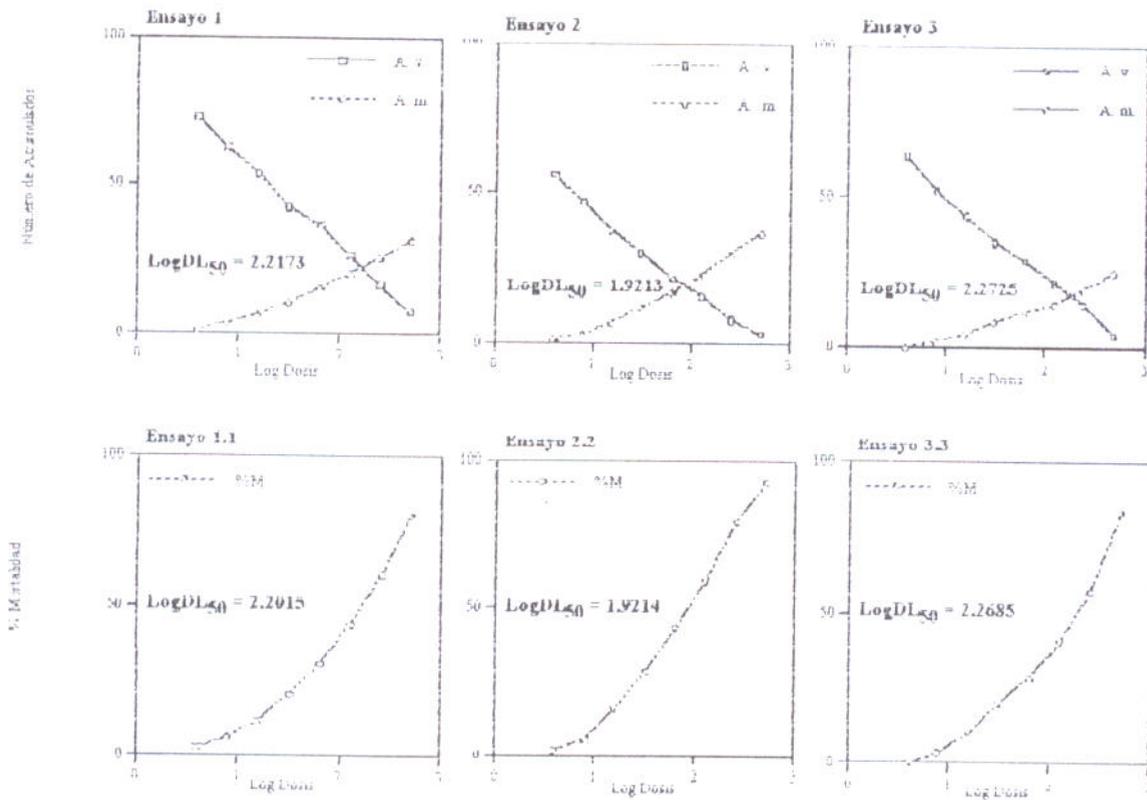


Gráfico C. Referido a la muestra fracción Etanólica (C.L.B.P.). Ensayos 1, 2, y 3 corresponden al gráfico de los datos Acumulados Muertos y Acumulados Vivos en función del logaritmo de la dosis. Ensayos 1.1, 2.2 y 3.3 corresponden al registro gráfico del dato % de Mortalidad en función del logaritmo de la Dosis. En la Tabla C.1 se presentan los resultados para DL₅₀. Se incluyen algunos datos estadísticos.

Tabla C.1. Resultados DL ₅₀ en la fracción etanólica (C.L.B.P.).									
Método Reed - Muench									
Log Dosis (1)	Log. Dosis (2)	Dosis ppm (1)	Dosis ppm (2)	DL ₅₀ med ppm (1)	DL ₅₀ med ppm (2)	IC (1)	ES (2)	LC (2)	
2.5369	2.5278	344.27	337.13	297.27	291.82	S = 69.35 t ₉₅ = 4.30 n = 3 297.27±172.17	ESDL ₅₀ = 0.34 h = 2.34 R = 0.76 n = 12	2.53±0.68	
2.5184	2.5082	329.91	322.26				ESDL ₅₀ = 0.39 h = 2.28 R = 0.92 n = 11		2.51±0.78
2.3377	2.3346	217.62	216.07				ESDL ₅₀ = 0.38 h = 2.09 R = 0.96 n = 11		

(1)= Ensayos 1, 2 y 3 (Gráfico C)

(2)= Ensayos 1.1, 1.2 y 1.3 (Gráfico C)

IC= Intervalo de confianza ($X_{med} \pm t_{95} S / \sqrt{n}$)

(S = Desviación Estándar) (n = número de repeticiones)

ES= Error Estándar ($ESDL_{50} = \sqrt{(0.79) (h) (R) / n}$)

R= Rango intercuartil 2(DL₅₀-DL₂₅) de los porcentajes acumulados.

h= Promedio de intervalo entre dosificación (Log de la dosis). [(Log DL₅₀ + Log DL₂₅) / 2]

n= Número promedio de nauplios

LC= Límite de confianza al 95% (Log DL₅₀ ± 2SEDL₅₀)

Gráfica C. Bioensayo de Artemia salina. Lectura a las 24 horas de exposición. Fracción Etanólica (CLBP). DL₅₀ - Método Reed Muench.

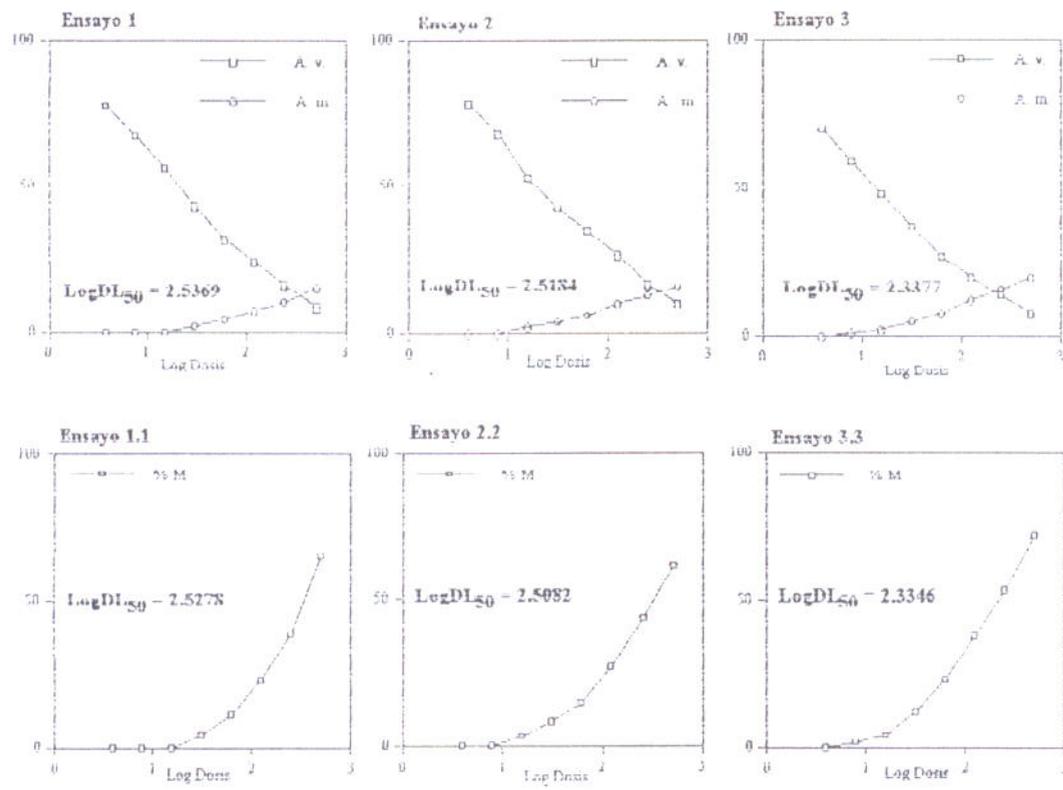


Gráfico D. Referido a la muestra fracción Acuosa (C.L.B.P.). Ensayos 1, 2, y 3 corresponden al gráfico de los datos Acumulados Muertos y Acumulados Vivos en función del logaritmo de la dosis. Ensayos 1.1, 2.2 y 3.3 corresponden al registro gráfico del dato % de Mortalidad en función del logaritmo de la Dosis. En la Tabla D.1 se presentan los resultados para DL₅₀. Se incluyen algunos datos estadísticos.

