

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y DE BIOACTIVIDAD DE LA  
ESPECIE *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. Ex Willd.**

**AYLIN VIVIANA SILVA ORTIZ 83040**

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS  
PROGRAMA DE QUÍMICA  
GRUPO QUIMICO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO AMBIENTAL  
(QIDEA)  
ARMENIA -QUINDÍO  
2011**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y DE BIOACTIVIDAD DE LA  
ESPECIE *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. Ex Willd.**

**AYLIN VIVIANA SILVA ORTIZ 83040**

**Director:**

**JORGE IVÁN SIERRA ACEVEDO**

**Químico U.Q.**

**M.Sc (C) Química Orgánica, especialidad Fitoquímica  
Docente Programa de Química**

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS  
PROGRAMA DE QUIMICA  
GRUPO QUIMICO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO AMBIENTAL  
(QIDEA)  
ARMENIA -QUINDÍO  
2011**

## DEDICATORIA

A Dios por sostenerme y guiarme en todos los días de mi vida, porque sin Él no sería quien soy ahora, porque su palabra es mi guía y la lumbrera de mi camino, “hubiera yo desmayado si no creyere que veré la bondad de Jehová en la tierra de los vivientes” salmo 27:13.

A mi madre porque su amor y su fuerza han llenado mi vida de esperanza, a ella le debo todo lo que soy, mil gracias por todos tus consejos, los llevo guardados en los más profundo de mi alma. Toda mi vida estaré orgullosa de ti.

A la memoria de mi abuelo que con su rectitud y honestidad me enseñó a vivir correctamente. Sé que te veré en la eternidad.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiar mi vida conforme a su voluntad, por ser quien me da de su sabiduría. “De nada sirve la inteligencia sin Dios, pues Él es quien da la victoria”. Proverbios 21:30-31

A mi madre Nelcy Ortiz Ospina, por darme la oportunidad de vivir y de formarme como profesional y como persona, por su amor y su apoyo incondicional que siempre me ha brindado, a pesar de las dificultades, por creer en mí cuando nadie más lo hizo.

A mi familia por todo su apoyo, a mis tías por todas las oraciones, las cuales fueron mi soporte y mi fortaleza en medio de la dificultad, a mis primos por todos los momentos vividos, las alegrías y tristezas compartidas, que nos han ayudado a crecer como personas.

A Jorge Iván Sierra Acevedo, mi director de proyecto de grado, por su paciencia y total entrega, por todos los conocimientos brindados para formarme como profesional y como persona.

A Hector Fabio Cortes Hernandez por todo su amor, paciencia, el apoyo brindado y por todos los buenos y malos momentos que compartimos juntos, gracias por enseñarme a tener fe en mí.

A mis amigos, que siempre estuvieron ahí a pesar de las dificultades, por compartirme un pedacito de sus vidas y por todas las alegrías y tristezas que juntos pasamos, porque me vieron crecer como persona y como profesional, Claudia Milena Salcedo, Paula Marcela Gómez Largo, Diana Carolina Herrera Forero, Leidy Marcela Aguiar Urriago, Nelson Alejandro Ladino Guapacha, Wilbert Daniel Díaz Prada, Sandra Marcela Gómez, Diego Fabián Rojas Reyes, Angie Mindy Marín Sánchez.

A mis compañeros de grupo de investigación y de estudio por brindarme su amistad. Al profesor Pedro Nel Martínez Yepes Director del laboratorio de Investigación de Química Industrial y Ambiental por su colaboración.

A los laboratorios de Análisis Instrumental, de Búsqueda de Principios Bioactivos, El grupo de Inmunología Molecular por su colaboración y servicios prestados.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron con el desarrollo de este proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	20
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. OBJETIVO GENERAL	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4. ANTECEDENTES	24
5. MARCO TEÓRICO	25
5.1. ASPECTOS GENERALES DE LA PLANTA	25
5.1.1. Nombres vulgares	25
5.1.2. Características generales	26
5.1.3. Clasificación científica	27
5.1.4. Usos comunes atribuidos popularmente	27
5.2. METABOLITOS SECUNDARIOS	27
5.2.1. Principales metabolitos secundarios	28
5.3. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (EUA).	32
5.4. DOSIS LETAL MEDIA DL50	33
5.4.1. Ensayo con <i>Artemia salina</i> .	33
5.4.2. Método de Probit.	33

5.5.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIFÚNGICA	34
5.5.1.	Actividad antimicrobiana	34
5.5.1.1.	Método de difusión en disco (Kirby-Bauer)	34
5.5.1.2.	Bacterias <i>Gram</i> negativas	34
5.5.1.3.	Bacterias <i>Gram</i> positivas	34
5.5.2.	Actividad antifúngica	35
5.6.	ACTIVIDAD ANTITUMORAL	36
5.6.1.	Ensayo con Resazurina o Alamarblue	36
5.7.	ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN VEGETALES	37
5.8.	SEPARACIÓN CUALITATIVA POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	38
5.9.	SEPARACIÓN CUANTITATIVA POR COLUMNA	38
5.10.	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA	38
5.10.1.	Espectroscopia Ultravioleta-Visible	39
5.10.2.	Espectroscopia Infrarroja	39
6.	METODOLOGÍA	40
6.1.	OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	40
6.2.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD	40
6.3.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANOLICO TOTAL	40
6.3.1.	Resumen del trabajo fitoquímica	41
6.3.2.	Pruebas fitoquímicas preliminares	41

6.4.	DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA DL50 POR MEDIO DE <i>ARTEMIA SALINA</i>	46
6.4.1.	Incubación de los huevos de <i>Artemia salina</i>	46
6.4.2.	Preparación de los extractos y adición de las larvas a los extractos	46
6.5.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIFÚNGICA	46
6.6.	DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS MADRE Y SUS FRACCIONES DE LAS HOJAS Y FLORES	48
6.7.	BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE <i>Solanum lycopersicum</i> Y <i>Lactuca sativa</i>	50
6.8.	SEPARACIÓN CUALITATIVA POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	51
6.9.	SEPARACIÓN CUANTITATIVA POR COLUMNA	51
6.10.	ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS	52
6.10.1.	Espectroscopia Infrarroja	52
6.10.2.	Espectroscopia Ultravioleta- Visible	52
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
7.1.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DEL MATERIAL VEGETAL	53
7.2.	PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS MADRE Y SUS FRACCIONES	53
7.2.1.	Extracto madre y fracciones de las hojas a los 5 minutos de extracción asistida por ultrasonido	55
7.2.2.	Extracto madre y fracciones de las hojas a los 10 minutos de extracción asistida por ultrasonido	56

7.2.3.	Extracto madre y fracciones de las hojas a los 15 minutos de extracción asistida por ultrasonido	57
7.2.4.	Extracto madre y fracciones de las flores a los 5 minutos de extracción asistida por ultrasonido	58
7.2.5.	Extracto madre y fracciones de las flores a los 10 minutos de extracción asistida por ultrasonido	59
7.2.6.	Extracto madre y fracciones de las flores a los 15 minutos de extracción asistida por ultrasonido	60
7.3.	DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA DL50 DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS MADRE Y SUS FRACCIONES DE HOJAS Y FLORES	62
7.4.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS MADRE DE LAS FLORES Y LAS HOJAS	78
7.5.	DETERMINACION DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS MADRES Y SUS FRACCIONES	80
7.5.1.	Células BHK	80
7.5.2.	Células Mieloma Murino	89
7.6.	BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE <i>Solanum lycopersicum</i> Y <i>Lactuca sativa</i>	98
7.6.1.	Semillas de tomate <i>Solanum lycopersicum</i>	98
7.6.2.	Semillas de lechuga <i>Lactuca sativa</i>	105
7.7.	SEPARACION DE UN COMPUESTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO MADRE DE LAS HOJAS	112
7.7.1.	Cromatografía en capa fina	112



7.7.2. Cromatografía en capa fina bidimensional	113
7.7.3. Cromatografía en columna	114
8. CONCLUSIONES	122
9. RECOMENDACIONES	124
BIBLIOGRAFÍA	125
ANEXOS	131

## LISTA DE TABLAS

		Pag.
<b>Tabla 1</b>	Clasificación taxonómica realizada por el herbario de la Universidad Nacional.	27
<b>Tabla 2</b>	Escala de Mc Farland.	47
<b>Tabla 3</b>	Distribución en microlitros por pozo de los extractos etanólicos madre y fracciones a evaluar en células BHK y Mieloma murino.	49
<b>Tabla 4</b>	Contenido de humedad de las hojas y flores de Iresine Difussa Humb & Bonpl. Ex Willd	53
<b>Tabla 5</b>	Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto etanólico madre y sus fracciones de las hojas con 5 minutos de extracción asistida por ultrasonido.	55
<b>Tabla 6</b>	Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto etanólico madre y sus fracciones de las hojas con 10 minutos de extracción asistida por ultrasonido.	56
<b>Tabla 7</b>	Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto etanólico madre y sus fracciones de las hojas con 15 minutos de extracción asistida por ultrasonido.	57
<b>Tabla 8</b>	Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto etanólico madre y sus fracciones de las flores con 5 minutos de extracción asistida por ultrasonido.	58
<b>Tabla 9</b>	Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto etanólico madre y sus fracciones de las flores con 10 minutos de extracción asistida por ultrasonido.	59
<b>Tabla 10</b>	Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto etanólico madre y sus fracciones de las flores con 15 minutos de extracción asistida por ultrasonido.	60
<b>Tabla 11</b>	Prueba preliminar de heterosidos cianogenéticos del extracto etanólico madre de las hojas y las flores con 10 minutos de extracción asistida por ultrasonido.	62
<b>Tabla 12</b>	Lectura de nauplius muertos para el ensayo de DL50 con el blanco tween 80 al 0,5%	62
<b>Tabla 13</b>	Lectura de nauplios muertos para la determinación de la DL50 en el extracto etanólico madre proveniente de las hojas.	63

<b>Tabla 14</b>	Análisis Probit para determinar la DL50 del extracto etanólico madre de las hojas a las 48 horas de ensayo.	63
<b>Tabla 15</b>	Lectura de nauplios muertos para la determinación de la DL50 en la fracción de hexano proveniente de las hojas.	65
<b>Tabla 16</b>	Análisis Probit para determinar la DL50 de la fracción de hexano de las hojas a las 48 horas de ensayo.	65
<b>Tabla 17</b>	Lectura de nauplios muertos para la determinación de la DL50 en la fracción de diclorometano proveniente de las hojas.	67
<b>Tabla 18</b>	Análisis Probit para determinar la DL50 de la fracción de diclorometano de las hojas a las 48 horas de ensayo.	67
<b>Tabla 19</b>	Lectura de nauplios muertos para determinación de la DL50 en la fracción de butanol proveniente de las hojas.	69
<b>Tabla 20</b>	Lectura de nauplios muertos para determinar la DL50 en la fracción de acetato de etilo proveniente de las hojas.	69
<b>Tabla 21</b>	Análisis Probit para determinar la DL50 de la fracción de acetato de etilo de las hojas a las 48 horas de ensayo.	69
<b>Tabla 22</b>	Lectura de nauplios muertos para determinar la DL50 en el residuo proveniente de las hojas.	70
<b>Tabla 23</b>	Lectura de nauplios muertos para determinar la DL50 en el extracto madre proveniente de las flores.	71
<b>Tabla 24</b>	Análisis Probit para determinar la DL50 del extracto madre de las flores a las 48 horas de ensayo.	71
<b>Tabla 25</b>	Lectura de nauplios muertos para determinar la DL50 en la fracción de hexano proveniente de las flores.	72
<b>Tabla 26</b>	Análisis Probit para determinar la DL50 de la fracción de hexano de las flores a las 48 horas de ensayo.	73
<b>Tabla 27</b>	Lectura de nauplios muertos para determinar la DL50 en la fracción de diclorometano proveniente de las flores.	74
<b>Tabla 28</b>	Lectura de nauplios muertos para determinar la DL50 en la fracción de butanol proveniente de las flores.	75
<b>Tabla 29</b>	Lectura de nauplios muertos para determinar la DL50 en la fracción de acetato de etilo proveniente de las flores.	75
<b>Tabla 30</b>	Análisis probit de la fracción de acetato de etilo de las flores a las 48 horas	76
<b>Tabla 31</b>	Lectura de nauplios muertos para determinar la DL50 en el residuo proveniente flores.	77
<b>Tabla 32</b>	Análisis Probit para determinar la DL50 del residuo de las flores a las 48 horas de ensayo.	77

<b>Tabla 33</b>	Diámetros de los halos de inhibición de los extractos etanolicos madre de hojas y flores por el método de punción de agar.	78
<b>Tabla 34</b>	Determinación de la densidad óptica para las células de BHK a 570 nm del extracto etanolico total y sus fracciones para las hojas de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	81
<b>Tabla 35</b>	Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de BHK a 570 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas.	82
<b>Tabla 36</b>	Determinación de la densidad óptica para las células de BHK a 630 nm del extracto etanolico total y sus fracciones para las hojas de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	83
<b>Tabla 37</b>	Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de BHK a 630 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas.	84
<b>Tabla 38</b>	Determinación de la densidad óptica para las células de BHK a 570 nm del extracto etanolico total y sus fracciones para las flores de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	85
<b>Tabla 39</b>	Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de BHK a 570 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las flores	86
<b>Tabla 40</b>	Determinación de la densidad óptica para las células de BHK a 630 nm del extracto etanolico total y sus fracciones para las flores de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	87
<b>Tabla 41</b>	Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de BHK a 630 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las flores	88
<b>Tabla 42</b>	Determinación de la densidad óptica para las células de Mieloma murino a 570 nm del extracto etanolico total y sus fracciones para las hojas de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	90
<b>Tabla 43</b>	Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de Mieloma murino a 570 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas.	91
<b>Tabla 44</b>	Determinación de la densidad óptica para las células de Mieloma murino a 630 nm del extracto etanolico total y sus fracciones para las hojas de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	92
<b>Tabla 45</b>	Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de Mieloma murino a 630 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas.	93

<b>Tabla 46</b>	Determinación de la densidad óptica para las células de Mieloma murino a 570 nm del extracto etanolico total y sus fracciones para las flores de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	94
<b>Tabla 47</b>	Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de Mieloma murino a 570 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las flores.	95
<b>Tabla 48</b>	Determinación de la densidad óptica para las células de Mieloma murino a 630 nm del extracto etanolico total y sus fracciones para las flores de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	95
<b>Tabla 49</b>	Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de Mieloma murino a 630 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las flores.	96
<b>Tabla 50</b>	Resultados para el control negativo en el ensayo del % inhibición en el crecimiento de las raíces de semillas de tomate.	97
<b>Tabla 51</b>	Lectura del crecimiento de las raíces de las semillas de tomate frente al extracto etanólico total de las hojas.	99
<b>Tabla 52</b>	Determinación del % de inhibición del crecimiento de las raíces de las semillas de tomate frente al extracto etanólico total de las hojas.	100
<b>Tabla 53</b>	Análisis Probit para el % de inhibición del crecimiento de las raíces de tomate frente al extracto etanólico total de las hojas.	101
<b>Tabla 54</b>	Lectura del crecimiento de las raíces de las semillas de tomate frente al extracto etanólico total de las flores.	102
<b>Tabla 55</b>	Determinación del % de inhibición del crecimiento de las raíces de las semillas de tomate frente al extracto etanólico total de las flores.	103
<b>Tabla 56</b>	Análisis Probit para el % de inhibición del crecimiento de las raíces de tomate frente al extracto etanólico total de las flores.	104
<b>Tabla 57</b>	Resultados para el control negativo en el ensayo del % inhibición en el crecimiento de las raíces de semillas de lechuga.	105
<b>Tabla 58</b>	Lectura del crecimiento de las raíces de las semillas de lechuga frente al extracto etanólico total de las hojas.	106
<b>Tabla 59</b>	Determinación del % de inhibición del crecimiento de las raíces de las semillas de lechuga frente al extracto etanólico total de las hojas.	107

<b>Tabla 60</b>	Análisis Probit para el % de inhibición del crecimiento de las raíces de lechuga frente al extracto etanólico total de las hojas.	108
<b>Tabla 61</b>	Lectura del crecimiento de las raíces de las semillas de lechuga frente al extracto etanólico total de las flores.	109
<b>Tabla 62</b>	Determinación del % de inhibición del crecimiento de las raíces de las semillas de lechuga frente al extracto etanólico total de las flores.	110
<b>Tabla 63</b>	Análisis Probit para el % de inhibición del crecimiento de las raíces de lechuga frente al extracto etanólico total de las flores.	111
<b>Tabla 64</b>	Solventes utilizados para cromatografía en capa delgada para la separación de un compuesto del extracto etanólico total de las hojas de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	112
<b>Tabla 65</b>	Índice de polaridad para cada uno de los solventes utilizados para la separación por cromatografía de columna de un compuesto del extracto etanólico total de las hojas de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	114
<b>Tabla 66</b>	Pruebas fitoquímicas preliminares realizadas a las fracciones obtenidas de la separación por cromatografía en columna.	115
<b>Tabla 67</b>	Resultados de espectro infrarrojo de la fracción I.d.MeOH Col. 5 obtenida con metanol de la separación por cromatografía en columna.	116
<b>Tabla 68</b>	Resultados del espectro infrarrojo de la fracción I.d. E.ético. Col 1 obtenida con éter étílico de la separación por cromatografía en columna.	120

## LISTA DE FIGURAS

		Pag
<b>Figura 1</b>	<i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	25
<b>Figura 2</b>	Ficha técnica de clasificación enviada al Herbario Universidad Nacional de Colombia.	25
<b>Figura 3</b>	Disposición de las hojas de la <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	26
<b>Figura 4</b>	Flores de la <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	27
<b>Figura 5</b>	<i>Artemia Salina</i> del phylum artrópoda	33
<b>Figura 6</b>	Morfología de la semilla y plántula de <i>Lactuca sativa</i> .	37
<b>Figura 7</b>	Equipo de ultrasonido utilizado para obtención de los extractos etanolicos madre de las hojas y flores de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	41
<b>Figura 8</b>	Distribución de las punciones realizadas sobre el agar según el método de orificios o pocillos.	48
<b>Figura 9</b>	Espectrofotómetro UV-Vis Marca Milton Roy Modelo Spectronic Genesis serie 5 del Centro Investigaciones Biomédicas Universidad del Quindío	49
<b>Figura 10</b>	Semillas de <i>Solanum lycopersicum</i> y <i>Lactuca sativa</i> .	50
<b>Figura 11</b>	Columna cromatografica utilizada para separación de metabolitos secundarios del extracto etanólico total de las hojas de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	52
<b>Figura 12</b>	Equipo de infrarrojo utilizado para identificación de metabolitos secundarios del extracto etanólico total de las hojas de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	52
<b>Figura 13</b>	Equipo de Ultravioleta utilizado para identificación de metabolitos secundarios del extracto etanólico total de las hojas de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	52
<b>Figura 14</b>	Prueba de hemolisis positiva para el extracto etanólico total de las hojas de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd.	61
<b>Figura 16</b>	Actividad antimicótica de los extractos etanolicos madre de hojas y flores empleando el método de punción en agar con <i>Candida albicans</i> . Los halos de inhibición observados corresponden al control positivo (fluconazol 10.000 ppm).	79
<b>Figura 17</b>	Actividad antimicrobiana de los extractos etanolicos madre de hojas y flores empleando el método de punción en agar con <i>Escherichia coli</i> . Los halos de inhibición observados corresponden al control positivo (ciprofloxacina 10.000 ppm)	79