Tabla D.1. Resultados DL ₅₀ en la fracción Acuosa (C.L.B.P.).									
Método Reed - Muench									
Log Dosis (1)	Log. Dosis (2)	Dosis ppm (1)	Dosis ppm (2)	DL ₅₀ med ppm (1)	DL ₅₀ med ppm (2)	IC (1)	ES (2)	LC (2)	
2.4983	2.4865	314.99	306.55	268.01	260.85	S = 108.83 t ₉₅ = 4.30 n = 3 268.01 ± 270.18	ESDL ₅₀ = 0.33 h = 2.33 R = 0.7 n = 12	2.49 ± 0.66	
2.1571	2.1543	143.58	142.66				ESDL ₅₀ = 0.35 h = 1.9 R = 1.0 n = 12		2.15 ± 0.70
2.5384	2.5229	345.46	333.35				ESDL ₅₀ = 0.36 h = 2.29 R = 0.96 n = 13		

(1)= Ensayos 1, 2 y 3 (Gráfico D)

(2)= Ensayos 1.1, 1.2 y 1.3 (Gráfico D)

IC= Intervalo de confianza ($X_{med} \pm t_{95} S / \sqrt{n}$).

(S = Desviación Estándar) (n = número de repeticiones)

ES= Error Estándar ($ESDL_{50} = \sqrt{(0.79) (h) (R) / n}$)

R= Rango intercuartil 2(DL₅₀-DL₂₅) de los porcentajes acumulados.

h= Promedio de intervalo entre dosificación (Log de la dosis). [(Log DL₅₀ + Log DL₂₅) / 2]

n= Número promedio de nauplios

LC= Límite de confianza al 95% (Log DL₅₀ ± 2SEDL₅₀)

Gráfica D. Bioensayo de Artemia salina. Lectura a las 24 horas de exposición. Fracción Acuosa (CLBP). DL_{50} - Método Reed Muench.

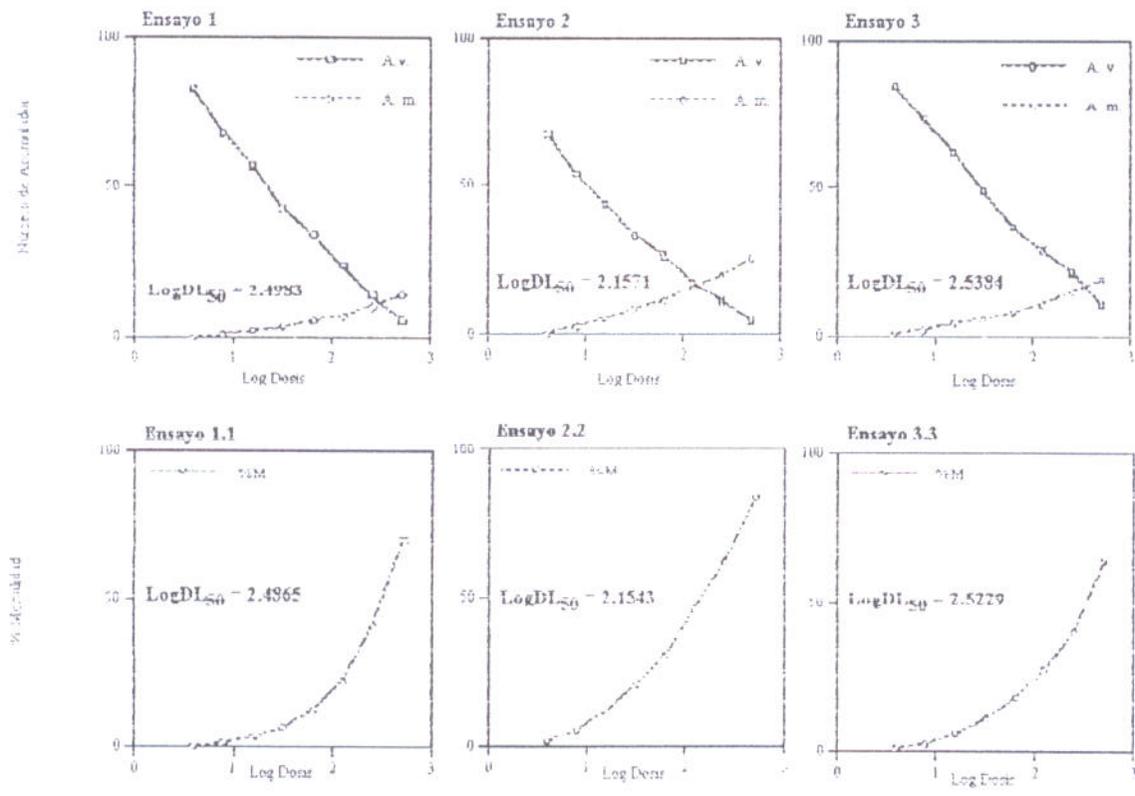


Gráfico E. Referido a la muestra Extracto Crudo Etanólico.(Soxhlet). Ensayos 1, 2, y 3 corresponden al gráfico de los datos Acumulados Muertos y Acumulados Vivos en función del logaritmo de la dosis. Ensayos 1.1, 2.2 y 3.3 corresponden al registro gráfico del dato % de Mortalidad en función del logaritmo de la Dosis. En la Tabla E.1 se presentan los resultados para DL₅₀. Se incluyen algunos datos estadísticos.

Tabla E.1. Resultados DL ₅₀ para el Extracto Vegetal Crudo Etanólico.(Soxhlet)									
Método Reed - Muench									
Log Dosis (1)	Log. Dosis (2)	Dosis ppm (1)	Dosis ppm (2)	DL ₅₀ med ppm (1)	DL ₅₀ med ppm (2)	IC (1)	ES (2)	LC (2)	
2.3578	2.3513	227.93	224.54	233.16	227.15	S = 117.89 t ₉₅ = 4.30 n = 3 233.16±292.67	ESDL ₅₀ = 0.36 h = 2.1 R = 1.0 n = 13	2.3513±0.72	
2.5485	2.5304	353.59	339.17				ESDL ₅₀ = 0.36 h = 2.29 R = 0.96 n = 13		2.5304±0.72
2.0718	2.071	117.98	117.76				ESDL ₅₀ = 0.36 h = 1.78 R = 1.3 n = 14		

(1)= Ensayos 1, 2 y 3 (Gráfico E)

(2)= Ensayos 1.1, 1.2 y 1.3 (Gráfico E)

IC= Intervalo de confianza (Xmed±t₉₅ S / √n)

(S = Desviación Estándar) (n = número de repeticiones)

ES= Error Estándar (ESDL₅₀ = √ (0.79) (h) (R) /n

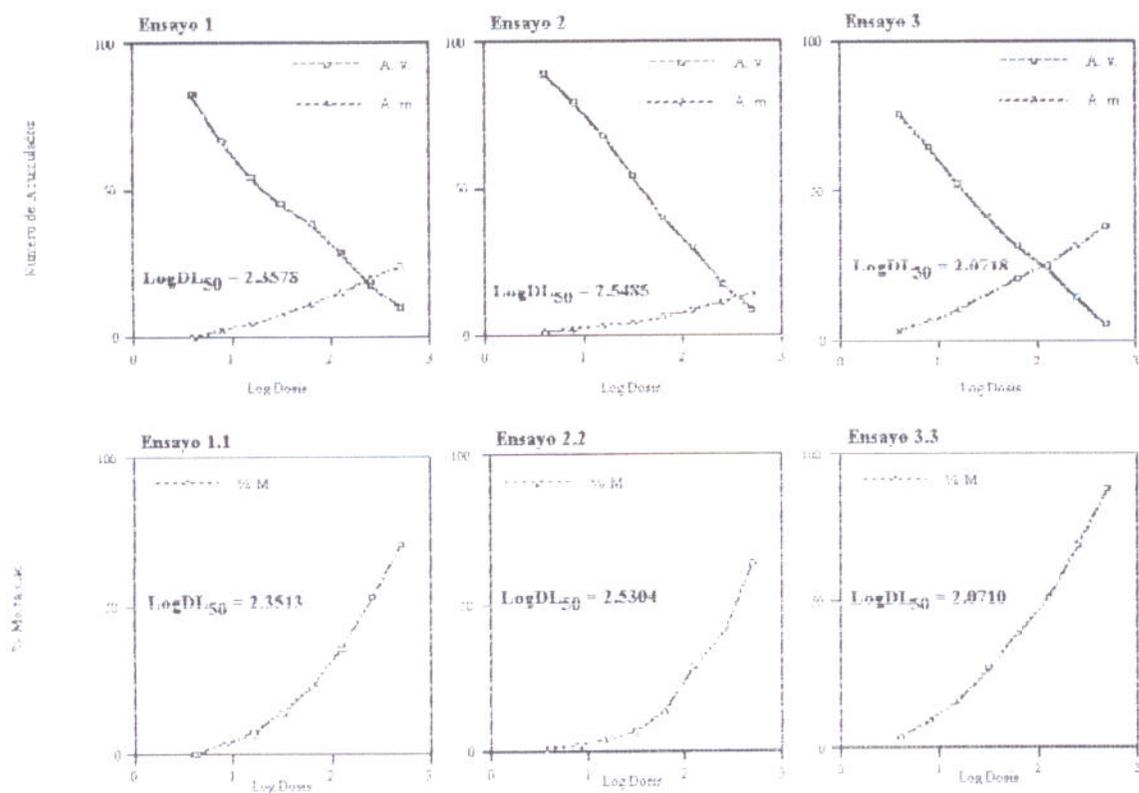
R= Rango intercuartil 2(DL₅₀-DL₂₅) de los porcentajes acumulados.