<b>Figura 18</b>	Actividad antimicrobiana de los extractos etanolicos madre de hojas y flores empleando el método de punción en agar con <i>Staphylococcus aureus</i> . Los halos de inhibición observados corresponden al control positivo (ampicilina 5.000 ppm).	79
<b>Figura 19</b>	Células de BHK formando monocapa al iniciar el ensayo de citotoxicidad.	80
<b>Figura 20</b>	Cambio de coloración de la resazurina de azul a rosa causado por las células viables de BHK.	80
<b>Figura 21</b>	Células de BHK antes y después del ensayo con los extractos etanólicos totales y sus fracciones.	80
<b>Figura 22</b>	Células de Mieloma Murino formando monocapa antes de iniciar el ensayo de citotoxicidad.	89
<b>Figura 23</b>	Cambio de coloración de la resazurina de azul a rosa causado por las células viables de Mieloma murino.	89
<b>Figura 24</b>	Células de Mieloma murino antes y después del ensayo con los extractos etanólicos totales y sus fracciones.	89
<b>Figura 25</b>	Semillas de tomate observadas a a 1000 ppm y 5 ppm después del ensayo.	97
<b>Figura 26</b>	Semillas de lechuga observadas a 1000 ppm y 5 ppm después del ensayo.	105
<b>Figura 27</b>	Cromatografía del extracto etanolic madre de las hojas con cloroformo- hexano-acetato de etilo (4:2:0,5) como eluyente, aspersado con vainillina.	113
<b>Figura 28</b>	Cromatografía del extracto etanolic madre de las hojas con cloroformo- hexano-acetato de etilo (4:2:0,5) como eluyente (Lámpara ultravioleta 254 nm).	113
<b>Figura 29</b>	Cromatografía bidimensional del extracto etanolic madre hojas.	113
<b>Figura 30</b>	Cromatografía bidimensional del extracto etanolic madre hojas aspersado con vainillina.	114
<b>Figura 31</b>	Espectro infrarrojo de la fracción I.d. MeOH Col. 5. obtenida con metanol de la separación por cromatografía de columna.	116
<b>Figura 32</b>	Figura.32. Espectro ultravioleta de la fracción I.d. MeOH Col. 5 obtenida con metanol de la separación por cromatografía de columna.	118
<b>Figura 33</b>	Anillo característico de los glicosidos cardiotónicos de tipo pentadienolido	118
<b>Figura 34</b>	Anillo característico de Ciclopentanoperhidrofenantreno de tipo de $\Delta^{3-4,5-6,7-8,9-11}$ -3-hidroxiandrostatrieno	119



<b>Figura 35</b>	Espectro infrarrojo de la fracción I.d. E.etílico. Col 1. obtenido con éter etílico de la separación por cromatografía de columna.	119
<b>Figura 36</b>	Espectro infrarrojo de la fracción I.d. E.etílico. Col 1 obtenida con metanol de la separación por cromatografía de columna.	121
<b>Figura 37</b>	Resultados de la prueba Rosenthaler para la fracción I.d. E.etílico. Col 1 positiva para sapogeninas esteroidales o triterpenoideas.	121

### LISTA DE ESQUEMAS

		<b>Pag.</b>
Esquema 1	Proceso de fraccionamiento con solventes de distintas polaridades.	41

## LISTA DE GRAFICAS

	Pag .
<b>Grafica 1</b>	64
Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración del extracto etanólico total de las hojas de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluacion.	
<b>Grafica 2</b>	66
Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración de la fraccion obtenida con hexano de las hojas de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluacion.	
<b>Grafica 3</b>	68
Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración de la fraccion obtenida con diclorometano de las hojas de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluacion.	
<b>Grafica 4</b>	70
Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración de la fraccion obtenida con acetato de etilo de las hojas de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluacion.	
<b>Grafica 5</b>	72
Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración del extracto etanólico total de las flores de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluacion.	
<b>Grafica 6</b>	74
Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración de la fraccion obtenida con hexano de las flores de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluacion.	
<b>Grafica 7</b>	76
Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración de la fraccion obtenida con acetato de etilo de las flores de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluacion.	
<b>Grafica 8</b>	78
Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración el residuo de las flores de <i>Iresine Difussa</i> Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluación.	
<b>Grafica 9</b>	82
Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de BHK a 570 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas.	
<b>Grafica 10</b>	84
Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de BHK a 630 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas.	

<b>Grafica 11</b>	Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de BHK a 570 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las flores.	86
<b>Grafica 12</b>	Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de BHK a 630 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las flores.	88
<b>Grafica 13</b>	Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de Mieloma murino a 570 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas.	91
<b>Grafica 14</b>	Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de mieloma murino a 630 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas.	93
<b>Grafica 15</b>	Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de Mieloma murino a 570 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las flores.	95
<b>Grafica 16</b>	Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de mieloma murino a 630 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las flores.	97
<b>Grafica 17</b>	Concentración en ppm Vs % inhibición del extracto etanolico madre hojas en semillas de tomate.	100
<b>Grafica 18</b>	Relación del porcentaje de inhibición del crecimiento de las semillas de tomate versus la concentración del extracto etanólico total de las hojas a los 5 días de ensayo.	101
<b>Grafica 19</b>	Concentración en ppm Vs % inhibición del extracto etanolico madre flores en semillas de tomate.	103
<b>Grafica 20</b>	Relación del porcentaje de inhibición del crecimiento de las semillas de tomate versus la concentración del extracto etanólico total de las flores a los 5 días de ensayo.	104
<b>Grafica 21</b>	Concentración en ppm Vs % inhibición del extracto etanolico madre hojas en semillas de lechuga.	107
<b>Grafica 22</b>	Relación del porcentaje de inhibición del crecimiento de las semillas de lechuga versus la concentración del extracto etanólico total de las hojas a los 5 días de ensayo.	108
<b>Grafica 23</b>	Concentración en ppm Vs % inhibición del extracto etanolico madre flores en semillas de lechuga.	110
<b>Grafica 24</b>	Relación del porcentaje de inhibición del crecimiento de las semillas de lechuga versus la concentración del extracto etanólico total de las flores a los 5 días de ensayo.	111

## INTRODUCCION

Colombia es un país biodiverso con gran cantidad de especies vegetales, de las cuales en los herbarios se han clasificado más de 130.000 plantas, las cuales poseen una amplia gama de compuestos orgánicos con actividad biológica, haciéndolas una de las principales fuentes de productos biológicamente activos <sup>(1)</sup>.

Estos productos son el resultado de una serie de procesos bioquímicos y metabólicos que entre otros permiten la viabilidad de las plantas, con respecto a su entorno. Este conjunto de reacciones químicas constituyen su metabolismo. Las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa de procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos y que se denominan metabolitos secundarios, dicho metabolismo conduce a la formación de productos naturales. Estos son diferentes de una planta a otra, pero algunos metabolitos secundarios son comunes en una familia o entre familias de plantas.

La fitoquímica es un área de la química que busca encontrar los componentes activos presentes en las plantas, con el fin de aportarle a la salud humana resultados favorables, para mejorar la calidad de vida. Las drogas vegetales se obtienen de plantas medicinales que pueden ser silvestres (crecen espontáneamente) o cultivadas (controlando el proceso de producción) <sup>(2)</sup>.

En el Quindío, (un departamento con un alto porcentaje no clasificado y no estudiado de plantas) se han encontrado especies del genero *Iresine* (distribución limitada a nivel mundial), localizada en determinadas regiones de nuestro país. Es considerada como maleza del café, cuyo principal uso etnobotánico es alimento para el ganado cuando el forraje escasea y en medicina popular es usada para curar enfermedades de los riñones. En México, se utilizaba contra la fiebre tifoidea, el cáncer de próstata, tos, entre otros <sup>(3)</sup>. Como *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd, es una planta poco estudiada, no se conoce su grado de toxicidad ni su posible potencial como producto natural para uso medicinal. Debido a esto surge la necesidad de determinar su toxicidad, capacidad antimicrobiana, antifúngica, efecto citotóxico en células de BHK y Mieloma murino y efecto alelopático frente a otras plantas.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de las enfermedades hace que las investigaciones planteen nuevas síntesis de compuestos que inactiven las reacciones desfavorables del organismo.

Nuestro país y, en especial el departamento del Quindío ostenta una gran biodiversidad debido a la variedad de climas, el cual posee plantas que han sido muy poco estudiadas, bajo este principio encontramos la especie *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd, la cual tiene según la tradición popular aplicaciones en las infecciones que atacan los riñones y el sistema respiratorio, sin saber aun cuales son los posibles compuestos que ayudan para tal efecto.

A lo anterior expuesto, formulamos la siguiente pregunta:

¿Qué característica fitoquímica y actividad antifúngica, antimicrobiana y antitumoral poseen los extractos obtenidos de la especie *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd?

## 2. JUSTIFICACION

En el reino vegetal se producen una serie de sustancias producto de su metabolismo secundario, algunas de estas son las responsables del color, sabor, olor de flores y frutos. Las investigaciones han demostrado que la mayoría de los compuestos son los encargados del mecanismo de defensa de las plantas, lo cual ha generado una gama de usos y aplicaciones en la agricultura (alelopatía) y en la medicina.

La fitoquímica es la rama de la química que estudia los metabolitos secundarios, y enseña como aislar e identificar los principales compuestos con actividad biológica, como es el caso de las plantas medicinales, esta se interesa por el conocimiento de la historia, el comercio, la producción, la distribución y geografía, la botánica, el cultivo, recolección, selección, preparación, identificación y evolución de todo tipo de métodos que permitan la producción de fármacos a base de productos naturales que mejoren la salud del hombre. Uno de los puntos más importantes en el conocimiento de las moléculas implicadas con la actividad biológica de las plantas es la determinación de su estructura y de su comportamiento, esto permite conocer la naturaleza de los compuestos y así poder determinar el mejor método de extracción de estos.

El potencial que presentan los metabolitos secundarios, ha dirigido el estudio de estos no solo a la elucidación y evaluación de sus estructuras, sino también a su actividad biológica mediante bioensayos, con diferentes extractos, los cuales han demostrado su eficacia por el sinergismo, aumentando el efecto benéfico a la salud.

Debido a lo dicho anteriormente nace el interés de estudiar la especie *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd, perteneciente a la familia Amaranthaceae, a la cual se le han atribuido varias propiedades medicinales contra diferentes enfermedades, pero que realmente aun no se han estudiado sus posibles aplicaciones en el campo de la medicina. Por lo tanto el principal objetivo es realizar el estudio fitoquímico preliminar de la *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd, determinando el grado de toxicidad que esta presenta, aportándole a la investigación una mirada general del posible uso que se le puede dar a esta planta.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio fitoquímico y la actividad biológica de los extractos provenientes de las hojas y flores de *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd de la familia AMARANTHACEAE.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Realizar marcha fitoquímica preliminar de los diferentes extractos de la especie *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd.
- Efectuar pruebas de bioactividad con *Artemia salina* para determinar la dosis letal media DL50.
- Evaluar la actividad antimicrobiana y antifúngica de los extractos etanólicos madres de las hojas y de las flores de *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd.
- Llevar a cabo los ensayos de actividad antitumoral con células de Mieloma murino y comparar los resultados con células sanas de BHK.
- Determinar la citotoxicidad de los extractos etanólicos madres de las hojas y las flores con semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) y lechuga (*Lactuca sativa*).
- Identificar de manera preliminar el compuesto que se encuentre en mayor proporción en los extractos etanólicos obtenidos de las hojas de *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd, por medio de la implementación de cromatografía en capa fina, de columna y métodos espectroscópicos IR y UV-Vis .

#### 4. ANTECEDENTES

Las plantas de la familia Amaranthaceae llaman la atención de los investigadores no solo por su gran variedad botánica y distribución limitada a nivel mundial, sino también por que crecen en suelos yesosos, áridos y semiáridos lo cual las hace un poco más resistentes a ambientes con condiciones severas<sup>(4)</sup>.

La Universidad de Hong-Kong en el año 2001, el Departamento de Botánica y Departamento de Zoología, determinó que las plantas Amaranthaceas presentaban actividad antioxidante debido a que contienen betalaínas. Para el año 2003 esta actividad antioxidante fue evaluada mediante la modificación del método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil); en donde todas las pruebas realizadas con las betalaínas presentaron una actividad antioxidante fuerte aún más potente que el ácido ascórbico y la catequina (flavanol) <sup>(5)</sup>.

En la Universidad Nacional Autónoma de México se han llevado a cabo varios estudios acerca de la genero *Iresine* donde destacan:

En el año 2005, la doctora María Yolanda Ríos se cita el uso medicinal que le atribuían los indígenas Mayas y Chiapas a la *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd, los cuales la utilizaban contra la malaria, el cáncer de próstata, contra la fiebre tifoidea, beneficiaba los riñones, entre otros <sup>(6)</sup>.

En el año 1953 se llevó a cabo el aislamiento de un nuevo sesquiterpeno tricíclico a partir de la planta mexicana llamada *Iresine celosoides* en donde se determinó que el compuesto posee en su estructura varios átomos de oxígeno de los cuales dos se encuentran como grupos hidroxilo fácilmente acilables mientras que los demás átomos de oxígeno están incorporados en un anillo  $\alpha,\beta$ - insaturado de una lactona de 5 miembros, el compuesto fue llamado Iresine debido a que provenía de este genero. Como una contribución a esta misma investigación en el año 1957 se realizó un estudio acerca de la ubicación de los grupos hidroxilos que contiene el sesquiterpeno tricíclico llamado Iresine por medio de diferentes reacciones realizadas al sistema glicol <sup>(7)</sup>. Dos años más tarde en 1958 a partir de la misma planta se realizó una investigación sobre la extracción, el aislamiento, la purificación y elucidación de una isoflavona llamada "tlatlancuayin" nombre que le daban los indígenas a la planta, utilizando métodos de degradación para determinar la mejor estructura <sup>(8)</sup>.



## 5. FUNDAMENTO TEORICO

### 5.1. ASPECTOS GENERALES DE LA PLANTA

El nombre científico de la planta se reporta como *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd (figura 1).



Figura 1. *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd.

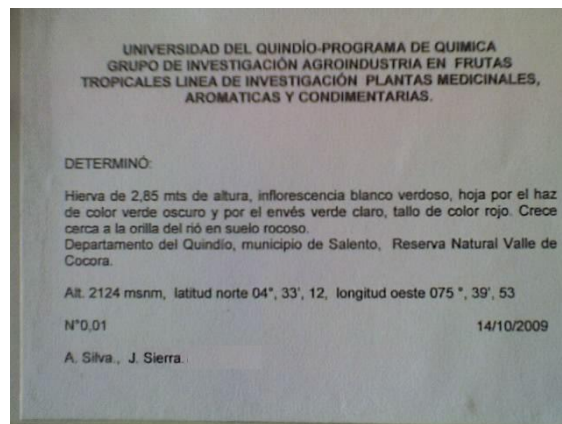


Figura 2. Ficha técnica de clasificación enviada al Herbario Universidad Nacional de Colombia.

#### 5.1.1. Nombres vulgares.

Abrojo, algodoncillo, barba de viejo, camarón, canillita, coyuntura de pollo, coyuntura de zanate, chancanil, chivito, descansi, hierba de gato, hierba de plata, ilusión, iresina, moradita, pie de paloma, plumaria, plumilla, siete pellejos, taba de gueguecho, tabudo, velo de princesa <sup>(9)</sup>.

### 5.1.2. Características generales.

Planta dicotiledónea, dioica (con las flores femeninas y masculinas en diferentes individuos), de vida corta, erguida o algo trepadora. Crece hasta 3 m de alto, generalmente más pequeñas, con tallo ramificado, a veces con pelillos multicelulares principalmente en los nudos.

Las hojas son opuestas, ovadas o rómbico-ovadas, hasta 14 cm de largo y 7 cm de ancho, puntiagudas, base redondeada y angosta hacia el pecíolo (hasta 6.5 cm de largo), a veces con pelillos, con frecuencia grupos de hojas pequeñas se presentan en las axilas de las hojas, están dispuestas en pequeñas espigas que se distribuyen en grandes panículas (hasta 40 cm de largo) ampliamente ramificadas (figura 3). Las brácteas y bractéolas que acompañan a las flores son más cortas y anchas que los tépalos. Las inflorescencias masculinas son más abiertas y difusas, y las femeninas más compactas.



Figura 3. Disposición de las hojas de la *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd<sup>(10)</sup>.

Las flores son sésiles o pedunculadas, pequeñas (desde la base de la bráctea hasta el ápice de los tépalos de 0,9 a 1,4 mm de largo), unisexuales, el perianto (llamado así porque no se diferencian cáliz y corola) cilíndrico, compuesto de 5 tépalos libres, oblongos, blanco-verdosos, amarillentos o cremosos, los de las flores femeninas con 3 venas evidentes y a veces con un mechón de pelos blancos en la base; posee 5 estambres, con los filamentos unidos en la base formando un tubo (figura 4). Las semillas son circulares, de aproximadamente 0,5 mm de diámetro, crece en bosques y matorrales, aproximadamente a una altitud de los 2000 a los 2650 m.s.n.m. Su ciclo de vida es anual o bienal <sup>(10)</sup>.



Figura 4. Flores de la *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd <sup>(10)</sup>.

### 5.1.3. Clasificación Científica. <sup>(11,12)</sup>

Tabla 1. Clasificación taxonómica realizada por el herbario de la Universidad Nacional.

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta
Súper división	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Caryophyllidae
Orden	Caryophyllales
Familia	AMARANTHACEAE
Género	Iresine
Epíteto específico	diffusa
Nombre Científico	<i>Iresine diffusa</i> Humb. & Bonpl. ex Willd.
Autor del nombre	Humb. & Bonpl. ex Willd.