h= Promedio de intervalo entre dosificación (Log de la dosis).[(Log DL₅₀ + Log DL₂₅) / 2]

n= Número promedio de nauplios

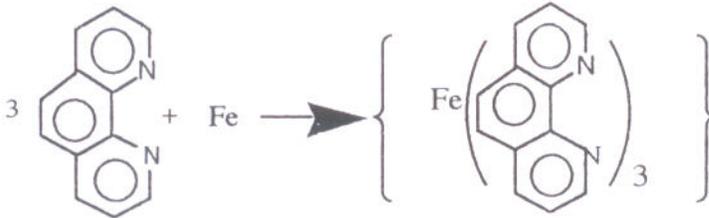
LC= Límite de confianza al 95% (Log DL₅₀ ± 2SEDL₅₀)

Gráfica E. Bioensayo de Artemia salina. Lectura a las 24 horas de exposición. Extracto Vegetal Crudo Etanólico. DL₅₀ - Método Reed Muench.



2.14 DETERMINACIÓN DE HIERRO. MÉTODO O-FENANTROLINA

El método O-fenantrolina es un procedimiento sensitivo para la determinación espectrofotométrica de hierro en una muestra. El procedimiento de 1,10-Fenantrolina envuelve la quelación de un átomo de hierro ferroso por tres moléculas de 1,10-Fenantrolina en solución buffer de acetato. Un complejo rojo -naranja se produce con una absorción máxima de 510 nm.



Es necesario una digestión ácida preliminar de la muestra para destruir materias orgánicas y remover Cianidinas y Nitritos las cuales interfieren. La adición de un exceso de hidroxilamina reduce el ión férrico o ión ferroso y elimina interferencias de fuertes cationes oxidados. Un exceso de 1,10-Fenantrolina añadida a la muestra a un pH entre 2.9 y 3.5 garantiza un rápido desarrollo del color. El complejo coloreado formado es estable indefinidamente.

El rango de concentración del método de la 1,10-fenantrolina usado en una celda de 1cm es 0.025 - 3 mg/l.

2.15 PREPARACION DE LA MUESTRA VEGETAL

Se pesaron 6 g de material vegetal (Corteza de Bursera simaruba) finamente dividido en un crisol de porcelana de superficie interna lisa y se calcinó durante 12 horas a 500-550⁰ C en la mufla, se dejó enfriar y se agregó 5 ml de ácido clorhídrico (1+1), se calentó en baño de vapor durante 15 minutos para disolver el hierro e hidrolizar el pirofosfato. Se filtró en un volumétrico de 100 ml, el residuo que queda en el papel se lavó 3 veces con porciones de 2 a 3 ml de ácido clorhídrico (1+100), luego con agua caliente hasta que los lavados extraigan el cloro. Se calcinó el papel filtro y el residuo de carbono en un crisol de platino (durante 8 horas a 250⁰ C en la mufla). Se enfrió, y se añadió dos gotas de ácido sulfúrico concentrado, 1 ml de ácido fluorhídrico cuidadosamente, se evaporaron los humos de SO₃. Se enfrió y se añadió gotas de ácido clorhídrico (1+1), se calentó, filtró, lavó y se diluyó a 50 ml en un matraz volumétrico con agua tridestilada. Esta solución representa la muestra problema.

2.16 PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Solución estándar de hierro II (200 mg Fe II/L)

Pese 0.200 gramos de alambre de hierro 99% de pureza y transfiera a un frasco volumétrico de 1 litro. Agregue 10 ml de agua destilada y luego 5 ml de ácido sulfúrico. Después que el hierro se haya disuelto, diluya el volumen con agua destilada. Guarde en una botella de vidrio tapada. Es estable por 6 meses.

Solución estándar de trabajo (10 mg Fe II/L)

Transfiera 5.00 ml de la solución anterior con una pipeta volumétrica de 5.00 ml a un frasco volumétrico de 100 ml. Agregue 1 ml de ácido sulfúrico concentrado diluya al volumen de aforo en agua destilada. Es estable por 2 meses.

Acido Clorhídrico Concentrado (Grado reactivo)

Solución de hidrocioruro de hidroxilamina (10% M/V)

Disuelva 10 g de hidrocioruro de hidroxilamina con 50 ml de agua destilada en un frasco volumétrico de 100 ml. Diluya al volumen de aforo, con agua destilada. Guarde en una botella de vidrio tapada. Estable por un mes.

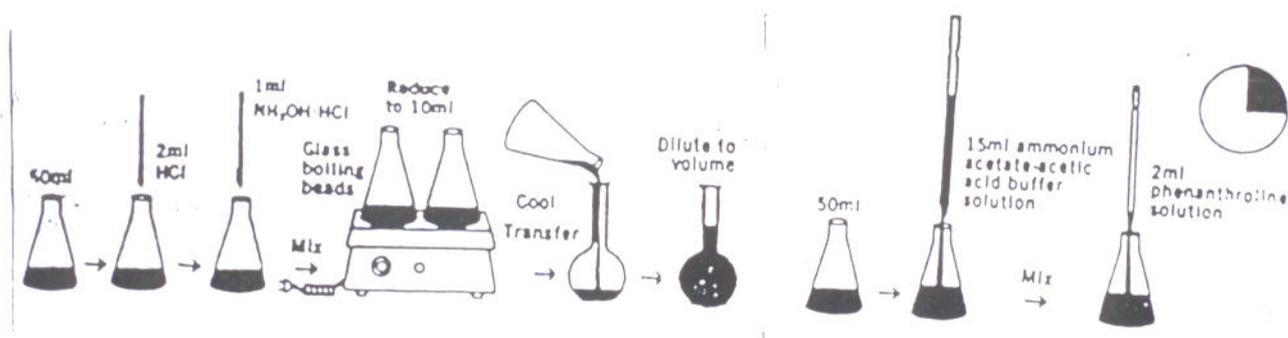
Solución buffer ácido acético-acetato

Disuelva 250 g de acetato de amonio con 250 ml de agua destilada, en un beaker de 2 Lts, muy cuidadosamente agregue 100 ml de ácido acético glacial, medidas con una probeta, guarde en una botella plástica bien tapada. Estable indefinidamente.

Solución 1,10 de Fenantrolina

Disuelva 100 mg de monohidrocioruro de 1,10 fenantrolina con 50 ml de agua destilada, en un frasco volumétrico de 100 ml. Diluya al volumen de aforo con agua destilada. Guarde en una botella de vidrio bien tapada. Estable por meses. Descarte si la solución se decolora.

2.17 PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO O-FENANTROLINA



- A. Se tomó 1 ml de solución muestra problema (Ver sección 2.15), y se aforó a 50 ml en un balon de aforación con agua tridestilada. Este volumen se traspasa a un frasco erlenmeyer.
- B. Se agregó 2 ml de ácido clorhídrico concentrado.
- C. Se agregó 1 ml de hidroxilamina.
- D. Se colocaron los frascos erlenmeyeres (3muestras + 1 blanco) en un plato de calentamiento y se hirvió hasta reducción del volumen, por debajo de 10 ml.
- E. Se transfirió la solución fría a un frasco volumétrico de 50 ml.
- F. Se aforó a 50 ml con agua tridestilada.
- G. Se transfirieron los 50 ml a un frasco erlenmeyer.
- H. Se agregó 15 ml de solución buffer acetato de amonio - ácido acético a cada frasco.
- I. Luego 2 ml de fenantrolina a cada frasco de reacción, se mezcló bien y se dejó desarrollar el color durante 15 minutos. Se hicieron lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 510 nm.

2.18 CALIBRACION Y MEDICION

La calibración es uno de los tópicos tratados en todos los programas sobre la gestión de calidad en los laboratorios, y constituye un conjunto de actividades en que los químicos analistas consumen gran parte de tiempo y esfuerzo dedicado al trabajo experimental.

La calibración es una actividad directamente relacionada con las características esenciales de los resultados experimentales y más concretamente con la exactitud. Sin embargo en la práctica muchos detalles suelen quedar al buen criterio del químico analista, constituyendo uno de los factores que más influye en la reproducibilidad de los procedimientos analíticos, y por ende de los resultados.

Calibración. Relación actual entre señal y concentración.

Para iniciar el proceso de calibración se supone que las operaciones de mantenimiento y ajuste ya han sido efectuados satisfactoriamente, es decir que el sistema analítico está en las condiciones correctas para dar resultados fiables.