### 5.1.4. Usos comunes atribuidos popularmente.

Según CENICAFE en 1988, como lo proponen en su libro “Malezas en Plantaciones de Café” <sup>(13)</sup>. Se utiliza como alimento para el ganado vacuno en época de sequía y escasas, además es de importancia apícola. En el estudio realizado por la doctora María Yolanda Ríos en el 2005 se cita el uso medicinal que le atribuían los indígenas Mayas y Chiapas, los cuales la utilizaban contra la malaria, el cáncer de próstata, contra la fiebre tifoidea, benéfica los riñones, entre otros <sup>(14)</sup>.

## 5.2. METABOLITOS SECUNDARIOS.

Las plantas a partir de H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> (por medio de la fotosíntesis), y una fuente inorgánica de nitrógeno, efectúan ciertos procesos, produciendo moléculas

orgánicas y luego macromoléculas, las cuales se ensamblan en estructuras superiores (organelos) que conforman la célula. En general se puede decir que los productos naturales de las células se han dividido en tres grupos debido a los diferentes factores que caracterizan a cada uno de ellos.

Los metabolitos secundarios son el producto de un metabolismo específico, originados a partir de un metabolismo intermediario, de distribución restringida, con una función metabólica específica, generalmente estos se encuentran almacenados en el interior de las vacuolas <sup>(15)</sup>.

### 5.2.1. Principales metabolitos secundarios.

**Carotenoides:** Los carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranil-geranilpirofosfato, en su mayoría son de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo el  $\beta$ -caroteno) y el rojo (por ejemplo el licopeno).

**Aislamiento:** son solubles en las grasas y en solventes apolares, esto facilita su separación de otros compuestos en un extracto.

**Reacciones de reconocimiento:** la reacción con ácido sulfúrico es característica de los carotenoides y sirve para distinguirlos de otros pigmentos naturales como las antocianinas. La reacción puede consistir en la transferencia de nube electrónica  $\pi$  a través de toda la cadena conjugada, con adición de ácido sulfúrico ( $H^+$  y  $HSO_4^-$ ) en el carbocatión inicial y carbanión formados <sup>(16)</sup>.

**Esteroles:** Los esteroles se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal; y se les encuentra en forma libre (También llamados agliconas esteroides), como ésteres o como glicósidos. Todos contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el carbono 3.

**Aislamiento:** los extractos con disolventes no polares, como el éter de petróleo, bisulfuro de carbono, cloroformo, éter etílico, contienen esteroides y sus ésteres junto con otros lípidos, carotenoides y lecitinas. Para separarlos, se saponifica este extracto y luego se sacan de la solución con un disolvente no polar. Posteriormente se separan del saponificable por cristalización fraccionada, cromatografía o precipitación con digitonina. Los glicósidos se extraen con etanol u otros disolventes polares <sup>(17)</sup>.

**Reacciones de reconocimiento:** no hay reacciones verdaderamente específicas para esteroides, ya que otros tipos de sustancias, tales como glicósidos cardiotónicos, esteroalcaloides, di y triterpenos, saponinas, también las dan por contener detalles estructurales comunes o análogos. La prueba de Lieberman-Burchard es la más utilizada en el análisis de esteroides. Esta reacción consiste en someter la sustancia

problema a la acción de anhídrido acético en cloroformo y ácido sulfúrico concentrado, empleando gotas. Si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, etc., los que cambian con el tiempo, la prueba es positiva <sup>(18)</sup>.

**Glicosidos cardiotónicos:** Los glicósidos cardiotónicos son sustancias constituidas de una porción esteroide, una porción glicosídica y un anillo de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturado (butenolido o cardenolido) o  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$  y  $\gamma$ ,  $\delta$ -insaturado (pentenolido, esciladienolido o bufadienolido), que actúan sobre el músculo cardíaco y por tanto se utilizan como medicamentos contra la insuficiencia cardíaca.

**Aislamiento:** si el material vegetal es rico en lípidos se le desengrasa antes con éter de petróleo y después, el glicósido se extrae en caliente (inactivándose las enzimas con etanol del 50% al 95% o con acetato de etilo). La separación y purificación final se hace por cromatografía en alúmina neutra o en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo puro o metanol. La hidrólisis enzimática permite la obtención de la aglicona y sus azúcares o de productos de hidrólisis parcial <sup>(19)</sup>.

**Reacciones de reconocimiento:** el anillo lactónico de los glicósidos cardiotónicos reacciona con compuestos aromáticos nitrados, generando, con previa ruptura de la lactona y por sustitución electrofílica en el anillo aromático, compuestos coloreados, válidos para caracterización. En este comportamiento se basan las pruebas de Baljet, Kedde y Legal. El grupo glúcido que acompañan la aglicona cardenólida dan positivo para las reacciones de Tollens, Fehling y Molish, entre otras pruebas para distinguir carbohidratos <sup>(20)</sup>.

**Flavonoides:** son moléculas que tienen dos anillos bencénicos (ó aromáticos, para los químicos orgánicos) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, los autores los denominan simplemente como compuestos  $C_6C_3C_6$ . Para su estudio sistemático los más de 4000 flavonoides naturales se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central  $C_3$ . Los flavonoides se clasifican en varios grupos: Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc.

**Aislamiento:** los poliglicósidos son muy solubles en agua y escasamente solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos. La posición ocupada por la porción de azúcar influye en la solubilidad de la molécula y su capacidad para formar lacas insolubles con los metales. Las flavonas y flavonoles son poco solubles en agua, en tanto que los dihidroflavonoles sí. La cromatografía en papel ha sido ventajosa para separar y aislar antocianinas y glicósidos muy solubles en agua. Por

cromatografía en columnas empacadas con adsorbentes poco polares se han logrado buenas separaciones <sup>(21)</sup>.

**Reacciones de reconocimiento:** los diferentes tipos de flavonoides se pueden identificar mediante reacciones coloridas y propiedades de solubilidad. Los flavonoides con anillo de gamma-benzopirona reaccionan en presencia de ácido clorhídrico concentrado y magnesio, y esta es la reacción de Shinoda. Los flavonoides con esqueleto de flavilio dan positiva la prueba de Rosenhein, por tener en su anillo, un sistema de dieno conjugado <sup>(22)</sup>.

**Saponinas esteroideas:** Las saponinas esteroideas son glicósidos esteroideos con un núcleo espiroetano que tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y forman espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas <sup>(23)</sup>.

**Aislamiento:** las saponinas son compuestos muy polares, y es posible extraerlas en caliente o en frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular. Para obtener saponinas, se pueden hidrolizar las saponinas con sus enzimas naturales, con enzimas de origen microbiológico o hidrolizarlas con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico (este último se prefiere en el caso de saponinas insaturadas).

**Reacciones de reconocimiento:** las saponinas esteroideas dan colores característicos con el reactivo de Rosenthaler. Las saponinas de triterpenos pentacíclicos dan un color violeta ( $\lambda_{max}$  575 nm) y las esteroideas no reaccionan o dan un color verdoso <sup>(24)</sup>.

**Quinonas:** Los compuestos antracénicos vegetales pueden clasificarse según su estado de oxidación en siete grupos estructurales: antraquinonas, antronas, diantronas, antranoles, oxantronas, naftodiantronas, antrahidroquinonas.

**Aislamiento:** las *para*-benzoquinonas no hidroxiladas y algunas naftaquinonas parecidas pueden arrastrarse con vapor o extraerse con éter, benceno o disolventes no polares. Las hidroxiladas pueden extraerse con soluciones acuosas de bicarbonato o carbonato de sodio. Las bases fuertes en presencia de aire favorecen su descomposición oxidativa. Las *ortobenzoquinonas* no son arrastrables con vapor. Las antraquinonas se extraen con agua, etanol o mezclas de ambos <sup>(24)</sup>.

**Reacciones de reconocimiento:** las quinonas oxidadas y reducidas tienden a dar colores amarillos, rojos o púrpuras, en presencia de ácidos o álcalis concentrados, lo que puede usarse para identificarlas <sup>(25)</sup>.

**Sesquiterpenlactonas:** son compuestos con 15 átomos de carbono formados a partir del ácido mevalónico por la unión cabeza-cola de tres unidades de isopreno. Parte del esqueleto es un anillo de metilbutenólido. Algunas sesquiterpenlactonas poseen acción citotóxica. Otros son analgésicos o amebicidas. Son sustancias

amargas, de farmacología poco estudiada, pero provenientes de plantas usualmente reportadas como medicinales.

**Aislamiento:** por lo general, las sesquiterpenlactonas son lo suficientemente polares para ser insolubles en éter de petróleo, aunque también son insolubles en agua. El etanol o metanol caliente las disuelven, pero son aún más solubles en cloroformo o éter etílico.

**Reacciones de reconocimiento:** las lactonas terpénicas dan respuesta positiva con la reacción de hidroxamato férrico. Cuando la lactona terpénica es una  $\gamma$ -lactona  $\alpha$ - $\beta$ -insaturada, reacciona positivamente con las pruebas de Legal, Kedde y Raymond.

**Coumarinas:** son probablemente los metabolitos más comunes derivados de la ruta biosintética del shikimato-corismato. Constituyen un grupo importante de compuestos naturales; son lactonas derivadas de la  $\alpha$ -benzopirona, biogénicamente formadas a partir del ácido cinámico. Son sustancias fluorescentes, comúnmente fotosensibles. Presentan acción anticoagulante, sedante, vasodilatadora, antihelmíntica, antibacteriana y antifúngica. Las coumarinas se encuentran con frecuencia en los extractos de leguminosas, *Orchidaceae*, *Rutaceae* y *Umbeliferae*, y en cualquiera de los órganos vegetales, desde raíces hasta flores y frutos.

**Aislamiento:** el empleo sucesivo de disolventes de polaridad creciente ha dado buenos resultados. Así, el éter de petróleo o el éter etílico extraen aceites que ayudan a solubilizar las coumarinas, por los que frecuentemente cristalizan durante las extracciones en Soxhlet o al concentrar la solución etérea. Las coumarinas son solubles en soluciones acuosas o alcohólicas de hidróxidos de sodio.

**Reacciones de reconocimiento:** la mayoría de las coumarinas tienen fluorescencia azul cuando se les expone a la luz ultravioleta, las que tienen oxígeno en la posición 7 pueden exhibir fluorescencia hasta con luz visible, particularmente cuando se tratan con  $H_2SO_4$ . Las coumarinas como lactonas que son, dan positiva la prueba del hidroxamato férrico. La presencia de un grupo de furano puede determinarse mediante la prueba de Ehrlich, formando una coloración naranja.

**Alcaloides:** constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas, con acción fisiológica más o menos intensa sobre los animales. La mayoría de los alcaloides se hallan en los vegetales como sales de ácidos orgánicos. En ciertas plantas puede haber un ácido especial asociado a los alcaloides. Algunos alcaloides se encuentran en forma de glicósidos de la rhamnosa, galactosa y glucosa. Otros se hallan en forma de ésteres de ácidos orgánicos de complejidad variable. Aunque con frecuencia se agrupan los alcaloides de acuerdo con su procedencia botánica, es más racional clasificarlos de

acuerdo con alguno de los 254 tipos estructurales en que hasta el momento se les ha dividido.

**Aislamiento:** las soluciones al 1% de ácido cloro áurico ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) o de ácido cloroplatínico ( $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) dan precipitados característicos con los alcaloides. La solubilidad se emplea para extraerlos y purificarlos.

**Reacciones de reconocimiento:** las reacciones se basan en los siguientes comportamientos: el yoduro potásico cuando reacciona con cloruro mercúrico, forma, un precipitado rojo de yoduro mercúrico soluble en exceso de iones de yoduro con formación de un anión complejo incoloro. La solución alcalina de este complejo sirve para descubrir indicios de amoníaco. En esta reacción se forma el compuesto de color pardo oxiyoduro mercuriamónico, que es soluble en exceso de complejo alcalino, generando intenso color amarillo. Los alcaloides por su carácter nitrogenado pueden comportarse de forma similar al amoníaco ante estos reactivos.

**Taninos:** son productos de la excreción de muchas plantas, involucrados en mecanismos de defensa de las mismas, contra organismos parásitos. Químicamente son polímeros de polifenoles, sustancias con alto peso molecular (comprendido entre 500 a 3000 g/mol), con 1 a 2% de hidroxilos fenólicos libres, los cuales permiten la formación de enlaces cruzados estables con proteínas y otros biopolímeros como la celulosa y las pectinas.

**Aislamiento:** la estructura química de los taninos hidrolizables más comunes está constituida por polímeros del ácido gálico o el ácido elágico, unidos a la glucosa. Los taninos hidrolizables, mediante acción de álcalis, ácidos o enzimas específicas, liberan los compuestos fenólicos individuales y la unidad de carbohidrato <sup>(26)</sup>.

**Reacciones de reconocimiento:** Los taninos reaccionan con solución acuosa de tricloruro férrico al 1 % dando coloración azul (taninos derivados del ácido gálico) o verde (taninos derivados del ácido protocatéquico).

Con acetato de plomo producen turbidez o precipitado blanco. Los taninos precipitan las proteínas de sus soluciones al reaccionar con solución acuosa de gelatina-sal 5% <sup>(27)</sup>.

### 5.3. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (EUA).

La extracción asistida por ultrasonido utiliza sonidos de alta frecuencia, con el fin de extraer el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente <sup>(28)</sup>. Según Rostagno *et al.* <sup>(29)</sup>, esta técnica es la más económica y tiene los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrolladas.

Los fenómenos físicos que afectan la extracción de sustancias se ven afectados por la *sonificación*, ya sea que las sustancias de interés se encuentren en células internas



o externas del tejido. Al reducir el tamaño de las partículas del material vegetal se aumenta el área de exposición al solvente.

El ultrasonido además facilita la rehidratación del tejido si se están utilizando materiales secos al abrir los poros, lo cual a su vez incrementa el transporte de masa de los constituyentes solubles por difusión y procesos osmóticos <sup>(30)</sup>.

#### 5.4. DOSIS LETAL MEDIA DL50.

##### 5.4.1. Ensayo con *Artemia salina*.

Es un bioensayo natural simple por medio del cual se determina la concentración letal o dosis letal DL50 en ppm, de componentes activos de extractos en un medio salino. Los camarones salinos han sido utilizados en ensayos o en análisis de residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos, toxinas dinoflagelares y toxinas en ambiente marinos. Esto se debe a que la larva (figura 6) de este crustáceo es altamente sensible a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas. Valores menores de mil (1,000 ppm) se consideran bioactivos <sup>(31)</sup>.



Figura 5. *Artemia Salina* del phylum artrópoda

##### 5.4.2. Método de Probit. <sup>(32)</sup>

Los datos obtenidos de un bioensayo no pueden ser analizados con la metodología estadística tradicional que se usa en los ensayos de campo sino que se debe utilizar lo que se llama estadística cuantil, la cual se caracteriza por la respuesta a un estímulo de  $n$  unidades experimentales, donde  $r$  unidades responden y  $n - r$  no lo hacen. El principal objetivo de este tipo de análisis es evaluar el nivel de estímulo que es necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de la población. El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio es un importante parámetro de caracterización denotado como DL50 por dosis letal media (o DE50 por dosis efectiva media, CL50 por concentración letal media, CE50 por concentración efectiva media y LTM por límite de tolerancia media). El periodo de tiempo durante el cual se expone el estímulo debe ser especificado, por ejemplo, 24 horas DL<sub>50</sub>, esto con el fin comparar y estimar la potencia relativa del estímulo.

## 5.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIFUNGICA

### 5.5.1. Actividad antimicrobiana.

Las bacterias son naturalmente sensibles a algunos antimicrobianos y resistentes a otros (resistencia natural); sin embargo, entre los microorganismos sensibles han aparecido cepas resistentes a antibióticos que eran activos (resistencia adquirida), por lo que al aislar un microorganismo, no puede saberse con exactitud si es sensible a un determinado antibiótico o si ha adquirido resistencia frente a él. Un antibiótico se considera activo frente a una bacteria cuando inhibe su multiplicación. Su actividad se evalúa *in vitro* determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM), que es la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento del microorganismo.

**5.5.1.1. Método de difusión en disco (Kirby-Bauer):** la difusión en agar es un método muy utilizado por su sencillez para el estudio de la sensibilidad de las bacterias. Se basa en la inhibición del crecimiento de la bacteria alrededor de un disco o en algunos casos de una punción cargado con un antimicrobiano que difunde en un medio sólido. Esta técnica consiste en la siembra de la bacteria en la superficie de una placa con un medio de cultivo, sobre el cual se depositan unos discos de papel cargados con una cantidad precisa de antibiótico o del extracto que se desea evaluar, que se difunde instantáneamente a través del agar, formándose un gradiente del mismo alrededor del disco o de la punción. El microorganismo crece en la superficie de la placa, pero alrededor de los discos o de la punción se forman unos halos de inhibición más o menos grandes, dependiendo de la mayor o menor sensibilidad de la bacteria al antibiótico. Se mide el diámetro del halo (en milímetros) y se lleva a las tablas que correlacionan los diámetros con la sensibilidad. La correlación del diámetro (CMI) no se efectúa en términos cuantitativos, porque la técnica no es lo suficientemente exacta para permitir cuantificar con precisión las CIM en relación a los halos producidos. Por ello, en la técnica de difusión se trabaja con puntos de corte, basados en dos medidas un diámetro menor del halo de inhibición, por debajo del cual el microorganismo es resistente (R), y un diámetro mayor, por encima del cual es sensible (S) <sup>(33)</sup>.

**5.5.1.2. Bacterias Gram-negativas:** son microorganismos los cuales poseen una membrana externa que sirve como la principal barrera de permeabilidad de la célula y ayuda a retener proteínas en el espacio periplásmico. Sobre la superficie de la célula se encuentran los lipopolisacáridos y son el componente esencial de las endotoxinas. Ellos contribuyen a la capacidad de la bacteria para causar enfermedad. La capa de péptidoglicano de las bacterias Gram-negativas es un polímero relativamente delgado que consiste de ácido N-acetilmurámico y N-

acetilglucosamida entrelazados. Esta se conoce con frecuencia como la capa de mureína o pared celular y es responsable de mantener la forma del organismo.

**5.5.1.2.1. *Escherichia coli*:** es una de las bacterias que se encuentran de manera habitual en el tracto gastrointestinal de los animales, generalmente no suelen producir enfermedades en los animales, pero algunas, especialmente las cepas enterotoxigénicas y enterohemorrágicas son responsables de brotes de enterotoxemias en humanos, la prevalencia de estas cepas en el sistema gastrointestinal de los animales, puede permitir su paso a la cadena alimenticia después del sacrificio o por consumo de alimentos o agua contaminadas por las heces de estos. La célula de *E. coli* tiene una membrana exterior protectora y una membrana plasmática interior que encierra el citoplasma y el nucleóide.

Existen cepas de *E. coli* capaces de producir un amplio espectro de enfermedades, entre ellas infección urinaria, septicemia, meningitis o enfermedad diarreica <sup>(34)</sup>.

**5.5.1.3. Bacterias Gram-positivas:** estas bacterias poseen una pared celular gruesa que consta de varias capas y está formada principalmente por peptidoglicano que rodea la membrana citoplasmática debido a esto las bacterias Gram-positivas contiene solo dos componentes principales es mucho menos complicada que la pared celular de las Gram-negativas. Los ácidos teicoicos son polímeros que están entrelazados en la capa de peptidoglicano y se extiende en forma de cilios más allá de la superficie de las células Gram-positivas. La capa de peptidoglicano, o capa de mureína, es mucho más gruesa que la de las bacterias Gram-negativas.

**5.5.1.3.1. *Staphylococcus aureus*:** son bacterias muy resistentes al calor y la desecación que pueden crecer en medios con elevada salinidad. Es parte de la flora normal del hombre, siendo el sitio de portación principal las fosas nasales, por lo que debe ser considerado como un patógeno oportunista. Puede causar una amplia variedad de infecciones: lesiones superficiales, infecciones sistémicas con riesgo de vida (endocarditis, osteomielitis, neumonía, abscesos cerebrales, meningitis y bacteriemia), y enfermedades producidas por toxinas (intoxicación alimentaria, síndrome de la piel escaldada o síndrome de Shock tóxico) <sup>(35)</sup>.

## **5.5.2. Actividad antifúngica.**

Durante mucho tiempo existió gran incertidumbre sobre el valor del antifungigrama para determinar las concentraciones inhibitorias de los antifúngicos y poder orientar un tratamiento adecuado, a pesar de ello, el antifungigrama es de gran utilidad al permitir confirmar la sensibilidad esperada de los hongos aislados en clínica o poder detectar resistencias en el curso de

tratamientos prolongados con algunos antifúngicos. La técnica permite cuantificar la inhibición de crecimiento que produce el antifúngico comparándola con el crecimiento de la levadura o moho en un control sin antifungico y establece diferentes categorías de sensibilidad <sup>(36)</sup>.

**5.5.2.1.** *Candida albicans*: hongo dimorfo que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios, asimilan y fermentan azúcares. Colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente, con olor a levadura. *Candida albicans* puede producir infecciones superficiales que afectan la piel, uñas y mucosas. La piel húmeda, las mucosas oral y vaginal son lugares donde la infección candidiásica es frecuente.

## **5.6. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS.**

El perfil terapéutico de los citotoxicos es muy estrecho; por esta razón, se puede asumir que la dosis más eficaz esta próxima a ser la dosis máxima tolerable. Este concepto de toxicidad es un marcador de eficacia a la hora de determinar el esquema de quimioterapia para desarrollar un diseño de ensayo clínico. El desarrollo clínico usual de un agente citotxico implica tener claro que existen células malignas y normales. Los agentes citotoxicos actúan inhibiendo el crecimiento tumoral y desarrollo metastasico.

Una prueba in vitro ideal para evaluar la proliferación celular y la citotoxicidad debe tener como características principales: ser simple, rápida, eficiente, económica, reproducible, sensible, segura, efectiva en la medida de la población celular viable y, que no muestre interferencia con el compuesto a evaluar.

- Células BHK: estas provienen de las células de riñón de hámster las más utilizadas son las células BHK-21 ha sido utilizadas en la producción de vacunas para uso veterinario.
- Células de Mieloma Murino: estas provienen de los tumores que se originan en los ratones longevos, estos ofrecen sistemas experimentales para el estudio de los mecanismo neoplasicos y el desarrollo de nuestras estrategias de tratamiento que sean imposibles llevar a cabo en humanos o cultivos in vitro.

### **5.6.1. Ensayo con Resazurina o Alamarblue.**

Este es un ensayo que consiste en el cambio de color de la resazurina, conocido también como alamarblue (azul, no fluorescente) por las células las cuales la

reducen a resofurina (rosado, altamente fluorescente), por oxidoreductasas que se encuentran principalmente en la mitocondria de células viables. La resofurina es excretada al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y/o la citotoxicidad de sustancias sobre células humanas, animales, bacterias e incluso hongos.

Este colorante es poco tóxico para las células y permite la continuidad de estudios en las mismas células, economizando tiempo y dinero, especialmente en cultivos primarios donde las células son muy escasas y preciadas. Además, es sensible y altamente reproducible. Es posible obtener una medida de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm y/o fluorescencia en 530 nm y 590 nm, ya que este colorante tiene propiedades tanto cromóforas como fluoróforas <sup>(37)</sup>.

### 5.7. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN VEGETALES.

Estos estudios sobre interacción planta-planta fueron introducidos por Molish en 1937, como parte de las investigaciones sobre las interacciones químicas beneficiosas o perjudiciales entre diferentes plantas. Las plantas eliminan productos “alelopáticos” para impedir el crecimiento de otras plantas a su alrededor en forma de vapores, exudados y descomposición de materia vegetal que contienen “toxinas” que impiden la germinación de semillas <sup>(38)</sup>.

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) y de tomate (*Solanum lycopersicum*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 horas de exposición) en el que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo <sup>(39)</sup>.

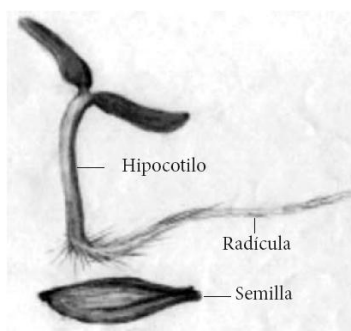


Figura 6: morfología de la semilla y plántula de *Lactuca sativa*.

Es importante destacar que durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el

desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos.

La evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, sin embargo, pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocotilo, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocotilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar el efecto en la germinación <sup>(40,41,42)</sup>.

#### **5.8. SEPARACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LOS EXTRACTOS VEGETALES POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA**

La cromatografía es un procedimiento físico-químico que permite separar los componentes o sustancias integrantes de una mezcla en movimiento, por absorción o separación diferencial de estos compuestos sobre una superficie inmóvil. En la cromatografía en capa fina, se emplean como adsorbentes o fase estacionaria: óxidos, óxidos hidratados o sales. Los más comunes son el gel de sílice, la alúmina, la celulosa y las poliamidas <sup>(43)</sup>.

Como el disolvente y la sustancia a analizar, empiezan a moverse al mismo tiempo, la relación entre ellos está definida por el factor de resolución (ecuación 1):

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por el soluto}}{\text{distancia recorrida por el solvente}} \quad \text{Ecuación 1}$$

#### **5.9. SEPARACIÓN CUANTITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LOS EXTRACTOS VEGETALES POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA**

Los adsorbentes comúnmente usados son óxido de aluminio para compuestos no polares o de polaridad media y sílica gel para compuestos orgánicos polares. La velocidad de elución debe controlarse para obtener una buena separación. El seguimiento de separación en el desarrollo de la columna, se hace por cromatografía en capa delgada para cada fracción colectada <sup>(44)</sup>.

#### **5.10. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA:**

Los métodos espectrométricos corresponden a un grupo de métodos analíticos que se basan en la espectroscopia atómica y molecular. La espectrometría y los métodos espectrométricos hacen referencia a la medida de la intensidad de la

radiación mediante un detector fotoeléctrico o con otro tipo de dispositivo electrónico.

La espectroscopia es el estudio de la interacción de los átomos y moléculas con la radiación electromagnética. La espectroscopia de absorción electrónica, al igual que otros métodos de espectroscopia, se utilizan para resolver preguntas de diferente índole al estudiar las propiedades de la estructura de sustancias orgánicas y su análisis cualitativo y cuantitativo.

**5.10.1. Espectroscopia Ultravioleta y Visible:** La región Visible (se percibe con los ojos humanos) abarca desde 380 hasta aproximadamente 800 nm, la región Ultravioleta se extiende desde 190 hasta 380 y no es perceptible para los ojos. Se han formulado dos leyes empíricas que relacionan la intensidad de la absorción de la luz con la concentración de la muestra, esta establece que la fracción de luz incidente absorbida es independiente de la intensidad de la luz. La Ley de Beer dice que la absorción es proporcional al número de moléculas absorbentes.

Las principales características de una banda de absorción son su posición e intensidad. La posición de la absorción corresponde a la longitud de onda ( $\lambda$ ) de la radiación cuya energía es igual a la requerida para la transición electrónica. La intensidad de la absorción depende principalmente de dos factores: la probabilidad de interacción entre la energía de radiación y el sistema electrónico para pasar de un estado fundamental a un estado excitado, así como de la polaridad del estado excitado <sup>(45)</sup>. Esta técnica es de gran importancia en el análisis de especies absorbentes que contienen electrones  $\pi$ ,  $\sigma$  y  $n$  incluyen iones y moléculas orgánicas, así como algunos iones inorgánicos, contribuyendo para su identificación y elucidación estructural.

**5.10.2. Espectroscopia Infrarroja:** la espectroscopia infrarroja es una herramienta versátil que se aplica a la determinación cualitativa y cuantitativa de especies moleculares de todo tipo. Las aplicaciones de la espectrofotometría en el infrarrojo se dividen en 3 grandes categorías relacionadas con las tres regiones espectrales del infrarrojo. La región más utilizada es la región del infrarrojo medio que se extiende entre aproximadamente 670 y 4.000  $\text{cm}^{-1}$ , en esta región para los análisis cualitativos y cuantitativos, se emplean los espectros de absorción, reflexión y emisión.

La región del infrarrojo cercano, comprendida entre 4.000 y 14.000  $\text{cm}^{-1}$ , también encuentra una considerable utilidad en la determinación cuantitativa de rutina de ciertas especies, como el agua, el dióxido de carbono, azufre, hidrocarburos de bajo peso molecular, nitrógeno amínico, y muchos otros. La principal utilidad de la región infrarroja lejana consiste en la determinación de estructuras de especies inorgánicas y organometálicas que se basan en las medidas de absorción <sup>(46)</sup>.

## 6. METODOLOGIA

### 6.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las hojas y las flores de *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. Ex Willd fueron recolectadas en el valle de Cócora, municipio de Salento, departamento del Quindío, con las siguientes coordenadas: Altura 2124 m.s.n.m, latitud norte 04° 33' 12", longitud oeste 0,75°, 39' 53"; temperatura promedio de 19 °C; la recolección se realizo en las primeras horas de la mañana. La identificación taxonómica se ejecuto en herbario nacional colombiano (Col) realizada por S. Suarez, adscrita a la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, con número de colección 536510.

Para realizar las respetivas pruebas y análisis fitoquímico y biológico, se secó la planta a 35°C en una estufa con circulación de aire durante 24 horas.

### 6.2. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DEL MATERIAL VEGETAL (METODO A.O.A.C 20.013/1980).

Se pesó 1,0 g de hojas y 1,0 g de flores en capsulas de porcelana previamente estabilizadas en peso (precalentadas hasta peso constante) y taradas, se llevaron a estufa de circulación de aire a 60°C hasta obtener un peso constante, esta determinación se realizo por triplicado. Para determinar el porcentaje de humedad se tomo la diferencia del peso inicial o peso húmedo y el final o peso seco, dividido por el peso húmedo. El cálculo (ecuación 2) que describe este analisis es el siguiente:

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{peso humedo} - \text{peso seco}}{\text{peso humedo}} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

### 6.3. OBTENCION DEL EXTRACTO ETANÓLICO TOTAL (MADRE)

La obtención del extracto etanólico madre se dividió el material vegetal en 3 partes, tanto flores como las hojas secas, el cual previamente ha sido molido y tamizado para reducir el tamaño de partícula y facilitar su extracción. Las tres partes se pesaron: 50 g de hojas y 50 g de flores, a las hojas se les adicionaron 200 mL (relación 1:4) de alcohol 96% y a las flores 250 mL (relación 1:5), los primeros 50 g de flores y hojas se les realizo la extracción asistida por ultrasonido en un J.P. SELECTA, s.a. 3000995 con un tiempo de 5 minutos, los siguientes 50 g a 10 minutos y finalmente los últimos 50 g a 15 minutos para así determinar un tiempo óptimo de obtención, todas las muestras fueron obtenidas a temperatura ambiente.

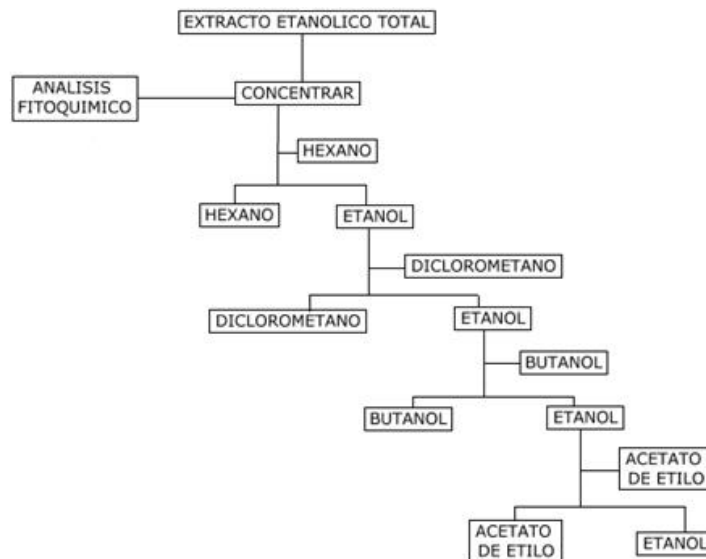




Figura 7. Equipo de ultrasonido utilizado para obtención de los extractos etanolicos madre madre de las hojas y flores de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd..

### 6.3.1. Fraccionamiento del extracto etanólico total o madre con solventes de diferentes polaridades:

Al extracto etanólico madre tanto de las hojas y las flores proveniente de cada uno de los tiempos de extracción asistida por ultrasonido se le realizó una serie de fraccionamientos (esquema 1) utilizando solventes en una escala de menor a mayor índice de polaridad (Anexo 1), comenzando con hexano, siguiendo con diclorometano, butanol y acetato de etilo, y como residuo el etanol fraccionado. A cada una de las fracciones se les realizó las respectivas pruebas fitoquímicas preliminares. El siguiente esquema resume este proceso de fraccionamiento <sup>(47)</sup>.



Esquema 1. Proceso de fraccionamiento con solventes de distintas polaridades.

### 6.3.2. Pruebas fitoquímicas preliminares:

Se realizaron a cada uno de los extractos y fracciones obtenidas en cada uno se los tiempos de extracción asistida por ultrasonido y se llevaron a cabo por los métodos descritos por ANTONIO SANABRIA GALINDO <sup>(48)</sup>, Análisis Fitoquímico Preliminar, 1983; MARIA DEL ROSARIO BILBAO RODRIGUEZ, Análisis Fitoquímico preliminar 1997.

Se estandarizaron los reactivos de caracterización, los resultados fueron comparados con muestras patrón (Anexo 2), para evitar falsos positivos, ocasionados por reacciones entre los reactivos de identificación y los solventes utilizados para los fraccionamientos (Anexo 3).

#### Taninos:

- **Prueba con cloruro férrico:** a 0.2 mL de extracto, se agregó una gota de solución de tricloruro férrico al 1 % y se observó el color. Para taninos derivados del ácido gálico da coloración azul, y para taninos derivados del ácido protocatéquico, coloración verde.
- **Prueba con acetato de plomo:** se adicionó 1 mL de extracto en un tubo de ensayo y se agregó 1 mL de solución de acetato de plomo al 10 %, si es positiva se produce turbidez o precipitado blanco.
- **Prueba con gelatina-sal:** a 1 mL del extracto se le adicionó 1 mL de solución acuosa de gelatina-sal. La formación de un precipitado blanco indica prueba positiva.

#### Flavonoides:

- **Prueba de Shinoda:** a 1 mL de extracto en una placa excavada se le adicionó magnesio en polvo y gotas de ácido clorhídrico concentrado. Los colores de rosado a anaranjado indican prueba positiva.
- **Prueba de Rosenhein:** a 1 mL del extracto, se le adicionó la mitad del volumen de ácido tricloroacético al 90 %. Se mezcló y se calentó por 10 minutos a 90 °C. Se enfrió y se agitó con 0.4 mL de alcohol amílico. Se decantó y se observó el color de la fase amílica. La prueba se considera positiva si aparece un color que va desde carmesí hasta el rosado claro.

#### Quinonas:

- **Comportamiento ante un ácido:** a 0.2 mL de extracto, se le adicionó zinc en polvo y gotas de ácido clorhídrico concentrado. Los colores amarillos, rojos o púrpuras indican que la prueba es positiva.

- **Comportamiento ante una base:** a 0.2 mL de extracto se le adicionó una pequeña cantidad de hidróxido de sodio al 40 %. Si aparece un color rojo más o menos intenso la prueba es positiva.

#### **Carotenoides:**

- **Prueba de Carr-Price:** a 1 mL de extracto se le agregó 0.5 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado, y se observó la coloración. Un color azul en la zona de separación de ambas capas indica que la prueba es positiva.

#### **Esteroles:**

- **Reacción de Liebermann-Burchard:** se emplearon 0.5 mL de extracto y seguidamente se sometió a la acción de anhídrido acético en cloroformo y gotas de ácido sulfúrico concentrado, las cuales se adicionaron por el borde de la cavidad, muy lentamente para apreciar los cambios de color. Si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, etc., los que cambian con el tiempo, la prueba es positiva.
- **Reacción de Tortelli- Jaffe:** en un microtubo coloque una porción de muestra con ácido acético y agregue gotas de solución de bromo en cloroformo al 2% v/v. la aparición de una coloración verde en la interface es específico de dobles enlaces diterciarios. Los 5,7-dienos también dan positiva esta reacción.

#### **Glicósidos cardiotónicos:**

- **Prueba de Baljet:** a 0.5 mL de extracto se le agregó 0.5 mL del Reactivo de Baljet A y B se calentó al baño maría y se observó. La prueba es positiva si se forma coloración anaranjada o roja oscura.
- **Prueba de Kedde:** a 0.5 mL de la muestra se le añadió 5 gotas del Reactivo de Kedde. Los cardenólidos y sus agliconas dan color azul o violeta que desaparece en 1-2 horas.
- **Prueba de Legal:** a 0.5 mL de extracto se le adicionaron 3 gotas del Reactivo de Legal A y B, se calentó observando el cambio de color. En caso positivo aparece un color rojo intenso.
- **Prueba de Keller-Killiani:** a 0.5 mL de la muestra se le adicionó 1 mL del reactivo de Keller-Killiani A y B. Si la prueba es positiva en uno o dos minutos aparece un anillo de color azul.
- **Prueba de Tollens:** en un tubo de ensayo, a 0.5 mL de extracto se le añadieron 4-6 gotas del reactivo de Tollens recientemente preparado. El tubo se calentó y se observó la formación de una película de plata en el tubo.