El resultado de la calibración permite estimar los errores de los instrumentos o sistemas de medidas y modificar las marcas de las escalas.

El principal objetivo de la calibración es eliminar los errores sistemáticos, así la precisión puede ser la misma en un sistema calibrado o sin calibrar. Todas las etapas del proceso analítico, desde el muestreo hasta el último cálculo, deben estar calibrados para asegurar que la exactitud de los resultados y la dispersión de valores experimentales se encuentran dentro de los límites tolerados.

Para ganar seguridad en cuanto a las precisiones analíticas debemos tomar en cuenta las posibles fuentes de error en las mediciones espectrofotométricas, por ejemplo.

Diversos errores pueden afectar la precisión con que pueda ser medida la absorbancia. Estabilidad de las fuentes luminosas. Las celdas de absorción adecuadamente limpias y debe ser controlada su transmisión en el intervalo de longitud de onda a utilizar. Depósito invisibles al ojo puede afectar la transmisión de la celda.

2.19 PREPARACION DE LA CURVA DE CALIBRACION

Para construir una curva de calibrado útil para determinaciones cuantitativas en métodos espectrofotométricos debemos tomar en cuenta la longitud de onda de trabajo, teórica y experimental, seleccionada a través de lecturas de absorbancia en un barrido espectral. Luego realizamos mediciones de una serie de soluciones patrones del constituyente estudiado en un rango de concentraciones adecuado, se incluye el blanco, este debe ser idéntico a la muestra en todo, excepto en que no debe contener el constituyente que se va a determinar. A continuación, se tabula a manera de procedimiento el preparado para la curva de calibración (O-Fenantrolina - Fe^{2+})

	0 (Blanco)	1	2	3	4	5
Solucion patrón 10 mg Fe II/L (ml)	0	2	4	6	8	10
Agua Destilada (ml)	50	48	46	44	42	40
HCl conc. (ml)	2	2	2	2	2	2
Hidroxilamina (ml)	1	1	1	1	1	1
Volumen Total (ml)	53	53	53	53	53	53
Nota: Se calentaron todos los frascos, hasta 10 ml, aforando de nuevo a 50 ml.						
Volumen Final (ml)	50	50	50	50	50	50
Acetato de Amonio (buffer) (ml)	15	15	15	15	15	15
O-Fenantrolina (ml)	2	2	2	2	2	2
Concentración $\text{mgFe}^{2+}/\text{L}$	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2

Calibración del Espectrofotómetro PE Lambda 15.

Para determinar la longitud de onda a la cual deben de realizarse las mediciones para el método O-Fenantrolina se calibró primero el instrumento Perkin-Elmer-Lambda 15, con una solución de 40 ppm de Cromato de potasio en hidróxido de potasio 0.05 M. Ver Espectro en la Figura 7 con su correspondiente Error Relativo (Figura 8). Ver en Anexo los respectivos valores de absorbancia.

De acuerdo a la bibliografía 20, la solución de Cromato de potasio 40 ppm en KOH 0.05 M usada para la calibración del espectrofotómetro UV/V con arreglo de diodos presenta un pico de absorción en la región visible a una longitud de onda de 375 nm con absorbancia de 0.991.

El espectro obtenido experimentalmente, con una solución análoga pero medido en un espectrofotómetro UV/Vis, mostró un pico de absorción máxima a 371 nm con una absorbancia de 1.259, considerando por tanto estos valores como satisfactorios, por lo que podemos afirmar que el aparato se encuentra bien calibrado.

Error Relativo de Concentración (Cromato de Potasio). Se seleccionó la longitud de onda para el valor de absorbancia máximo evaluada en la calibración del equipo y registrada en la Figura 7. Se realizaron así 30 lecturas de absorbancia con la solución de cromato de potasio 40 ppm en KOH 0.05 M, medidos a 371 nm. Ver datos de absorbancia en Anexo.

Los 30 valores de absorbancia registrados fueron transformados a valores de %T, de los cuales se calculó la desviación estándar, éste valor multiplicado por dos se hace equivalente a ΔT , el que se sustituye en la ecuación $\Delta C/C = 0.434 \Delta T/T \log T$, se usan valores teóricos para T y Log T.

Se grafica en la Figura 8, el error relativo de concentración frente a valores de absorbancia.

La desviación estándar se calcula para evaluar la dispersión de las lecturas registradas por el equipo. De acuerdo a los cálculos se obtuvo un valor de desviación estándar igual a 0.021. En la Figura 8 se puede observar que en un rango aproximado de absorbancia entre 0.1 y 0.95 el error relativo es menor del 0.2%. A valores de absorbancia en los extremos de estos intervalos el porcentaje de error relativo aumenta.

El valor mínimo de error relativo se registra para un valor de absorbancia de 0.43. Las anteriores mediciones y evaluaciones nos llevan a la conclusión que el instrumento PE-Lambda 15 se encuentra en buenas condiciones para trabajar.

Método O-Fenantrolina-Fe²⁺

Antes de las mediciones de absorbancia para la curva de calibración O-Fenantrolina-Fe²⁺ realizamos un barrido espectral de nuestra solución patrón (0.8 ppm Fe²⁺) seleccionando un rango de 400 a 600 nm. El espectro presentó una meseta entre 506 y 512 nm. Ver Figura 9.

Este barrido espectral nos permitió seleccionar la longitud de onda de trabajo para el método O-Fenantrolina-Fe²⁺, 510 nm, confirmando así la longitud de onda que la literatura reporta, tomando en cuenta que nuestro procedimiento se registra entre los Métodos Oficiales AOAC (Método 937.03(1995)).

Error Relativo de Concentración (O-Fenantrolina - Fe²⁺)

También se evaluó el error relativo de concentración para la solución de 0.8 ppm O-Fenantrolina-Fe²⁺ considerando 30 lecturas de absorbancia a 510 nm. Así Figura 10, muestra el error relativo de concentración frente a la absorbancia .

La desviación estándar se calcula para evaluar la dispersión de las lecturas registradas por el equipo.

De acuerdo a los cálculos se obtuvo un valor de desviación estándar igual a 0.089. En Figura 10 se puede observar que en un rango aproximado de absorbancia entre 0.35 y 0.55 el error relativo es menor del 1%. A valores de absorbancia en los extremos de estos intervalos el porcentaje de error relativo aumenta.

El valor mínimo de error relativo se registra para un valor de absorbancia de 0.43. Las anteriores mediciones y evaluaciones nos llevan a concluir que el instrumento PE-Lambda15 se encuentra en buenas condiciones para trabajar. A continuación se tabulan los datos de absorbancia para las soluciones O-Fenantrolina-Fe²⁺ preparadas a 0.4, 0.6, 1.2, 1.6 y 2 mg de Fe²⁺/L (Curva de Calibración)

CURVA DE CALIBRACION (O-Fenantrolina - Fe²⁺)

Tubo No	0 (Blanco)	1	2	3	4	5
ppm	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
	0.041	0.103	0.164	0.229	0.290	0.356
	0.041	0.103	0.164	0.229	0.290	0.356
	0.042	0.104	0.163	0.230	0.289	0.356
	0.042	0.104	0.163	0.230	0.290	0.355
Abs. media	0.0415	0.1035	0.1635	0.2295	0.2898	0.3558
Desviación Estandar (S)	0.00058	0.00058	0.00058	0.00058	0.0008	0.0005

Haciendo uso de un análisis de regresión lineal se obtuvieron los siguientes datos:

a = 0.03915	(Intercepto)
b = 0.157725	(Pendiente)
r = 0.99987	(Coeficiente de Correlación)
r ² = 0.99974	(Coeficiente de Determinación)

En la Figura 11 se muestra la gráfica para los valores de absorbancia media de las soluciones patrones (O-Fenantrolina - Fe²⁺) en función de la concentración. Los valores de coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r²) muestra por ende un excelente procedimiento experimental para la preparación de la curva de calibración.

Límite de Detección del Método (LDM). Se define a partir de la más pequeña cantidad detectable por encima del ruido en un procedimiento y dentro de un límite declarado de aceptación. El valor LDM se calcula multiplicando la desviación estándar del blanco por 3.29 (LDM = 3.29 Sb)

Límite de Cuantificación (LDC). Se define como la concentración de componentes que produce una señal suficientemente mayor que el blanco. LDC = 10 Sb.

Límite de Cuantificación Práctica (LCP). El valor LCP equivale aproximadamente a cinco veces el valor LDM y representa un límite de detección práctico alcanzable de forma rutinaria con una certeza relativamente elevada de que los valores comunicados son fiables. LCP = 5LDM.

A continuación se tabulan los valores LDM, LDC y LCP. Primero sus unidades de absorbancia, los que luego se transforman a unidades de concentración haciendo uso de la ecuación de regresión lineal.

	LDM = 3.29 S _{blanco}	LDC = 10 S _{blanco}	LCP = 5LDM
Abs	3.29 (0.013228) 0.0435201	10 (0.013828) 0.13228	5(3.29)(0.0013828) 0.0095
ppm	0.0277072	0.590458	1.1314034

2.20 MEDICION DE LA MUESTRA PROBLEMA

Después de haber preparado una curva de calibración de hierro II por el método o-fenantrolina, se continuó con la medición de la absorbancia de la muestra problema (ver sección 2.15) a la longitud de onda ya seleccionada a través del barrido espectral.

A continuación, se tabulan los valores de absorbancia de la muestra - problema (Corteza de Bursera Simaruba) a una longitud de onda de 510 nm leído en el Espectrofotómetro Perkin-Lambda 15.

BLANCO	MUESTRA (REPETICIONES)		
0	1	2	3
0.039	0.259	0.251	0.255
0.039	0.260	0.250	0.256
0.039	0.260	0.250	0.256
0.039	0.259	0.250	0.256
0.041	0.259	0.250	0.256
Abs. med = 0.0394	Abs. med = 0.2594	Abs. med = 0.2502	Abs. med = 0.258
S = 8.9×10^{-4}	S = 5.5×10^{-4}	S = 4.5×10^{-4}	S = 4.5×10^{-4}

S = Desviación Estándar.

De la curva de calibración obtuvimos por regresión lineal el intercepto (a) y la pendiente (b), aplicamos la ecuación de la línea recta para determinar la concentración de hierro II en la muestra problema (Corteza del árbol Bursera Simaruba).

$y = a + bx$, donde y es igual a la absorbancia de la muestra problema y x representa la concentración, entonces $x = \frac{y - a}{b}$

$$x_1 = \frac{0.2594 - 0.03915}{0.157725} = 1.3964 \text{ ppm}$$

$$x_2 = \frac{0.2502 - 0.03915}{0.157725} = 1.3381 \text{ ppm}$$

$$x_3 = \frac{0.2558 - 0.03915}{0.157725} = 1.3736 \text{ ppm}$$

$$(x \text{ med} \pm \frac{t S}{\sqrt{n}}) = \text{Intervalo de Confianza}$$

$$X \text{ med} = 1.3694 \text{ ppm} = (x_1 + x_2 + x_3) / 3$$

S = 0.0293935 (Desviación Estándar)

n = 3 Repeticiones

Grados de libertad (n-1)

t Student = 4.30 (95% de nivel de confianza)

$$1.37 \pm \frac{4.30 (0.0293935)}{\sqrt{3}} = 1.37 \pm 0.07 \text{ ppm}$$

Tomando en cuenta el factor de dilución (F.d)

$$F.d = \frac{\text{Volumen Total (aforado)}}{\text{Volumen de Muestra}} \quad F.d = \frac{V_t}{V_M} = \frac{50 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} = 50$$

Entonces $1.3694 (50) = 68.47 \text{ ppm}$

$$68.47 \text{ mg Fe}^{2+} \text{ -- } 1000.0 \text{ ml}$$

$$x \quad \text{--} \quad 1 \text{ ml}$$

$$x = 0.06847 \text{ mg de Fe}^{2+} / 1 \text{ ml.}$$

Se sabe que se tomaron 6g de muestra-corteza, los que se llevaron a 50ml, siendo esta la solución madre, por tanto

$$\frac{6 \text{ gr}}{50 \text{ ml}} = \frac{0.12 \text{ gr}}{1 \text{ ml}}$$

Se sabe que se tomó 1ml de la solución problema, para preparar la solución según el método O-fenantrolina. Por tanto:

Si $0.06847 \text{ mg de Fe}^{2+}$ y 0.12 gr Corteza están contenidos en 1 ml.

Entonces,

$$0.06847 \text{ mg de Fe}^{2+} \text{ - } 0.12 \text{ gr}$$

$$x \quad \quad \quad 1 \text{ gr}$$

$$x = 0.570583 \text{ mg de Fe}^{2+} / 1 \text{ gr de corteza}$$

Tales cálculos nos llevan a que $0.57 \text{ mg de Fe}^{2+}$ están contenidos por cada gramo de corteza seca.

$$\left[0.57 \pm 0.03 \text{ mg Fe}^{2+} / \text{ gr de corteza seca} \right]$$

Expresando el anterior resultado en contenido porcentual, tenemos que existe un 0.06% de hierro en corteza seca. Por consulta bibliográfica del contenido medio de elementos químicos en las plantas, para la cual el contenido de hierro se reporta como del 0.02% , entonces sí podemos decir que hay una cantidad de hierro significativa en la especie *Bursera Simaruba*.

Figura 7.

Espectro de absorbancia en el rango de longitudes de onda 335-405 nm.
Perkin Elmer Lamda 15 Espectrofotómetro UV-Vis.

Para una solución de 40 ppm de Cromato de Potasio en Hidróxido de Potasio 0.05 M.

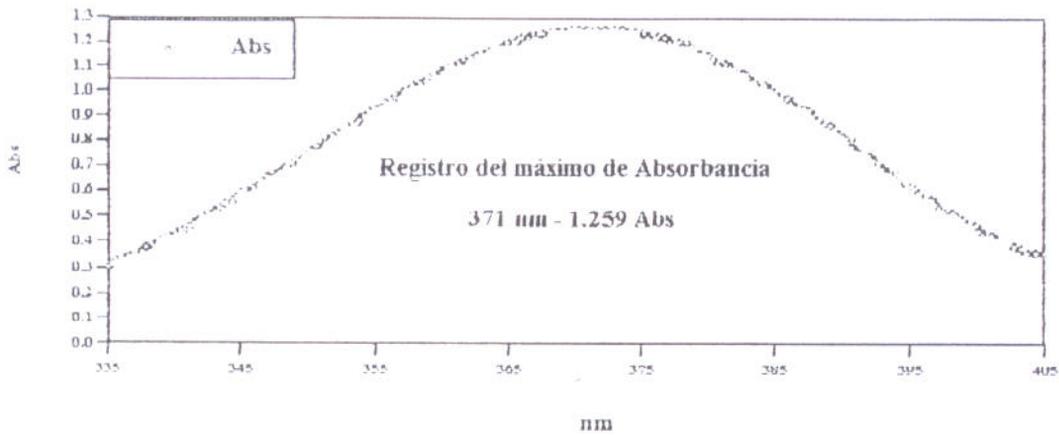


Figura 8.

Error relativo de concentración en función de la absorbancia, para 30 lecturas a 371 nm con una solución de 40 ppm de Cromato de Potasio en Hidróxido de Potasio 0.05 M.

Perkin Elmer Lamda 15 Espectrofotómetro UV-Vis.

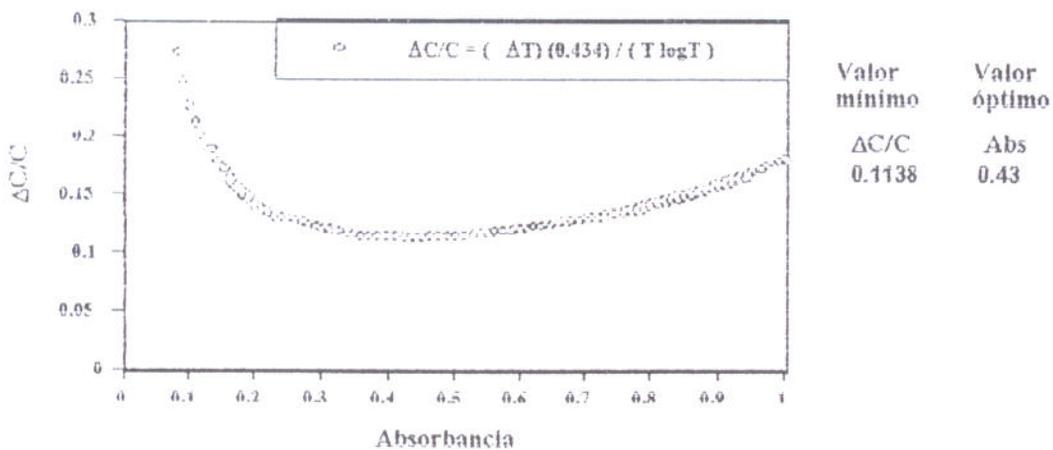


Figura 9.

Barrido Espectral de 400-600 nm
Solución estándar, 0.8 ppm de Hierro II
Método O-Fenantrolina.