- **Prueba de la Antrona:** en un tubo de ensayo se colocó 0.5 mL del extracto y por la pared del tubo se dejó resbalar una solución reciente (no mayor de 24 horas) de antrona. Si aparece un anillo azul-verdoso o azul, la prueba es positiva.
- **Prueba de Molish:** a 0.5 mL de la muestra se le agregó 0.5 mL de reactivo de Molish y se adicionó la mezcla gota a gota por las paredes de un tubo que contenía ácido sulfúrico  $H_2SO_4$  concentrado. Si se forma un anillo violeta es positiva.
- **Prueba de Fehling:** a unos pocos mililitros de la muestra agregar 5 gotas del reactivo de Fehling A y Fehling B, calentar al baño maría por unos minutos, la aparición de una coloración rojo intensa con presencia de precipitado es prueba positiva para azúcares reductores.

### Saponinas y sapogeninas:

- **Reacción de Rosenthaler:** 0.5 mL de extracto se le adicionó 1 mL del reactivo de Rosenthaler. Las sapogeninas de triterpenos pentacíclicos dan un color violeta y los esteroides no reaccionan o dan color verdoso.
- **Reacción de espuma:** introducir muestras de extractos vegetales en tubos con soluciones de HCl a pH 1, y aparte soluciones de NaOH a pH 13, agitar vigorosamente. Las saponinas y los cardiotónicos disminuyen la tensión superficial del agua produciéndose espuma en altura de 2 cm, que permanece hasta media hora.
- **Reacción de hemólisis:** a 5 mL de sangre humana se le agregaron 50 mL de suero fisiológico 0.9 %. Luego se centrifugó por 3 minutos y se decantó el sobrenadante. Los glóbulos rojos se suspendieron en 100 mL de suero fisiológico 0.9 % y de esta solución se extrajeron 3 mL en 2 tubos. En uno de ellos se añadieron 3 mL del extracto a evaluar y el otro se dejó como testigo. Se incubaron los tubos en baño maría por 5 minutos a 37 °C y se observó si había oscurecimiento de la solución. Además se observó al microscopio en 100X la presencia o ausencia de eritrocitos.

### Sesquiterpenlactonas:

- **Reacción del hidroxamato férrico:** a 0.5 mL de extracto se le añadió una gota de solución metanólica 2 N de clorhidrato de hidroxilamina y una gota de solución 2 N de hidróxido de potasio. La mezcla se calentó durante 2 minutos, se enfrió y se aciduló con HCl 0.5 N y se adicionó una gota de  $FeCl_3$  al 1%. Se observa la coloración violácea.

### **Coumarinas:**

- **Reacción de fluorescencia:** en un tubo de ensayo se colocó la muestra y se tapó la parte superior del tubo con papel de filtro impregnado con solución diluida de NaOH. El tubo se calentó por 5 minutos en baño de maría. El papel se observó a la luz del U.V. La presencia de fluorescencia azul o verde es prueba positiva.
- **Reacción del hidroxamato férrico:** se realizó de igual manera que para la determinación de sesquiterpenlactonas.
- **Reacción de Ehrlich:** a 0.5 mL de extracto se le adiciona 1 mL del Reactivo de Ehrlich, consistente en una solución al 5 % de p-dimetil aminobenzaldehído en etanol y cloruro de hidrógeno gaseoso, formándose una coloración naranja, en caso de ser positiva.

### **Alcaloides:**

- **Reacción de Dragendorff:** a 0,5mL de extracto se le adicionan unas gotas del reactivo de dragendorff, el resultado es positivo cuando la muestra se torna de color rojo cobre.
- **Reacción de Mayer:** se adicionaron 5 gotas del Reactivo de Mayer a 0.5 mL de extracto. Cuando la prueba es positiva da un precipitado blanco.
- **Reacción de Ehrlich:** a 0.2 mL de muestra se agregaron 0.2 mL de reactivo de Ehrlich. La prueba se considera positiva si dentro 30 minutos da una coloración entre azul y violeta.
- **Reacción de Bouchardat:** a 0.5 mL del extracto se le adicionaron 5 gotas del reactivo de bouchardat. La formación de precipitado pardo, que es soluble en exceso de reactivo, es prueba positiva.

### **Análisis preliminar de heterosidos cianogeneticos.**

Para esta prueba se prepararon tiras de papel Whatman de 3 mm de ancho por 15 cm de ancho por 15 cm de largo, las tiras se sumergieron en picrato de sodio, se secaron por medio de calor en ausencia de la luz directa del sol. Se cortaron y pesaron 10 g de material vegetal tanto de hojas como flores, se llevaron a un tubo de ensayo adicionándoseles 50 mL aproximadamente de ácido sulfúrico al 10%, se colocó la tira de papel ya preparada dentro del tubo de ensayo sin tocar las paredes, se tapo inmediatamente y se dejó reposar durante 24 horas, se observó el cambio de coloración del reactivo picrato alcalino de amarillo a naranja como resultado positivo <sup>(49)</sup>.

#### **6.4. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA DL50 POR MEDIO DE ARTEMIA SALINA**

Este bioensayo se llevó a cabo por el método de Meyer *et. al.* <sup>(50)</sup>, utilizando como organismo de prueba *Artemia salina* del phylum artrópoda, de la clase crustácea <sup>(51)</sup>.

##### **6.4.1. Incubación de los huevos de *Artemia salina***

Se tomaron 3,8 g de sal marina por cada 100 mL de agua, estos se llevaron a un recipiente de vidrio que se adecuó con una malla en la mitad que permitiera el paso de los crustáceos, una de las mitades se cubrió con plástico negro y allí se depositaron 40 mg de huevos, estos se dejaron incubar a 25°C aproximadamente de 3 a 4 días.

##### **6.4.2. Preparación y dosificación de los extractos y adición de las larvas a los extractos.** <sup>(52)</sup>

Se pesaron 25 mg de cada extracto seco y se le adicionaron 5 mL de tween 80 al 0,5 % debido a que estos eran completamente solubles en esta solución, el tween fue preparado en solución salina (3,8 g de sal marina por cada 100 mL de agua), la concentración de esta fue de 5000 ppm, a partir de esta se prepararon los extractos que serían evaluados frente al crustáceo, con concentraciones iguales a 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 y 5 ppm. Además se realizó un control o blanco por cada muestra, el cual a diferencia de los ensayos poseía tween 80 al 0,5 %. A cada uno de los pozos se les adicionó 1 mL de solución salina con 10 nauplius, 1 mL del extracto preparado, se completó con 1 mL más de solución salina y se le adicionó una gota de levadura (3 mg de levadura seca disuelta en 5 mL de agua de mar) como alimento. Se realizó la lectura de las artemias muertas a diferentes tiempos, los resultados obtenidos se analizaron por el programa STATGRAPHICS Plus Versión 5.1. transformando los porcentajes de mortalidad en Probits, los cuales se utilizaron para calcular la DL50 de cada extracto.

#### **6.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIFÚNGICA**

Para este ensayo se utilizaron los siguientes microorganismos:

Gran-negativos: *Escherichia coli*,

Gran positivos: *Staphylococcus aureus*

Levaduras: *Candida albicans*

### 6.5.1. Preparación del estándar de turbidez

Para estandarizar la densidad del inóculo en la prueba de susceptibilidad se utilizó el estándar de turbidez de BaSO<sub>4</sub>, equivalente al tubo N° 5 de McFarland o su equivalente óptico.

Tabla 2. Escala de Mc Farland. <sup>(53)</sup>

Solución de Mc Farland			
Estándar	Volumen (ml)		Concentración bacteriana equivalente (10 <sup>8</sup> ufc/ml)
	Ba Cl <sub>2</sub> (1%)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1%)	
0,5	0,05	9,95	1,5
1	0,1	9,9	3
2	0,2	9,8	6
3	0,3	9,7	9
4	0,4	9,6	12
5	0,5	9,5	15
6	0,6	9,4	18
7	0,7	9,3	21
8	0,8	9,2	24
9	0,9	9,1	27
10	1	9	30

### Preparación del inóculo:

Para la preparación del inóculo se tomó una asada del microorganismo en estudio (previamente activado) y se suspendió en caldo nutritivo, hasta lograr una turbidez comparable con el patrón N° 5 de la escala de McFarland. Esta comparación se llevó a cabo visualmente utilizando un fondo blanco con líneas negras contrastantes y fuente de luz adecuada. Para la activación de los microorganismos se prepararon suspensiones a partir de cada uno de ellos y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento.

### 6.5.2. Actividad antimicrobiana de los extractos etanolicos madre a un tiempo de 10 minutos de sonicacion.

**6.5.2.1. Método de orificios o pocillos:** se utilizó el método de orificios o pocillos descrito por Gatica y Gesche (2007) <sup>(54)</sup>. se tomaron 3 cajas de petri por microorganismo, a cada una se le adicionó aproximadamente 20 mL de agar Mueller Hilton, sobre el medio solidificado se realizó la distribución del microorganismo con la ayuda de un isotopo estéril por siembra masiva y girando la caja a 90° para efectuar el barrido en 3 direcciones.

A continuación se aplicó el extracto a evaluar por medio de una punción en el agar de 3 mm aproximadamente, adicionando 10  $\mu$ L de este previamente preparado a 50.000 ppm en tween al 0,5%, además del control positivo y el control negativo. Las cajas se incubaron a 37 °C y al cabo de 24 horas se leyeron los resultados. El diámetro de inhibición de la zona se midió en milímetros (mm).

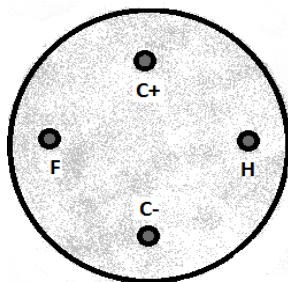


Figura 8. Distribución de las punciones realizadas sobre el agar según el método de orificios y pocillos

#### 6.6. DETERMINACION DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS MADRES Y SUS FRACCIONES.

Se emplearon 2 líneas celulares de diferente origen ambas de crecimiento adherente en monocapa; BHK ( células de riñón de hámster bebe) y Mieloma Murino (células de los tumores que se originan en los ratones longevos), para lo cual se inocularon cajas de cultivo celular de 96 pozos en medio Dulbecco's Modified Eagle's médium/ Ham's Nutrient Mixture F-12 (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), se incubaron a 35°C por 24 h en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, al cabo de este tiempo las células habían llenado el fondo del pozo en crecimiento de monocapa a las 0 y a las 12 h. Para evaluar el efecto citotóxico los extractos a analizar se prepararon en etanol al 20% cada uno con una concentración final de 1000 ppm, después de esto las células se dejaron incubando por 24 horas, al cabo de este tiempo se procedió a medir el efecto citotóxico, para esto se empleó el método fluorométrico indirecto de reducción de Resazurina. El medio fue retirado y se reemplazó por 100  $\mu$ L/pozo de una solución de resazurina en una concentración final de 10% v/v y se incubó por 24 horas a 37 °C. Posteriormente se leyó por fluorimetría la formación de resorufina (producto de la reducción de la resazurina por las células viables), empleando un filtro de excitación de longitud de onda de 570 nm y 630 nm <sup>(55,56,57)</sup>.

Las cantidades específicas adicionadas se expresan en la siguiente tabla cantidad en microlitros de extracto adicionado a los pozos es la misma para células BHK y Mieloma Murino.



Tabla 3. Concentración de extractos madre y fracciones a evaluar en células BHK y Mieloma Murino.

HOJAS						FLORES					
R	Ac	B	D	H	M	R	Ac	B	D	H	M
100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
100C+	100C+	50C+	50C+	25C+	25C+	10C+	10C+	5C+	5C+	C	C

R: residuo, Ac: acetato de etilo, B: butanol, D: diclorometano, H: hexano, M: madre, C: control negativo (contiene solo células), C+: control positivo o blanco (etanol al 20%).

Después de que se cumplió el tiempo de ensayo se llevó a cabo la medición de las absorbancias (figura 9) tomando 400  $\mu\text{L}$  de agua y 200  $\mu\text{L}$  de la muestra, los resultados se obtuvieron por triplicado y determinaron las diferencias significativas con un análisis de varianza (ANOVA) en el programa STATGRAPHICS Plus Version 5.1.



Figura 9. Espectrofotómetro UV-Visible Marca Milton Roy Modelo Spectronic Genesis serie 5 Centro Investigaciones Biomédicas Universidad del Quindío.

## 6.7. BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE *Solanum lycopersicum* Y *Lactuca sativa*.

La determinación del porcentaje de inhibición en semillas de lechuga y tomate se analizó con los extractos madre preparados en agua estéril a concentraciones de 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 y 5 ppm. Para la germinación de las semillas se adecuaron las cajas para llevar el ensayo con papel filtro previamente autoclavado y cortado del mismo diámetro de las cajas, se añadió 1mL de cada extracto por caja para saturar el papel filtro de este y evitar la formación de bolsas de aire, con la ayuda de una pinza se adicionaron 10 semillas dejando espacio suficiente para permitir la elongación de las raíces, se taparon las cajas y se dejaron incubar por 5 días a una temperatura de 22 °C aproximadamente, en ausencia de luz. Como control negativo o blanco se utilizó el mismo procedimiento utilizando 1 mL de agua estéril para el crecimiento de las semillas. Todas las pruebas fueron ejecutadas por triplicado. Para definir si los extractos mostraba actividad a esta prueba, se calculó el porcentaje de inhibición (ecuación 4) de crecimiento de acuerdo a las siguientes formulas:

$$\% \text{crecimiento} = \frac{\text{longitud raíz con la muestra evaluada}}{\text{longitud raíz en control}} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\% \text{inhibicion} = 100 - \% \text{crecimiento} \quad \text{Ecuación 4}$$

Los resultados se procesaron por el programa STATGRAPHICS Plus Versión 5.1 para determinar la concentración que produce el 50% de inhibición (CI50) <sup>(58)</sup>.



Figura 10. Semillas de *Solanum lycopersicum* y *Lactuca sativa*.

Las semillas de *Solanum lycopersicum* y *Lactuca sativa*, fueron obtenidas en una tienda local, estas semillas son seleccionadas e importadas por la SGA Seed Company y cumplen con las exigencias de germinación del Instituto Colombiano Agropecuario ICA.

## 6.8. SEPARACION CUALITATIVA POR CCD.

La separación cualitativa de metabolitos secundarios del extracto etanolico madre de las hojas se llevó a cabo de la siguiente manera <sup>(59)</sup>:

**6.8.1. Preparación de la placa:** se pesó 2 g de silica gel 60 F<sub>254</sub> y se le adiciono 4 mL de agua destilada homogenizando para evitar la formación de grumos. Esta se aplico sobre portaobjetos cubriéndola completamente y dejándola secar con calentamiento en horno a 105°C por 30 minutos.

**6.8.2. Búsqueda del mejor eluyente:** se realizó con la fracción del extracto madre de las hojas con 10 minutos de extracción asistida por ultrasonido, se ensayaron diferentes solventes de distintas polaridades, desde las más bajas hasta las más altas, basándose en el índice de polaridad y mezclas para mejorar la resolución de la separación de los metabolitos.

**6.8.3. Aplicación de la muestra:** el extracto se aplicó en la placa con la ayuda de un tubo capilar, una vez lista la placa se introdujo en la cuba cromatografía con el respectivo eluyente (el solvente y/o mezcla de solventes) adecuado para la separación de los metabolitos secundarios de interés; una vez el eluyente había recorrido la placa se retiro de la cubeta, se dejó secar y se midió la distancia recorrida por este y cada una de las manchas para determinar el R<sub>f</sub> con exactitud, las manchas fueron observadas con la ayuda de una cámara de UV y con luz visible después de aspersiones de vainillina.

**6.8.4. Cromatografía CCD bidimensional:** esta se llevó a cabo del mismo modo que las monodimensionales en cuanto a su preparación, utilizando una placa de 20\*20cm. La aplicación (toque) se realizó en el borde inferior izquierdo, empleando una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo (8,5:1,5) con el fin de separar clorofilas y carotenoides; después de que el eluyente había recorrido la placa, esta se giro 90° hacia la izquierda y se corrió con el mejor eluyente empleado en la monodimensional, la lectura de las manchas se llevó a cabo en lámpara UV 254 nm, y con luz visible después de aspersion de vainillina.

## 6.9. SEPARACION CUANTITATIVA POR COLUMNA

Se utilizó una columna con un diámetro de 1,0 cm, la cual se lleno con 10 cm de silica gel 60 (0,063-0,200 mm) el extracto se adicionó con la mezcla de solventes que mostró mejor resolución en placa y se procedió a realizar la separación con este, para optimizar la separación se le adicionaron 4 solventes más de menor a mayor polaridad, a cada fracción obtenida se le realizo una cromatografía de placa para asegurar que la separación fuera la adecuada.



Figura 11. Columna cromatografica utilizada para separación de metabolitos secundarios del extracto etanólico total de las hojas de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd.

## 6.10. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS.

Estos analisis se realizarón para las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna que presentaron resultados positivos en la cromatografía de capa delgada.

**6.10.1. Espectroscopia infrarroja:** se realizó con pastilla de KBr en un espectrofotómetro FT-IR marca Thermo Nicolet 320.



Figura 12. Equipo de infrarrojo utilizado para identificación de metabolitos secundarios del extracto etanólico total de las hojas de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd.

**6.10.2. Espectroscopia Ultravioleta-Visible:** los análisis se realizaron en un espectrofotómetro marca UV-VIS HP-8453 Software Chemstation Versión A 06.01, con una celda de cuarzo de 1,0 cm, se usó metanol y acetato de etilo como solvente.



Figura 13. Equipo de Ultravioleta utilizado para identificación de metabolitos secundarios del extracto etanólico total de las hojas de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DEL MATERIAL VEGETAL.