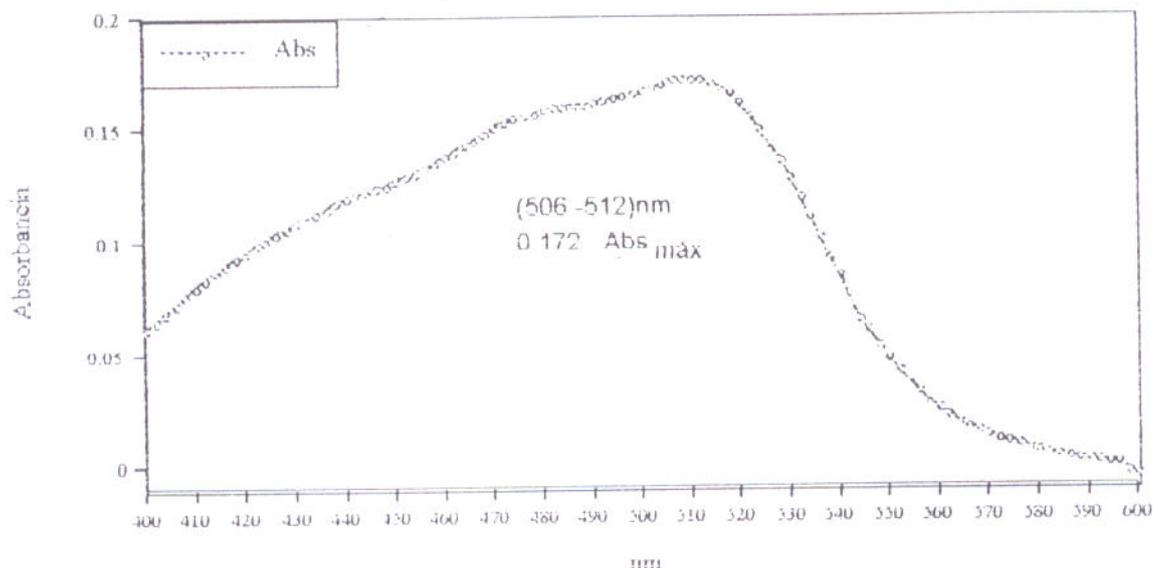


Figura 10.

Error Relativo de Concentración en función de la absorbancia para 30 lecturas a 510 nm con un solución 0.8 ppm Fe II (O-Fenantrolina).

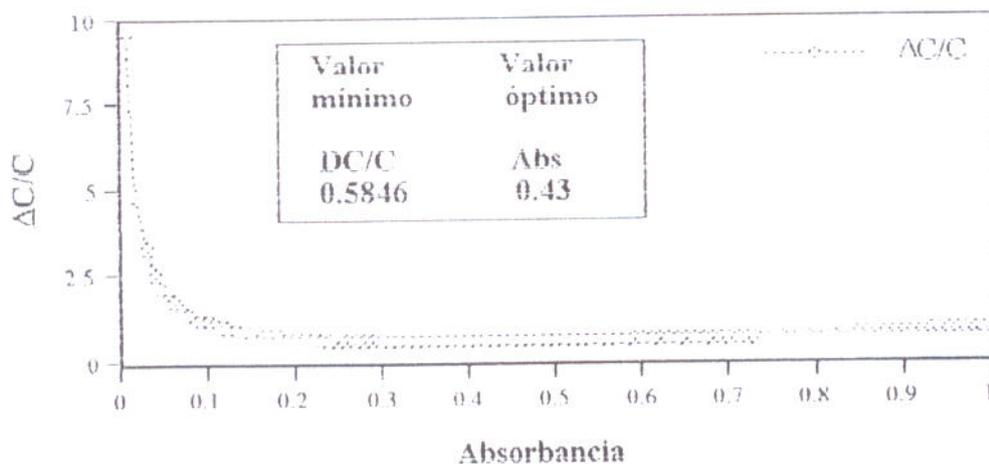
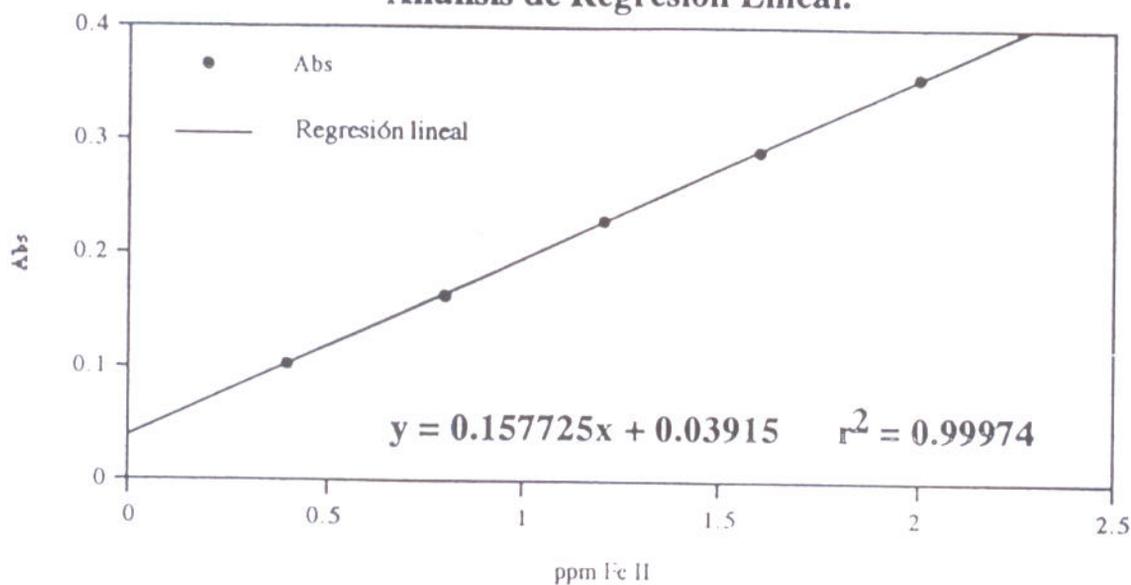


Figura 11

Curva de Calibración Normal.
Soluciones de Fe II - Método O-Fenantrolina.
Análisis de Regresión Lineal.



DATOS EXPERIMENTALES

ppm (Fe II)	Abs
0.4	0.1035
0.8	0.1635
1.2	0.2295
1.6	0.2898
2.0	0.3558

III. ANALISIS DE LOS RESULTADOS

3.1 ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUIMICA

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla I donde se incluye el método, procedimiento, cambios esperados y resultados para muestra y estandar. La presencia de Taninos resultó positiva, pues el precipitado obtenido resultó con el color descrito por el método del tricloruro férrico al 10% y el método de la gelatina-sal.

En cuanto al resultado de la prueba para Triterpenos fue interpretada como una detección negativa, ya que este metabolito se encuentra únicamente en la resina, otra prueba interpretada como negativa es la de los Glucosidos Cianogénicos debido a que este metabolito se encuentra en los frutos secos.

Así mismo los resultado para las demás pruebas de Alcaloides, Flavonoides, Saponinas, Cumarinas, Aceites volátiles Cardenolicos y Bufadienolico, Lactonas insaturadas y Antraquinonas se consideran negativas pues no cumplieron con los resultados esperados para la prueba que se les realizaron.

3.2 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD

Después de realizadas las diluciones de las muestras vegetales y haber preparado las condiciones para el ensayo de Artemia salina, se procedió a realizar lecturas a las 24 horas de exposición, de los nauplios sobrevivientes y nauplios no sobrevivientes.

Al evaluar la toxicidad del sulfato de cobre pentahidratado utilizado como patrón se obtuvo un 0% de nauplios sobrevivientes en todas las concentraciones ensayadas cumpliéndose así el parámetro de toxicidad (100% tóxico), de igual manera la solución blanco resultó en 0% de mortalidad, cumpliendo también con el rango establecido para este bioensayo : 0 a 5 % de mortalidad, lo que demuestra que el DMSO no es tóxico para las larvas a esas concentraciones.

Se utilizó el método REED-MUENCH para la tabulación de los resultados y la determinación gráfica del DL₅₀ a las 24 horas de exposición como umbral para determinar la actividad biológica de la especie vegetal. Para las fracciones obtenidas por cromatografía líquida de baja presión tenemos los siguientes resultados (Gráfico % de Mortalidad):

Fracción Hexano	DL ₅₀ 272.94 ppm.
Fracción Acetato de Etilo	DL ₅₀ 143.67 ppm. (mayor toxicidad)
Fracción Etanol	DL ₅₀ 291.82 ppm.
Fracción Agua	DL ₅₀ 260.85 ppm.
E.C.E (Soxhlet)	DL ₅₀ 227.15 ppm.

E.C.E = Extracto Crudo Etanólico.

3.3 ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE HIERRO

Para este procedimiento de trabajo aplicado a la muestra vegetal, corteza *Bursera simaruba*, se hicieron lecturas de absorbancias de tres alícuotas tomadas de la solución problema, preparada según metodología descrita, con el fin de determinar el contenido de hierro II.