Tabla 4. Contenido de humedad de las hojas y flores de *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Humedad (%)
Hojas	1,0322	0,1234	83,382
	1,0140	0,1841	
	1,0291	0,2064	
Flores	1,0247	0,2059	80,199
	1,0271	0,177	
	1,0337	0,2288	

De los resultados anteriores se observa que el contenido de humedad para las hojas es mayor que el contenido de humedad para las flores en un 3.183%, lo cual es una diferencia bastante baja, puede corresponder a que las hojas requieren más cantidad de agua del suelo para la obtención de microelementos y para realizar procesos fotosintéticos, además porque poseen mayor cantidad de clorofilas que las flores, de estas dependen las reacciones de la fase lumínica, ya que son las clorofilas las que capturan la luz solar para convertirla en energía química, que luego se utiliza para construir azúcares y a partir de estos se producen los respectivos procesos del metabolismo secundario <sup>(60)</sup>.

### 7.2. PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS MADRE Y SUS FRACCIONES.

Los metabolitos secundarios fueron caracterizados de manera cualitativa mediante pruebas de coloración y precipitación en cada uno de los extractos obtenidos a los distintos tiempos de extracción asistida por ultrasonido, teniendo en cuenta los siguientes parámetros los cuales están dados por la intensidad de la coloración y abundancia del precipitado:

- Presente en abundancia (+++)
- Presente en mediana cantidad (++)
- Presente en pequeña cantidad (+)
- Ausente (-)

Para corroborar que los resultados obtenidos fueran los correctos se realizaron las pruebas fitoquímicas preliminares a sustancias puras representativas de cada metabolito para estandarizar los reactivos frente a estas muestras patron y tener claro el resultado característico de cada una de las pruebas del analisis fitoquímico preliminar (anexo 2).

Además se realizaron las mismas pruebas a los diferentes solventes utilizados en los fraccionamientos, que podrían presentar interferencia en el momento de realizar el analisis, es decir, podrían arrojar como resultado un falso positivo, debido a la reacción entre los reactivos de identificación y estos (anexo 3).

Los resultados de las pruebas del analisis fitoquímico preliminar realizado a los extractos etanolicos madres y sus fracciones a diferentes tiempos (5, 10 y 15 minutos) de extracción asistida por ultrasonido de las hojas se observan en las tablas 5, 6 y 7 respectivamente, para las extracciones asistidas por ultrasonido para las flores a los 5, 10 y 15 minutos se observan en las tablas 8, 9 y 10.

### 7.2.1. Extracto madre y fracciones de las hojas a los 5 minutos de extracción asistida por ultrasonido.

Tabla 5. Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto etanolico madre y sus fracciones de las hojas con 5 minutos de extracción asistida por ultrasonido.

Metabolito	Prueba	Madre	Hexano	Dicloro- metano	Butanol	Acetato de etilo	Residuo
<b>Taninos</b>	FeCl <sub>3</sub>	+	-	-	-	-	-
	Acetato de Plomo	++	-	-	-	-	-
	Gelatina-sal	++	-	-	-	-	-
<b>Flavonoides</b>	Shinoda	-	-	-	-	-	-
	Rosenhein	-	-	-	-	-	-
<b>Quinonas</b>	Medio ácido	-	-	-	-	-	-
	Medio básico	-	-	-	-	-	-
<b>Isoprenoides</b>	Karr-price	+	+	+	-	-	-
<b>Esteroles</b>	Lieberman-buchard	++	++	-	-	-	-
	Tortelli-jaffe	-	-	-	-	-	-
<b>Carodiotonicos</b>	Baljet	+++	-	-	-	-	-
	Legal	+++	+	-	-	-	-
	Kedde	+++	+	-	-	-	-
<b>Desoxiazucares</b>	Keller-killiani	+++	++	+	-	-	-
<b>Azucares</b>	Tollens	+++	-	-	+++	-	-
	Fehling	-	-	-	-	-	-
	Molish	+++	+	-	-	-	-
	Antrona	+++	+	+	-	-	+
<b>Saponinas</b>	Rosenthaler	+++	++	+	-	-	+
	Espuma	+	-	-	-	-	-
	Hemolisis	+++	++	+	-	-	-
<b>Sesquiterpen-lactonas</b>	Hidroxamato Férrico	-	-	-	-	-	++
<b>Coumarinas</b>	Fluorescencia	+	+	-	-	-	-
	Ehrlich	+	-	+	-	-	-
<b>Alcaloides</b>	Dragendorff	++	-	-	+	++	-
	Wagner	+	-	-	+	+	-
	Bouchardat	+	-	-	+	+	-

### 7.2.2. Extracto madre y fracciones de las hojas a los 10 minutos de extracción asistida por ultrasonido.

Tabla 6. Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto etanólico madre y sus fracciones de las hojas con 10 minutos de extracción asistida por ultrasonido.

Metabolito	Prueba	Madre	Hexano	Dicloro- metano	Butanol	Acetato de etilo	Residuo
Taninos	FeCl <sub>3</sub>	++	+	+	-	-	-
	Acetato de Plomo	++	+	-	-	-	-
	Gelatina-sal	+	+	-	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	-	-	-	-	-	-
	Rosenhein	-	-	-	-	-	-
Quinonas	Medio ácido	-	-	-	-	-	-
	Medio básico	-	-	-	-	-	-
Isoprenoides	Karr-price	++	+	+	-	-	-
Esteroles	Lieberman-buchard	++	++	+	-	-	-
	Tortelli-jaffe	-	-	-	-	-	-
Carodiotonicos	Baljet	++	-	-	-	-	-
	Legal	+++	-	+	-	-	-
	Kedde	+++	-	+	-	-	-
Desoxiazucares	Keller-killiani	+++	++	+	-	-	-
Azucares	Tollens	+++	-	-	+++	++	+
	Fehling	-	-	-	-	-	-
	Molish	+++	+	-	-	-	-
	Antrona	+++	+	+	-	-	+
Saponinas	Rosenthaler	+++	+++	+	-	-	+
	Espuma	+	+	-	-	-	-
	Hemolisis	+++	+++	++	-	-	-
Sesquiterpen-lactonas	Hidroxamato Férrico	+	-	-	-	-	+++
Coumarinas	Fluorescencia	+	+	+	+	-	-
	Ehrlich	+	-	+	-	-	-
Alcaloides	Dragendorff	++	-	++	+	-	-
	Wagner	+	-	++	++	-	-
	Bouchardat	++	-	++	-	-	-



### 7.2.3. Extracto madre y fracciones de las hojas a los 15 minutos de extracción asistida por ultrasonido.

Tabla 7. Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto etanólico madre y sus fracciones de las hojas con 15 minutos de extracción asistida por ultrasonido.

Metabolito	Prueba	Madre	Hexano	Dicloro- metano	Butanol	Acetato de etilo	Residuo
Taninos	FeCl <sub>3</sub>	++	-	+	-	-	-
	Acetato de Plomo	++	-	+	-	-	-
	Gelatina-sal	++	-	+	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	-	-	-	-	-	-
	Rosenhein	-	-	-	-	-	-
Quinonas	Medio ácido	-	-	-	-	-	-
	Medio básico	-	-	-	-	-	-
Isoprenoides	Karr-price	++	+	+	-	-	-
Esteroles	Lieberman- buchard	++	++	++	-	-	-
	Tortelli-jaffe	-	-	-	-	-	-
Carodiotonicos	Baljet	+++	-	+	-	-	-
	Legal	+++	-	+	++	++	+
	Kedde	+++	-	+	+	+	+
Desoxiazucares	Keller-illiani	+++	++	+	-	-	-
Azucares	Tollens	+++	+	+	+++	+	+
	Fehling	-	-	-	-	-	-
	Molish	+++	++	+	+	+	+
	Antrona	+++	+++	+++	-	-	+
Saponinas	Rosenthaler	+++	+++	+++	++	-	-
	Espuma	+	+	+	-	-	-
	Hemolisis	+++	+++	++	-	-	-
Sesquiterpen- lactonas	Hidroxamato Férrico	+	-	-	-	-	++
Coumarinas	Fluorescencia	++	+++	++	++	+	+
	Ehrlich	++	+	-	-	-	-
Alcaloides	Dragendorff	+++	++	+	-	-	-
	Wagner	++	++	-	-	-	-
	Bouchardat	++	+	-	-	-	-

#### 7.2.4. Extracto madre y fracciones de las flores a los 5 minutos de extracción asistida por ultrasonido

Tabla 8. Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto etanólico madre y sus fracciones de las flores con 5 minutos de extracción asistida por ultrasonido.

Metabolito	Prueba	Madre	Hexano	Dicloro- metano	Butanol	Acetato de etilo	Residuo
<b>Taninos</b>	FeCl <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-
	Acetato de Plomo	+	+	+	-	-	-
	Gelatina-sal	-	-	-	-	-	-
<b>Flavonoides</b>	Shinoda	-	-	-	-	-	-
	Rosenhein	-	-	-	-	-	-
<b>Quinonas</b>	Medio ácido	-	-	-	-	-	-
	Medio básico	-	-	-	-	-	-
<b>Isoprenoides</b>	Karr-price	++	+	+	-	-	-
<b>Esteroles</b>	Lieberman-buchard	+	++	-	-	-	-
	Tortelli-jaffe	-	-	-	-	-	-
<b>Carodiotonicos</b>	Baljet	++	-	+	-	-	-
	Legal	+++	+	+	+	+	+
	Kedde	+++	+	+	+	+	+
<b>Desoxiazucares</b>	Keller-Killiani	++	-	-	-	-	-
<b>Azucares</b>	Tollens	+++	+	+	+++	++	+
	Fehling	-	-	-	-	-	-
	Molish	+++	++	++	+	+	+
	Antrona	++	+++	+	+	-	-
<b>Saponinas</b>	Rosenthaler	++	+	+	-	-	-
	Espuma	+	-	-	-	-	-
	Hemolisis	+	+	+	-	-	-
<b>Sesquiterpen-lactonas</b>	Hidroxamato Férrico	+	-	-	-	+	+++
<b>Coumarinas</b>	Fluorescencia	+	-	-	-	-	-
	Ehrlich	-	-	-	-	-	-
<b>Alcaloides</b>	Dragendorff	+	+	-	-	-	+
	Wagner	+	+	-	-	-	-
	Bouchardat	++	+++	+	-	-	-

### 7.2.5. Extracto madre y fracciones de las flores a los 10 minutos de extracción asistida por ultrasonido

Tabla 9. Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto etanolico madre y sus fracciones de las flores con 10 minutos de extracción asistida por ultrasonido.

Metabolito	Prueba	Madre	Hexano	Dicloro- metano	Butanol	Acetato de etilo	Residuo
Taninos	FeCl <sub>3</sub>	+	+	+	-	-	-
	Acetato de Plomo	+	-	-	-	-	-
	Gelatina-sal	+	+	+	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	-	-	-	-	-	-
	Rosenhein	-	-	-	-	-	-
Quinonas	Medio ácido	-	-	-	-	-	-
	Medio básico	-	-	-	-	-	-
Isoprenoides	Karr-price	+++	+	+	-	-	-
Esteroles	Lieberman- buchard	+++	++	+	-	-	-
	Tortelli-jaffe	-	-	-	-	-	-
Carodiotonicos	Baljet	+++	+	+	-	-	-
	Legal	+++	+	+	+	+	+
	Kedde	+++	+	+	+	+	+
Desoxiazucares	Keller-Killiani	++	+	-	-	-	-
Azucares	Tollens	+++	+	+	+++	-	-
	Fehling	-	-	-	-	-	-
	Molish	+++	+++	+++	+	+	+
	Antrona	+	+++	+	-	-	-
Saponinas	Rosenthaler	+++	+	+	-	-	-
	Espuma	+	-	-	-	-	-
	Hemolisis	+++	++	++	+	-	-
Sesquiterpen- lactonas	Hidroxamato Férrico	+	-	-	-	+	+++
Coumarinas	Fluorescencia	+++	++	++	+++	+++	+++
	Ehrlich	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	Dragendorff	+++	++	+	+	-	+
	Wagner	+	+	-	-	-	-
	Bouchardat	++	+	+	+	-	-

### 7.2.6. Extracto madre y fracciones de las flores a los 15 minutos de extracción asistida por ultrasonido

Tabla 10. Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto etanolico madre y sus fracciones de las flores con 15 minutos de extracción asistida por ultrasonido.

Metabolito	Prueba	Madre	Hexano	Dicloro- metano	Butanol	Acetato de etilo	Residuo
Taninos	FeCl <sub>3</sub>	++	-	-	-	-	-
	Acetato de Plomo	++	-	-	-	-	-
	Gelatina-sal	++	-	-	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	-	-	-	-	-	-
	Rosenhein	-	-	-	-	-	-
Quinonas	Medio ácido	-	-	-	-	-	-
	Medio básico	-	-	-	-	-	-
Isoprenoides	Karr-price	+++	++	+	-	-	-
Esteroles	Lieberman-buchard	+	++	+	-	-	-
	Tortelli-jaffe	-	-	-	-	-	-
Carodiotonicos	Baljet	+++	-	-	-	-	-
	Legal	+	++	-	-	-	-
	Kedde	++	++	-	-	-	-
Desoxiazucares	Keller-killiani	+++	++	+	-	-	-
Azucares	Tollens	+++	+	+	+++	+	+
	Fehling	-	-	-	-	-	-
	Molish	+++	+++	+++	+	+	+
	Antrona	+	+	+	++	+++	+++
Saponinas	Rosenthaler	+++	+	+	-	-	-
	Espuma	+	-	-	-	-	-
	Hemolisis	+++	++	++	+	-	-
Sesquiterpen-lactonas	Hidroxamato Férrico	++	+	-	-	-	++
Coumarinas	Fluorescencia	+	+	+	+	+	+
	Ehrlich	+	+	-	-	-	-
Alcaloides	Dragendorff	++	+	-	-	-	-
	Wagner	+	-	-	-	-	-
	Bouchardat	++	+	+	-	-	-

**7.2.7. Extractos madres y fracciones (hojas y flores a diferentes tiempos):** según las tablas anteriores se pudo observar que no hubo diferencia de metabolitos secundarios para los extractos madres y sus fracciones entre las hojas y las flores. Además que el tiempo de extracción asistida por ultrasonido en el que se observan mejores resultados es a los 10 minutos en ambas partes de la planta, a los 5 y 15 minutos hay pruebas que dan dudosas y con menor cantidad cualitativa de metabolitos.

En cuanto al análisis preliminar de taninos en las hojas y en las flores, se obtuvieron resultados que son bastante dudosos en los extractos madres tanto de hojas como flores, además la prueba de tricloruro férrico no es confiable por la coloración verde de los extractos, las pruebas de gelatina-sal y acetato de plomo no muestran resultados coherentes entre sí. Por lo que se omite la presencia de taninos en la planta.

Se encontró la presencia de esteroides o del sistema anular del ciclopentanoperhidrofenantreno característico de estos, en las fracciones menos polares, esta prueba alcanza su coloración máxima aproximadamente a los 20 minutos persistiendo hasta los 30 minutos, este comportamiento es característico del colesterol y de los  $\Delta^5$ -esteroides. Debido a que la prueba de Tortelli-Jaffe dio negativa no se encontró la presencia de dobles enlaces diterciarios ni de 5,7-dienos. No se evidenció la presencia de flavonoides con el anillo de  $\gamma$ -benzopirona (prueba de Shinoda), ni del ion flavilio (prueba de Rosenhein).

Tampoco se evidenció la presencia de quinonas oxidadas o reducidas ya que no hubo ningún cambio en la presencia de un ácido fuerte ni una base.

Se encontró la presencia de glicosidos cardiotónicos y de azúcares.

Se detectó la presencia de saponinas esteroidales (Roshentaler y espuma), se confirmó con la prueba de hemólisis empleando un microscopio con objetivo 100x.

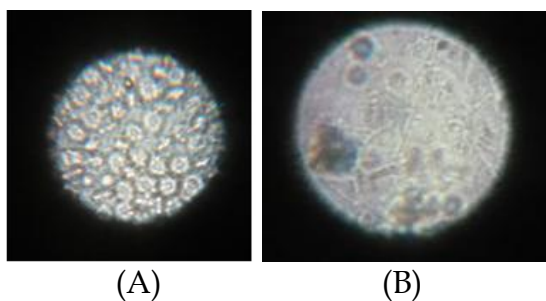


Figura 14. Prueba de hemólisis positiva para los extractos etanólicos madre de las hojas (A) Glóbulos rojos antes de ocurrir hemólisis, (B) Glóbulos rojos después de ocurrir hemólisis.

De acuerdo con las pruebas realizadas se observó la presencia de coumarinas, sesquiterpenlactonas y de alcaloides en los extractos. Aunque la presencia de las sesquiterpenlactonas en las hojas solo fue detectada en las fracciones de acetato de

etilo y en el residuo, esto se podría deber a un resultado falso positivo generado por la reacción del acetato de etilo con el reactivo de caracterización.

### **Análisis preliminar de heterosidos cianogenéticos**

Tabla 11. Prueba preliminar de heterosidos cianogenéticos del extracto etanólico madre de las hojas y las flores con 10 minutos de extracción asistida por ultrasonido.

Prueba	Hojas	Flores
Picrato alcalino	-	-

No se encontró la presencia de heterosidos cianogenéticos, ya que a las 24 horas no hubo coloración naranja o roja en el papel impregnado de picrato alcalino.

### **7.3. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA DL50 DE LOS EXTRACTOS EATNOLICOS MADRE Y SUS FRACCIONES DE HOJAS Y FLORES.**

Se utilizaron concentraciones desde 1000 hasta 5 ppm, realizando las lecturas a las 24 y 48 horas de cada uno de los extractos y de las fracciones obtenidas a una extracción asistida por ultrasonido de 10 minutos tanto de flores como de hojas.

En la tabla 12 se reporta la mortalidad de las *Artemias salinas* evaluadas frente al blanco (tween 80 al 0,5% en agua salada).

Tabla 12: Lectura de nauplius muertos para el ensayo de DL50 con el blanco tween 80 al 0,5%

Lectura de la mortalidad de 10 <i>Artemias salinas</i> por tubo Tween 80 al 0,5%		
24 horas		
1	2	3
0	0	1

La tabla 13 reporta los valores obtenidos de la mortalidad de las *Artemias salinas* a tiempos de evaluación de 24 y 48 horas para el extracto etanólico proveniente de las hojas de *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd, este experimento se realizo por triplicado para cada tiempo de expocision.

Tabla 13. Lectura de nauplius muertos para la determinación de la DL50 en el extracto etanolico madre de las hojas.

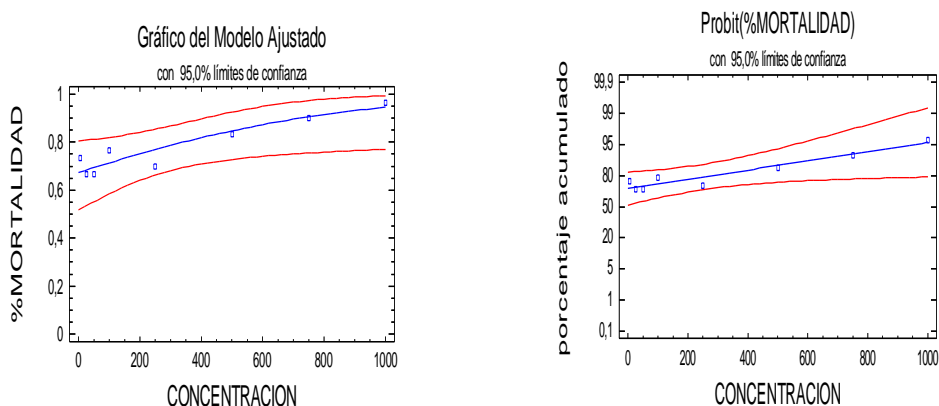
Concentración ppm	Lectura de la mortalidad de 10 <i>Artemias salinas</i> por tubo Extracto madre hojas					
	24 horas			48 horas		
	1	2	3	1	2	3
1000	5	5	4	10	9	9
750	4	6	4	9	10	8
500	4	1	1	9	8	8
250	0	2	0	7	8	6
100	0	1	3	9	6	8
50	0	0	0	8	6	6
25	1	1	1	6	6	8
5	1	0	0	8	7	7

Con los resultados obtenidos en la tabla 13 se calcula las variables indispensables para el análisis de bioactividad (tabla 14) de la *Artemia salina* usando el software STATGRAPHICS Plus Versión 5.1

Tabla 14. Análisis Probit para determinar la DL50 del extracto etanolico madre de las hojas a las 48 horas de ensayo.

Análisis Probit				
Extracto madre hojas a las 48 horas				
	Estimación	Estimación de error	Límite inferior	Límite superior
Constante	0,44909	0,208295	-0,0605911	0,958772
Concentración	0,00115032	0,000540058	-0,000171156	0,0024718
Análisis de desviación				
	Desviación	G.L	p-valor	
Modelo	5,13538	1	0,0234	
Residuos	0,712905	6	0,9942	
DL50	390,404 ppm			

Con los datos de porcentaje de mortalidad versus concentración se obtiene la figura 15 observando que en la izquierda la relación entre las variable no es lineal con una desviación estándar elevada (líneas rojas) por ello se debe llevar a un modelo lineal con el método Probit (grafica de la derecha).



Grafica 1. Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración del extracto etanólico total de las hojas de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluación.

El Probit realiza un ajuste lineal relacionando el logaritmo del DL50 de la dosis y la desviación típica arrojando una ecuación del modelo ajustado es:

$$\% \text{ Mortalidad} = 0,44909 + 0,00115032 * \text{Concentración}$$

Donde se observa que una dosis de cero no existe mortalidad. La ecuación enseña que el incremento de la dosis es lenta (pendiente) por lo tanto la concentración de la DL50 debe ser alta.

El contraste de significación que se utiliza en el método de probit es una comparación de frecuencias analizado por el estadístico chi cuadrado ( $\chi^2$ ), este compara la relación entre las frecuencias observadas con las esperadas, dando como prueba de hipótesis nula ( $H_0$ ): "La mortalidad entre las diferentes concentraciones es homogénea", como hipótesis alterna ( $H_1$ ): "La mortalidad entre las diferentes concentraciones es heterogénea", para comprobarlo debemos verificar que la  $H_0$  se rechaza si el  $\chi^2_{\text{calculado}} > \chi^2_{\text{crítico}}$ , donde el  $\chi^2_{\text{crítico}}$  se lee a los grados de libertad calculados para el extracto etanólico madre proveniente de las hojas de la planta, se observa en la tabla 14 que la desviación modelo (equivalente al chi cuadrado) es de 5,13538 con un grado de libertad (desviaciones independientes) al leerse el  $\chi^2_{\text{crítico}}$  con un límite de confianza del 95% es 3.84, corroborando que  $5,13538 > 3.84$ , por lo tanto la  $H_0$  se rechaza existiendo heterogeneidad entre las concentraciones. Un sustento igual lo genera la probabilidad (p-valor) que induce la posibilidad de rechazar una  $H_0$  cuando es verdadera, para el caso del modelo 0,0234 hay una probabilidad de que sea verdadera en un 2%, indicando que la concentración es significativa en el momento de predecir la mortalidad de la artemia, para el caso de los residuos el valor del estadístico y el p, hacen que la relación no tenga significancia en los resultados en



un modelo lineal, pudiéndose ajustarse a un modelo de regresión no lineal. El valor del percentil 50 (DL50) es igual a 390,404 ppm.

La tabla 15 muestra los resultados obtenidos del análisis con la artemia salina a diferentes concentraciones de la fracción obtenida con hexano para las hojas de *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd indicando la cantidad de nauplius muertos.

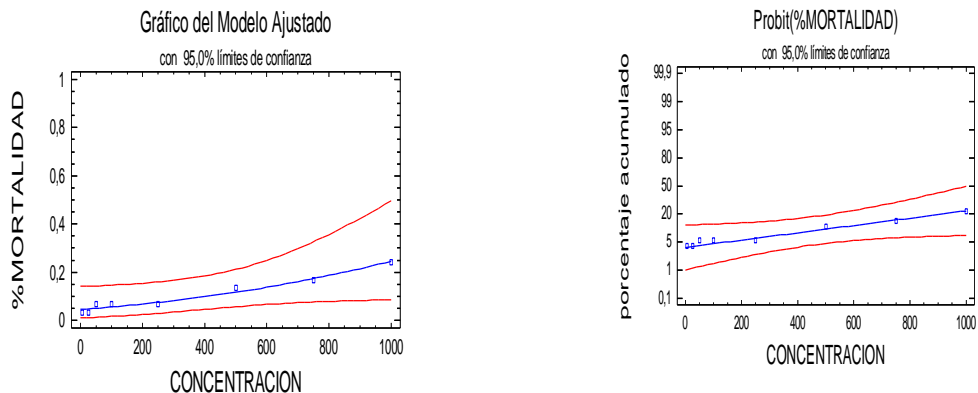
Tabla 15. Lectura de nauplius muertos para la determinación de la DL50 en la fracción de hexano de las hojas.

Concentración ppm	Lectura de la mortalidad de 10 <i>Artemias salinas</i> por tubo Fracción hexano hojas					
	24 horas			48 horas		
	1	2	3	1	2	3
1000	0	0	0	0	3	4
750	0	0	0	0	3	2
500	0	0	0	2	2	0
250	0	0	0	0	0	2
100	0	0	0	2	0	0
50	0	0	0	0	1	1
25	0	0	0	0	0	1
5	0	0	0	0	1	0

Con los resultados obtenidos en la tabla 15 se calcula las variables indispensables para el análisis de bioactividad (tabla 16) de la *Artemia salina* usando el software STATGRAPHICS Plus Versión 5.1

Tabla 16. Análisis Probit para determinar la DL50 de la fracción de hexano de las hojas a las 48 horas de ensayo.

Análisis Probit				
Fracción hexano hojas a las 48 horas				
	Estimación	Estimación de error	Límite inferior	Límite superior
Constante	-1,69472	0,315002	-2,4655	-0,923932
Concentración	0,00100479	0,000527585	-0,000286168	0,00229575
Análisis de desviación				
	Desviación	G.L	p-valor	
Modelo	3,7046	1	0,0543	
Residuos	0,201758	6	0,9998	
DL50	1686,64. ppm			



Grafica 2. Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración de la fracción obtenida con hexano de las hojas de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluación.

No fue posible realizar la lectura del análisis a las 24 horas ya que no hubo mortalidad de ninguna *Artemia* frente al extracto, así que solo fue posible analizarlo a las 48 horas, la lectura de estos datos permite deducir el modelo de regresión Probit realizando un ajuste lineal relacionando el logaritmo del DL50, de la dosis y su desviación típica, proporcionando la siguiente ecuación:

$$\%Mortalidad = -1,69472 + 0,00100479*Concentración$$

Dado que el p-valor para el modelo en la tabla del Análisis de la varianza Es inferior a 0.10, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables al 90% de nivel de confianza. El DL50 de la fracción de hexano de las hojas de *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd mostrado en la tabla 16 es de 1686,64 ppm.

En la tabla 17 se observan los resultados obtenidos de la mortalidad de las *Artemias salinas* para las diferentes concentraciones de la fracción obtenida con diclorometano de las hojas de *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd a las 24 y 48 horas de evaluación.

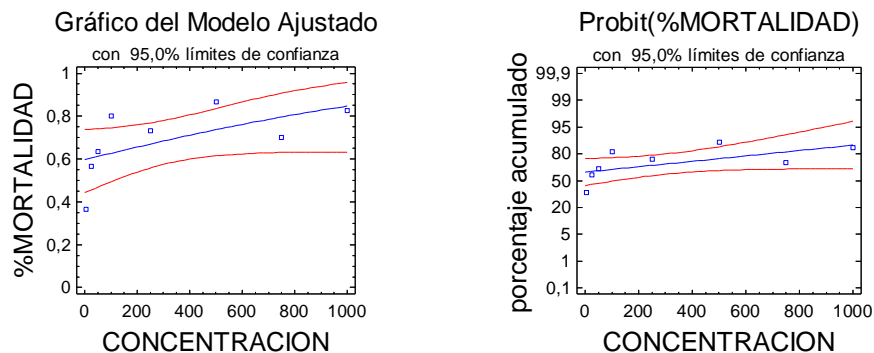
Tabla 17. Lectura de nauplius muertos para la determinación de la DL50 en la fracción de diclorometano de las hojas.

Concentración ppm	Lectura de la mortalidad de 10 <i>Artemias salinas</i> por tubo Fracción diclorometano hojas					
	24 horas			48 horas		
	1	2	3	1	2	3
1000	0	0	0	10	8	6
750	0	0	0	7	7	7
500	1	0	0	8	9	10
250	0	0	0	9	7	6
100	0	0	0	9	8	8
50	0	0	0	5	6	8
25	0	1	0	1	9	7
5	0	1	1	1	6	4

Con los resultados obtenidos en la tabla 17 se calcula las variables indispensables para el análisis de bioactividad (tabla 18) de la *Artemia salina*.

Tabla 18. Análisis Probit para determinar la DL50 de la fracción de diclorometano de las hojas a las 48 horas de ensayo.

Análisis Probit				
Fracción diclorometano hojas a las 48 horas				
	Estimación	Estimación de error	Límite inferior	Límite superior
Constante	0,245263	0,198771	-0,24113	0,73164
Concentración	0,000778114	0,00044878	-0,000320015	0,00187624
Análisis de desviación				
	Desviación	G.L	p-valor	
Modelo	3,22289	1	0,0726	
Residuos	5,39943	6	0,4937	
DL50	315,202 ppm			



Grafica 3. Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración de la fracción obtenida con diclorometano de las hojas de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluación.

No fue posible realizar la lectura del análisis a las 24 horas ya que no hubo mortalidad de ninguna *Artemia* frente al extracto obtenido con diclorometano, así que solo fue posible analizarlo a las 48 horas, la lectura de estos datos permite deducir el modelo de regresión Probit el cual realiza el ajuste lineal relacionando el logaritmo de DL50 de la dosis y su desviación típica proporcionando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Mortalidad} = 0,245263 + 0,000778114 * \text{Concentración}$$

Dado que el p-valor para el modelo en la tabla del análisis de la varianza Es inferior a 0.10, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables al 90 % de nivel de confianza.

La grafica 3 de la izquierda muestra el modelo sin ajustar, la de la derecha divulga la comparación del modelo ajustado donde la línea azul corresponde al modelo con un coeficiente de correlación cuadrado, las líneas rojas corresponden a las desviaciones equivalentes a los límites superior e inferior de cada punto del modelo. La DL50 es igual a 315,202 ppm.

En la tabla 19 se encuentran los valores de la mortalidad de la *Artemia salina* para la fracción de las hojas obtenidas con butanol para los dos tiempos exposición evaluados.

Tabla 19. Lectura de nauplius muertos para determinar la DL50 en la fracción de butanol de las hojas.

Concentración ppm	Lectura de la mortalidad de 10 <i>Artemias salinas</i> por tubo Fracción butanol hojas					
	48 horas			72 horas		
	1	2	3	1	2	3
1000	0	0	0	1	2	3
750	0	1	0	0	1	1
500	0	0	0	0	1	0
250	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0

No fue posible realizar la lectura del análisis Probit a las 48 y las 72 horas ya que la mortalidad fue demasiado baja frente al extracto, por lo que se dice que el extracto es completamente inofensivo para el crustáceo salino.

En la tabla 20 se reportan los valores obtenidos de la *Artemia salina* en diferentes concentraciones para la fracción proveniente de las hojas obtenida con acetato de etilo para tiempos de evaluación de 24 y 48 horas.

Tabla 20. Lectura de nauplius muertos para determinar la DL50 en la fracción de acetato de etilo de las hojas.

Concentración ppm	Lectura de la mortalidad de 10 <i>Artemias salinas</i> por tubo Fracción acetato de etilo hojas					
	24 horas			48 horas		
	1	2	3	1	2	3
1000	9	6	5	9	10	9
750	6	5	7	9	8	10
500	6	5	5	10	7	8
250	5	5	5	10	7	7
100	6	6	4	8	6	7
50	4	4	4	6	8	7
25	5	5	4	5	8	6
5	4	5	4	7	4	6

Con los resultados obtenidos en la tabla 17 se calcula las variables indispensables para el análisis de bioactividad (tabla 18) de la *Artemia salina*.

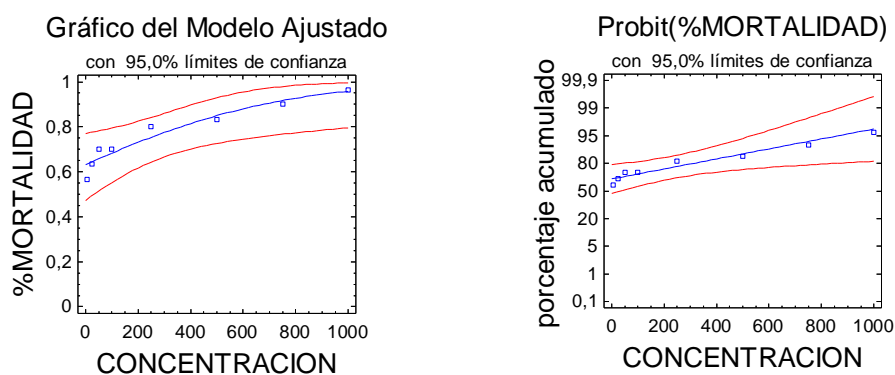
Tabla 21. Análisis Probit para determinar la DL50 de la fracción de acetato de etilo de las hojas a las 48 horas de ensayo.

Análisis Probit				
Fracción acetato de etilo hojas a las 48 horas				
	Estimación	Estimación de error	Límite inferior	Límite superior
Constante	0,335929	0,205935	-0167976	0,839835
Concentración	0,00139854	0,000562459	0,0000222445	0,00277483
Análisis de desviación				
	Desviación	G.L	p-valor	
Modelo	2,09619	1	0,0063	
Residuos	0,374175	6	0,9980	
DL50	240,201 ppm			

El probit realiza un ajuste lineal relacionando el logaritmo del DL50 de la dosis y su desviación típica proporcionando la siguiente ecuación:

$$\%Mortalidad = 0,335929 + 0,00139854 * Concentración$$

La ecuación anterior muestra que a una concentración de cero no se genera ningún porcentaje de mortalidad y el incremento de la misma no es muy lenta al aumentar la concentración, de este modo la dosis letal media del extracto es baja.



Grafica 4. Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración de la fracción obtenida con acetato de etilo de las hojas de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluación.

Dado que el p-valor para el modelo en la tabla del Análisis de la varianza Es inferior a 0.01, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables al 99% de nivel de confianza. El valor del percentil 50 (DL50) es igual a 240,201.

En la tabla 22 se observan los resultados para el ensayo con *Artemia salina* a tiempos de 48 y 72 horas de evaluación realizada por triplicado para la fracción residuo.

Tabla 22. Lectura de nauplius para determinar la DL50 muertos en el residuo de las hojas.

Concentración ppm	Lectura de la mortalidad de 10 <i>Artemias salinas</i> por tubo Residuo hojas					
	48 horas			72 horas		
	1	2	3	1	2	3
1000	0	0	1	0	2	2
750	0	0	0	0	1	2
500	0	0	0	0	1	1
250	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0

No fue posible realizar el análisis Probit a las 48 y las 72 horas ya que la mortalidad fue demasiado baja frente al extracto, dejando claro que esta fracción no es toxica para el crustáceo salino.

En la tabla 23 se observan los resultados de la mortalidad para las *Artemias salinas* a tiempos de exposición de 24 y 48 horas para el extracto etanolico total proveniente de las flores de *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd.

Tabla 23. Lectura de nauplius muertos para determinar la DL50 en el extracto madre de las flores.

Concentración ppm	Lectura de la mortalidad de 10 <i>Artemias salinas</i> por tubo Extracto madre flores					
	24 horas			48 horas		
	1	2	3	1	2	3
1000	3	0	5	9	9	10
750	1	1	4	9	10	9
500	2	4	3	9	8	9
250	3	3	2	8	8	9
100	3	1	2	7	9	8
50	4	0	3	6	7	7
25	2	1	1	8	7	7
5	3	1	2	6	7	7

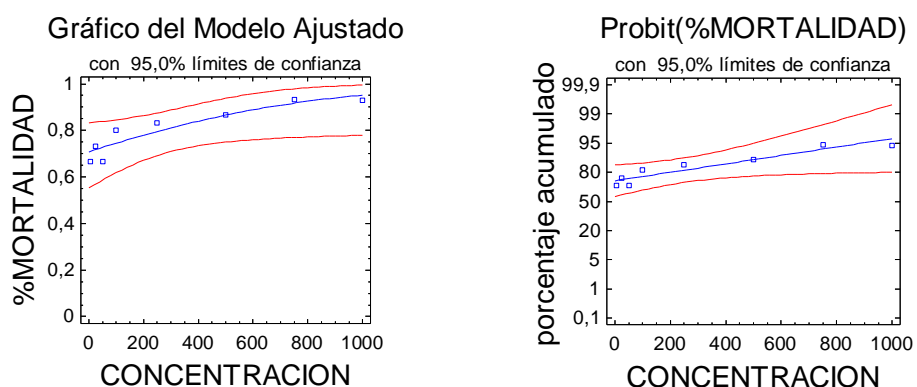
Con los resultados obtenidos en la tabla 23 se calcula las variables indispensables para el análisis de bioactividad (tabla 24) de la *Artemia salina*.