Considerando los datos obtenidos de la regresión lineal (mínimos cuadrados) para la curva de calibración preparada con cinco puntos, se calculó la concentración de hierro en la muestra la que resultó en 137 ppm, este dato se encuentra dentro del rango de trabajo 0.4 a 2 ppm. Realizando cálculos finales se obtuvo un valor de 0.57 mg Fe²⁺ por cada gramo de corteza *Bursera simaruba*.

En la determinación de hierro por el método de O-fenantrolina asociado a la determinación de hierro en vegetales de la AOAC, se comprobó que los parámetros de eficiencia están científicamente regidos a las aplicaciones realizadas al método .

Esto se fundamenta en los resultados obtenidos como la precisión, obteniéndose repetibilidad en las lecturas de absorbancia de la muestra en días diferentes y usando 4 ml de o-fenantrolina.

Las muestras analizadas se obtuvieron de la corteza de jiñocuabo (*Bursera Simaruba*) luego de un tratamiento cuidadoso para extraer el hierro sin contaminar la muestra con reactivos inorgánicos que pudieran interferir en la determinación de este (digestión ácida).

IV. CONCLUSIONES

La marcha fitoquímica realizado a la corteza seca del árbol *Bursera simaruba*, haciendo uso de las reacciones de precipitación y coloración combinado con cromatografía de capa delgada, reveló la presencia únicamente de Taninos.

El material vegetal seco y molido de la corteza del árbol fue fraccionado por cromatografía de columna a baja presión (C.L.B.P.) usando solventes orgánicos de menor a mayor polaridad, las respectivas fracciones fueron concentradas haciendo uso del rotavapor a presión reducida, hasta sequedad, para posterior uso en el bioensayo de *Artemia salina*.

Las fracciones de hexano, acetato de etilo, etanólica y acuosa obtenidas por C.L.B.P. y la fracción del extracto crudo etanólico obtenido por soxhlet fueron sometidas al bioensayo de *Artemia salina* obteniéndose sus dosis letales DL₅₀ respectiva por método Reed-Muench (%Mortalidad).

Fracción de hexano	(C.L.B.P)	DL ₅₀	272.94 ppm.
Fracción de acetato de etilo	(C.L.B.P)	DL ₅₀	143.69 ppm.
Fracción etanólica	(C.L.B.P)	DL ₅₀	291.82 ppm.
Fracción vegetal acuosa	(C.L.B.P)	DL ₅₀	260.85 ppm.
E.C.E.	(Soxhlet)	DL ₅₀	227.15 ppm.

(E.C.E =Extracto Crudo Etanólico.)

En la determinación de hierro por el método de o-fenantrolina asociado a la determinación de hierro en vegetales por los métodos oficiales de AOAC (Método 937.03 (1995)), se comprobó que los parámetros de eficiencia están científicamente regidos a las aplicaciones realizadas al método.

Esto se fundamenta en los resultados obtenidos por la calibración del equipo, así como por la repetibilidad en las lecturas de absorbancia de las soluciones patrones y de la muestra.

El valor de concentración de hierro encontrada fue de 0.57 mgFe²⁺/gr de corteza (peso seco)..

V. RECOMENDACIONES

1. Para el Ensayo de *Artemia salina*, al realizar la siembra el analista debe tener cuidado en la lectura real de los 10 -15 nauplios vivos y traspaso nitido al plato de cultivo. Por tanto, se recomienda contar, nauplios vivos y muertos, una vez finalizado el periodo de exposición.

2. Realizar el ensayo de la *Artemia salina* tomando en cuenta los factores que pueden afectar la reproducibilidad de los resultados tales como:
 - a. Temperatura .
 - b. Preparación del agua de mar artificial
 - c. Tiempo de sembrado
 - d. pH del medio

3. Realizar un análisis cuantitativo riguroso en la determinación de hierro en la corteza *Bursera simaruba* (L.) Sargent, considerando el preparado acuoso etnobotánico reportado y considerando curvas de adición patrón.

4. Comparar el contenido de hierro para las diferentes partes de la especie *Bursera simaruba*.

5. Comparar el contenido de hierro de la corteza de la especie *Bursera simaruba* con *Cassia grandis* L.f (Carao); considerando que la pulpa de las vainas del Carao se cuece con leche para preparar una bebida estimulante y depurativa.

VI BIBLIOGRAFIA

1. **MAHABIR P.GUPTA.** Plantas Medicinales Iberoamericana. Edición CYTED-SECAB. 1^{era} Edición. Santafé de Bogotá, D.C.Colombia, 1995.
2. **MICHAEL FREEMANTLE.** Chemistry in action. First publisher, 1987.
3. **XORGE ALEJANDRO DOMINGUEZ.** Método de investigación fitoquímica. Editorial Limusa México / Buenos Aires. Monterrey, Nuevo León , México,1913.
4. **ZANDRA JIRON A.** Prácticas de Laboratorio Química de los Productos Naturales. UNAN-LEON. León, Nicaragua, 1997.
5. **Br NORLAN TERCERO BUCARDO.** Estudio Ecológico -Etnobotánico de nueve especies de plantas medicinales. Nicaragüense. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua -León. Facultad de ciencias. Departamento de Biología, trabajo de tesis. León, Nicaragua, 1997.
6. **BAUSCH Y LOMB.** Water Technology. Analytical systems división. Printed in USA, 1974.
7. **AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS .** Plants chapter 3, p.8-9. 3.3.07 AOAC Official Method 937.03. Iron in plants colorimetric method final action 1995.
8. **APHA -AWWA -WPCF.** Métodos normalizados para el analisis de agua potable y residuales. Edición DIAZ DE SANTOS ,S.A 1992.
9. **OLGA LOCK DE UGAZ.** Investigación fitoquímica. Segunda edición pontffica. Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial,1994.
10. **GESSNER G HAWLEY.** Diccionario de química y productos químicos. Edición Omega S.A. Barcelona España,1985.
11. **INGEBORG BERGER.** Tamizaje fitoquímico. Seminario Taller Mesoamericano. Metabolito de interés Nutricional en Plantas de la Región Mesoamericano Guatemala, Abril, 1999.
12. **VÁZQUEZ DOMINGO DE AGUSTIN.** Diccionario Oxford - Complutense. Biología. Editorial Complutense. Donoso Cortés, 63.3.28015. Madrid. Primera edición.1998.

13. **RUIZ TORRES.** Diccionario términos médicos, inglés -español. Séptima edición. Santa Fé de Bogotá Colombia, 1994.
14. **STEDMAN.** Diccionario de ciencias médicas ilustrados. Editorial Médica Panamericana. Edición Buenos Aires -Argentina , Junio 1997.
15. **JORGE D. PAMPLONA ROGER.** Doctor en Medicina y Cirugía. Enciclopedia de las plantas medicinales. Editorial Safeliz, S.L. Cuarta impresión de la primera edición. Aravaca, 8/28040 Madrid-España. Diciembre 1997.
16. **ANA, ARA.** Atención básica y usos de medicamentos esenciales. Edición Cuba 1993..
17. **SKOOG / WEST / HOLLER.** Química Analítica. Sexta Edición México Agosto 1999.
18. **SKOOG / LEARY.** Análisis Instrumental. Cuarta Edición Madrid 1994.
19. **KATHLEEN MORRISON.** Laboratorio Clínico y prueba de Diagnóstico. Editorial El Manual Moderno, S, A de C.V. México D.F.1998.
20. **DELGADO GUSTAVO, ZAPATA BENITO.** Capacitación en el manejo del espectrofotómetro UV/Vis con Arreglo de Diodos acoplados a una computadora 486. La Quisa/ Departamento de Química UNAN-León, Nicaragua (1994).
21. **B. YAGODIN, P. SMIRNOV, A. PETERBURGSKI.** Agroquímica. Impreso en la URRS. Editorial Mir, 1986.

VII. GLOSARIO

ANTISEPTICO: Prevención de la infección mediante la inhibición del crecimiento de los agentes infecciosos.

ANTICANCERIGENO: Denota un agente que suprime las manifestaciones de enfermedad cancerígena .

ANTIDOTO: Agente que neutraliza una toxina , o que contrarresta sus efectos.

ASTRINGENTE: Que causa contracción de los tejidos, detención de secreciones o control de una hemorragia.

BIOENSAYO: Ensayo en que se utiliza organismos vivos.

CITOTÓXICO: Dícese de la acción tóxica que una sustancia o agente ejerce sobre una especie de célula .

CITOSTATICA: Nombre dado a ciertas sustancias capaces de impedir, el crecimiento de células neoplásica o detener la evolución de tumores.

CARCINOSARCOMA: Tumor con elementos carcinomatosos y sarcomatosos.

ELUYENTE: Líquido usado en el proceso de elución.

ELUSIÓN ISOCRÁTICA: Se refiere a una fase móvil, cuya fortaleza de sol-vente, permanece constante durante todo el proceso de separación.

EPITELIO : Tejido de los animales vertebrados que consiste en células densamente agrupados, en una lámina, con poco material intercelular entre ellas.

ERITROCITOS : La célula más numerosa de la sangre, que contiene el pigmento rojo hemoglobina y que es responsable del transporte de oxígeno.

ESPASMOLITICO : Relativo a la espasmólisis. Antiespasmódico; agente químico que alivia los espasmos del músculo liso.

DL50: Es una expresión estadísticamente derivada de la dosis de un agente que puede esperarse produzca la muerte del 50% de la población después de un determinado período de exposición.

FUNGICIDA: Micocida; cualquier sustancia que tiene una acción letal sobre los hongos.

FERROPENICA: Dícese anemia ferropénica aquella que causa disminución del nivel de hierro en la sangre.

HEMATIES: Sustancia constitutiva de la hemoglobina.

IN VITRO: Locución latina que se emplea para describir un proceso biológico que tiene lugar fuera de un organismo vivo, normalmente en un aparato de laboratorio. El significado literal es en cristal, es decir, en un tubo de ensayo.

LIGANDOS POLIDENTADOS: Cuando un ligando puede unirse por unión metálica mediante más de un ligando, se dice que es polidentado.

METAMORFOSIS: Rápida transformación desde el estado de larva al estado adulto que se da en el ciclo vital de muchos invertebrados y anfibios.

NAUPLIOS: Larva con movimiento libre que se da en muchos crustáceos marinos o de aguas dulces. Tiene un cuerpo no segmentado, un único ojo en la región central (el ojo nauplios), mandíbulas, antenas y tres pares de patas.

NEUROSPORA: Género de hongos que crecen en cultivos y se usan en investigaciones de genéticas y bioquímica celular .

QUELATO: Tipo de compuesto de coordinación, en el cual el átomo central (generalmente un metal) se une por enlace covalente a uno o más átomos distintos de una o más moléculas distintas o iones (llamados ligandos), de modo que se forma un anillo heterocíclico con el átomo central (metal) como parte de cada anillo.

VASODILATADORA: Aumento del calibre vascular

**ANEXO I.
DATOS EXPERIMENTALES**

Registro de absorbancia en el rango de longitudes de onda 335-405 nm.

Perkin Elmer Lamda 15 Espectrofotómetro UV-Vis.

Para una solución de 40 ppm de Cromato de Potasio en Hidróxido de Potasio 0.05 M.

nm	Abs	nm	Abs	nm	Abs	nm	Abs
335	0.317	352.6	0.857	370.2	1.257	387.8	0.917
335.4	0.326	353	0.871	370.6	1.258	388.2	0.902
335.8	0.335	353.4	0.885	371	1.259	388.6	0.887
336.2	0.345	353.8	0.899	371.4	1.258	389	0.872
336.6	0.355	354.2	0.913	371.8	1.258	389.4	0.856
337	0.365	354.6	0.927	372.2	1.258	389.8	0.84
337.4	0.375	355	0.94	372.6	1.257	390.2	0.823
337.8	0.386	355.4	0.954	373	1.255	390.6	0.806
338.2	0.396	355.8	0.967	373.4	1.253	391	0.789
338.6	0.407	356.2	0.98	373.8	1.252	391.4	0.773
339	0.418	356.6	0.993	374.2	1.249	391.8	0.756
339.4	0.429	357	1.006	374.6	1.246	392.2	0.741
339.8	0.44	357.4	1.018	375	1.242	392.6	0.725
340.2	0.451	357.8	1.03	375.4	1.239	393	0.709
340.6	0.463	358.2	1.043	375.8	1.234	393.4	0.693
341	0.474	358.6	1.055	376.2	1.229	393.8	0.677
341.4	0.486	359	1.066	376.6	1.224	394.2	0.662
341.8	0.498	359.4	1.077	377	1.218	394.6	0.647
342.2	0.51	359.8	1.088	377.4	1.212	395	0.632
342.6	0.522	360.2	1.099	377.8	1.205	395.4	0.617
343	0.535	360.6	1.11	378.2	1.197	395.8	0.603
343.4	0.547	361	1.121	378.6	1.188	396.2	0.589
343.8	0.56	361.4	1.131	379	1.178	396.6	0.576
344.2	0.573	361.8	1.141	379.4	1.168	397	0.562
344.6	0.586	362.2	1.15	379.8	1.157	397.4	0.55
345	0.599	362.6	1.159	380.2	1.146	397.8	0.537
345.4	0.613	363	1.168	380.6	1.136	398.2	0.525
345.8	0.623	363.4	1.177	381	1.125	398.6	0.513
346.2	0.639	363.8	1.185	381.4	1.114	399	0.501
346.6	0.652	364.2	1.194	381.8	1.103	399.4	0.489
347	0.666	364.6	1.202	382.2	1.092	399.8	0.477
347.4	0.68	365	1.21	382.6	1.08	400.2	0.466
347.8	0.693	365.4	1.217	383	1.068	400.6	0.454
348.2	0.706	365.8	1.223	383.4	1.055	401	0.443
348.6	0.719	366.2	1.228	383.8	1.044	401.4	0.432

349	0.733	366.6	1.233	384.2	1.032	401.8	0.42
349.4	0.746	367	1.237	384.6	1.02	402.2	0.41
349.8	0.759	367.4	1.241	385	1.007	402.6	0.399
350.2	0.773	367.8	1.245	385.4	0.995	403	0.39
350.6	0.787	368.2	1.249	385.8	0.983	403.4	0.382
351	0.8	368.6	1.251	386.2	0.971	403.8	0.374
351.4	0.814	369	1.252	386.6	0.959	404.2	0.369
351.8	0.828	369.4	1.254	387	0.946	404.6	0.366
352.2	0.842	369.8	1.255	387.4	0.932	405	0.365

ANEXO 2.
DATOS EXPERIMENTALES
Error Fotométrico
Espectrofotómetro PERKIN-ELMER Lambda 14
Para una solución de 40 ppm de Cromato de Potasio en Hidróxido de Potasio 0.05 M.

	Abs (371 nm)	Abs (371 nm)	
1	1.243	16	1.244
2	1.243	17	1.245
3	1.242	18	1.244
4	1.244	19	1.245
5	1.245	20	1.244
6	1.245	21	1.245
7	1.245	22	1.245
8	1.243	23	1.245
9	1.238	24	1.245
10	1.244	25	1.244
11	1.244	26	1.244
12	1.242	27	1.245
13	1.245	28	1.246
14	1.246	29	1.245
15	1.246	30	1.246

ANEXO.3

DATOS EXPERIMENTALES

Lecturas de Absorbancia, barrido espectral de 400 - 600 nm.
Solución Estándar 0.8 ppm Fe II (Método -O-Fenantrolina).

nm	Abs	nm	Abs	nm	Abs	nm	Abs
600	0.004	548	0.054	498	0.165	448	0.125
598	0.003	546	0.061	496	0.164	446	0.124
596	0.001	544	0.066	494	0.163	444	0.122
594	0.001	542	0.076	492	0.162	442	0.121
592	0.002	540	0.085	490	0.161	440	0.119
590	0.003	538	0.093	488	0.160	438	0.117
588	0.003	536	0.102	486	0.16	436	0.115
586	0.004	534	0.111	484	0.159	434	0.113
584	0.005	532	0.119	482	0.159	432	0.111
582	0.006	530	0.128	480	0.158	430	0.109
580	0.007	528	0.136	478	0.157	428	0.106
578	0.008	526	0.143	476	0.156	426	0.104
576	0.010	524	0.150	474	0.155	424	0.101
574	0.011	522	0.156	472	0.153	422	0.099
572	0.012	520	0.161	470	0.151	420	0.095
570	0.014	518	0.165	468	0.148	418	0.093
568	0.016	516	0.168	466	0.145	416	0.090
566	0.018	514	0.170	464	0.143	414	0.087
564	0.020	512	0.172	462	0.140	412	0.083
562	0.023	510	0.172	460	0.138	410	0.080
560	0.026	508	0.172	458	0.135	408	0.076
558	0.029	506	0.172	456	0.133	406	0.073
556	0.033	504	0.169	454	0.130	404	0.069
554	0.038	502	0.168	452	0.129	402	0.065
552	0.043	500	0.166	450	0.127	400	0.062
550	0.048						

Anexo 4.

DATOS EXPERIMENTALES

Error Fotométrico

(Espectrofotómetro PERKIN-ELMER Lambda 14)

Solución Estándar 0.8 ppm Fe II, 510 nm.

	Abs		Abs
1	0.171	16	0.172
2	0.171	17	0.172
3	0.170	18	0.172
4	0.171	19	0.172
5	0.171	20	0.171
6	0.172	21	0.171
7	0.171	22	0.171
8	0.171	23	0.172
9	0.171	24	0.172
10	0.172	25	0.172
11	0.171	26	0.172
12	0.172	27	0.172
13	0.171	28	0.172
14	0.172	29	0.172
15	0.172	30	0.172