Tabla 24. Análisis Probit para determinar la DL50 del extracto madre de las flores a las 48 horas de ensayo.

Análisis Probit				
Extracto madre flores a las 48 horas				
	Estimación	Estimación de error	Límite inferior	Límite superior
Constante	0,547389	0,212767	0,00145387	1,04648
Concentración	0,00111843	0,000559412	-0,000151056	0,00277881
Análisis de desviación				
	Desviación	G.L	p-valor	
Modelo	4,69027	1	0,0303	
Residuos	0,656769	6	0,9954	
DL50	489,427 ppm			

En el análisis Probit se realizó el ajuste lineal relacionando el logaritmo del DL50, de la dosis y desviación típica, proporcionando la siguiente ecuación:

$$\%Mortalidad = 0,547389 + 0,00111843 * Concentración$$



Grafica 5. Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración del extracto etanólico total de las flores de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluación.

El contraste de significación que se utiliza en el método de probit es una comparación de frecuencias analizado por el estadístico chi cuadrado ( $\chi^2$ ), este compara la relación entre las frecuencias observadas con las esperadas, El valor del percentil 50 (DL50) es igual a 489,427.



En la tabla 25 se observan los resultados del conteo de *Artemias salinas* muertas con tiempos de evaluación a las 24 y 48 horas de exposición, con distintas concentraciones de la fracción extraída con hexano de las flores de *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd.

Tabla 25. Lectura de nauplius muertos para determinar la DL50 en la fracción de hexano de las flores.

Concentración ppm	Lectura de la mortalidad de 10 <i>Artemias salinas</i> por tubo Fracción hexano flores					
	24 horas			48 horas		
	1	2	3	1	2	3
1000	0	0	0	9	10	8
750	0	0	0	9	10	9
500	0	0	0	7	8	6
250	0	0	0	6	7	7
100	0	0	0	0	0	1
50	0	0	0	1	0	0
25	0	0	0	0	1	0
5	0	0	0	0	1	0

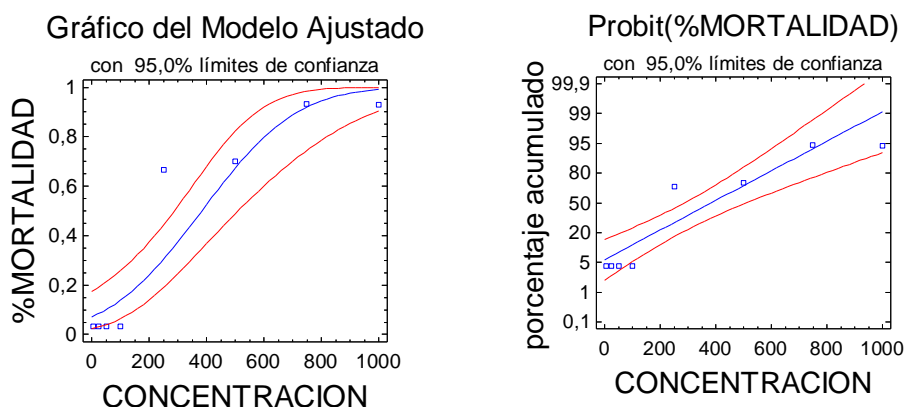
Con los resultados obtenidos en la tabla 25 se calcula las variables indispensables para el análisis de bioactividad (tabla 26) de la *Artemia salina*.

Tabla 26. Análisis Probit para determinar la DL50 de la fracción de hexano de las flores a las 48 horas de ensayo.

Análisis Probit				
Fracción hexano hojas a las 48 horas				
	Estimación	Estimación de error	Límite inferior	Límite superior
Constante	-1,4727	0,270071	-2,13354	-0,811859
Concentración	0,00383924	0,000703936	0,00211676	0,00556171
Análisis de desviación				
	Desviación	G.L	p-valor	
Modelo	52,4089	1	0,000	
Residuos	9,90911	6	0,1285	
DL50	383,592 ppm			

El ajuste lineal realizado por el Probit arrojó la siguiente ecuación de linealidad:

$$\%Mortalidad = -1,4727 + 0,00383924 * Concentración$$



Grafica 6. Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración de la fracción obtenida con hexano de las flores de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluación.

El valor del percentil 50 (DL50) es igual a 383,592.

En la tabla 27 se muestran los resultados obtenidos de la *Artemia salina* con la fracción de las flores obtenida con diclorometano a diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

Tabla 27. Lectura de nauplius muertos para determinar la DL50 en la fracción de diclorometano de las flores.

Concentración ppm	Lectura de la mortalidad de 10 <i>Artemias salinas</i> por tubo					
	Fracción diclorometano flores					
	48 horas			72 horas		
	1	2	3	1	2	3
1000	0	0	0	0	1	1
750	0	0	0	0	1	1
500	0	0	0	0	1	1
250	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	1	0
5	0	0	0	0	1	0

Debido a que la mortalidad fue bastante baja no se realizó el análisis Probit, dejando claro que esta fracción no posee ningún tipo de efecto tóxico para el crustáceo salino.

Los resultados para el análisis de la fracción obtenida con butanol de las flores de *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd se observa en la tabla 28 para los diferentes tiempos de exposición y las distintas concentraciones.

Tabla 28. Lectura de nauplius muertos para determinar la DL50 en la fracción de butanol de las flores.

Concentración ppm	Lectura de la mortalidad de 10 <i>Artemias salinas</i> por tubo					
	Fracción butanol flores					
	48 horas			72 horas		
	1	2	3	1	2	3
1000	0	0	0	0	1	3
750	0	0	0	0	0	2
500	0	0	0	0	0	0
250	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0

Debido a la baja mortalidad de las *Artemias* frente al extracto no se realizó el análisis Probit para este ensayo, dejando claro que este es inofensivo para el crustáceo salino.

En la tabla 29 se muestran los resultados del ensayo con *Artemia salina* evaluada frente a la fracción obtenida con acetato de etilo proveniente de las flores.

Tabla 29. Lectura de nauplius muertos para determinar la DL50 en la fracción de acetato de etilo de las flores.

Concentración ppm	Lectura de la mortalidad de 10 <i>Artemias salinas</i> por tubo					
	Fracción acetato de etilo flores					
	24 horas			48 horas		
	1	2	3	1	2	3
1000	2	4	1	8	8	9
750	2	5	3	8	8	9
500	1	2	2	8	8	8
250	1	3	1	8	8	8
100	0	1	2	7	8	8
50	1	0	1	6	6	7
25	0	2	0	5	4	5
5	1	1	0	5	4	3

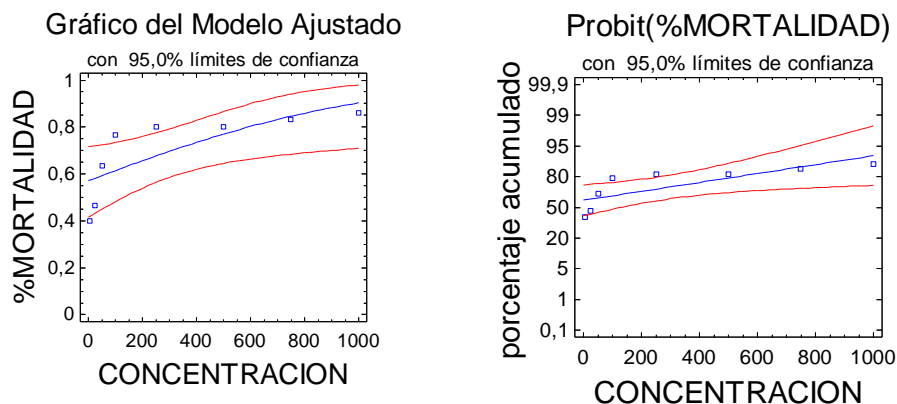
Con los resultados obtenidos en la tabla 29 se calcula las variables indispensables para el análisis de bioactividad (tabla 30) de la *Artemia salina*.

Tabla 30. Análisis Probit para determinar la DL50 de la fracción de acetato de etilo de las flores a las 48 horas de ensayo.

Análisis Probit				
Fracción acetato de etilo flores a las 48 horas				
	Estimación	Estimación de error	Límite inferior	Límite superior
Constante	0,17794	0,199197	-0,30948	0,665359
Concentración	0,00112242	0,000479964	-0,0000520103	0,00229686
Análisis de desviación				
	Desviación	G.L	p-valor	
Modelo	6,17768	1	0,0129	
Residuos	3,85642	6	0,6961	
DL50	158,532 ppm			

El ajuste lineal realizado por el Probit arrojó la siguiente ecuación:

$$\% \text{Mortalidad} = 0,17794 + 0,00112242 * \text{Concentración}$$



Grafica 7. Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración de la fracción obtenida con acetato de etilo de las flores de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluación.

El valor del percentil 50 (DL50) es igual a 158,532.

En la tabla 24 se encuentran los resultados de la mortalidad de *Artemia salina* frente a la fracción residuo de las flores.

Tabla 31. Lectura de nauplius muertos para determinar la DL50 en el residuo de las flores.

Concentración ppm	Lectura de la mortalidad de 10 <i>Artemias salinas</i> por tubo Residuo flores					
	24 horas			48 horas		
	1	2	3	1	2	3
1000	1	0	1	9	10	9
750	0	0	3	6	9	5
500	0	1	2	8	9	6
250	1	0	0	6	5	5
100	1	0	0	8	4	4
50	0	0	1	4	3	5
25	1	0	0	5	4	3
5	1	0	0	3	4	3

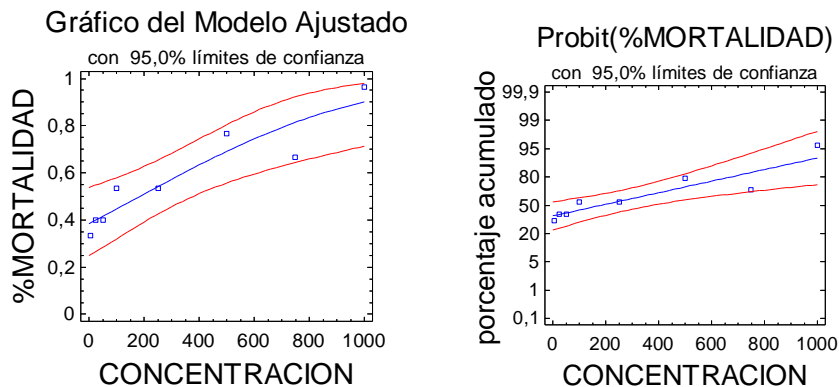
Con base a los resultados obtenidos en la tabla 31 se calcula las variables indispensables para el análisis de bioactividad (tabla 32) de la *Artemia salina*.

Tabla 32. Análisis Probit para determinar la DL50 del residuo de las flores a las 48 horas.

Análisis Probit				
Residuo flores a las 48 horas				
	Estimación	Estimación de error	Límite inferior	Límite superior
Constante	-0,292234	0,198451	-0,777828	0,193359
Concentración	0,00158274	0,0004725	0,000426575	0,00273891
Análisis de desviación				
	Desviación	G.L	p-valor	
Modelo	12,6583	1	0,0004	
Residuos	2,56205	6	0,8615	
DL50	184,638 ppm			

El ajuste lineal realizado por el Probit arrojó la ecuación:

$$\% \text{Mortalidad} = -0,292234 + 0,00158274 * \text{Concentración}$$



Grafica 8. Relación del porcentaje de mortalidad versus la concentración el residuo de las flores de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd a las 48 horas de evaluación.

El valor del percentil 50 (DL50) es igual a 184,638.

#### 7.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS MADRE DE LAS FLORES Y LAS HOJAS.

Los halos de inhibición fueron medidos en milímetros (mm), se utilizaron como controles positivos el antimicótico Fluconazol a 10.000 ppm para *Candida albicans*, los antimicrobianos Ciprofloxacina a 10.000 ppm para *Escherichia coli* y Ampicilina a 5.000 ppm para *Staphylococcus aureus*. El ensayo se realizo por triplicado para mejores resultados.

Tabla 33. Diámetros de los halos de inhibición de los extractos etanolicos madre de hojas y flores por el método de punción de agar.

Microorganismo	Diámetros de los halos de inhibición (mm) a las 24 horas											
	C+			C-			MH			MF		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>Candida albicans</i>	25	25	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	10	11	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> .	5	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C+: control positivo (fluconazol, ciprofloxacina, ampicilina), C- control negativo: tween 80 al 0,5%, MH: extracto etanolico madre hojas, MF: extracto etanolico madre flores.

Se observó que la actividad de los extractos etanolicos madre de las hojas y las flores fue completamente nulo. El único halo de inhibición que se observo fue el del antimicótico y el de los dos antimicrobianos, es decir, los controles positivos, el control negativo no influencia en nada ya que tampoco dio halo de inhibición.

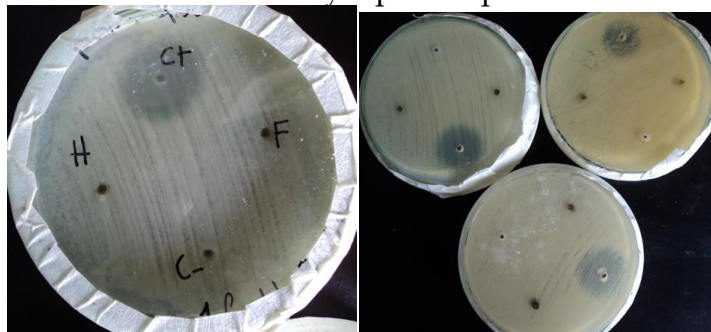


Figura 16. Actividad antimicótica de los extractos etanolicos madre de hojas y flores empleando el método de punción en agar con *Candida albicans*. Los halos de inhibición observados corresponden al control positivo (fluconazol 10.000 ppm).



Figura 17: Actividad antimicrobiana de los extractos etanolicos madre de hojas y flores empleando el método de punción en agar con *Escherichia coli*. Los halos de inhibición observados corresponden al control positivo (ciprofloxacina 10.000 ppm).

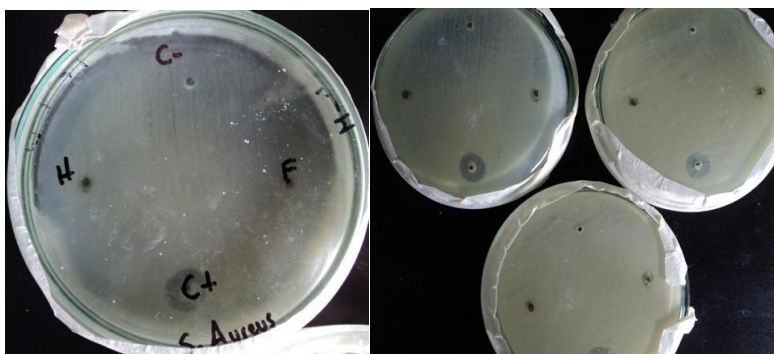


Figura 18: Actividad antimicrobiana de los extractos etanolicos madre de hojas y flores empleando el método de punción en agar con *Staphylococcus aureus*. Los halos de inhibición observados corresponden al control positivo (ampicilina 5.000 ppm).

## 7.5. DETERMINACION DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS MADRES Y SUS FRACCIONES.

### 7.5.1. Células BHK

Al iniciar el ensayo las células se encontraban formando una monocapa y con las membranas celulares bien definidas como se muestra a continuación.

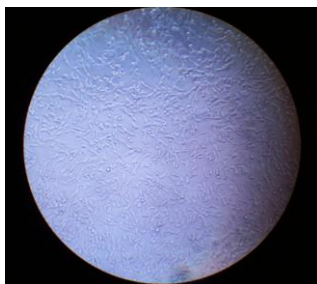


Figura 19. Células de BHK formando monocapa al iniciar el ensayo de citotoxicidad.

Al terminar el ensayo después de las 24 horas de haber adicionado la rezasurina se pudo observar un cambio de coloración evidente en algunos de los extractos tanto de flores como de las hojas y de las flores.

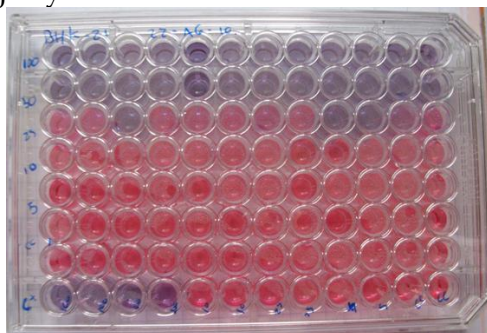


Figura 20. Cambio de coloración de la rezasurina de azul a rosa causado por las células de BHK viables.

En los pozos que no presentaron cambio de coloración (color azul), se observó un cambio en la morfología de las células y no fue posible observar la distribución en monocapa. Esto se debe a la posible inactivación de los procesos metabólicos de las células o a su muerte.

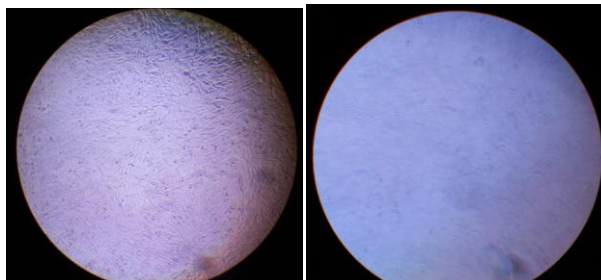


Figura 21. Células de BHK antes y después del ensayo con los extractos etanólicos totales y sus fracciones.



En la tabla 34 se observan los resultados obtenidos para el extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas por el método fluorométrico indirecto de reducción de Resazurina, determinada por el valor de la densidad óptica tomada a 570 nm.

#### 7.5.1.1. Densidad óptica de las células de BHK a 570nm de hojas.

Tabla 34. Determinación de la densidad óptica para las células de BHK a 570 nm del extracto etanolico total y sus fracciones para las hojas de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd.

HOJAS BHK		
DO(570nm)	Volumen (µL)	Extracto
0,499	100	ET
0,461	50	ET
0,643	25	ET
0,425	10	ET
0,451	5	ET
0,504	100	F. H
0,432	50	F. H
0,658	25	F. H
0,43	10	F. H
0,413	5	F. H
0,51	100	F. D
0,43	50	F. D
0,594	25	F. D
0,461	10	F. D
0,37	5	F. D
0,435	100	F. B
0,425	50	F. B
0,461	25	F. B
0,455	10	F. B
0,394	5	F. B
0,494	100	F. Ac
0,457	50	F. Ac
0,644	25	F. Ac
0,446	10	F. Ac
0,392	5	F. Ac
0,533	100	R
0,455	50	R
0,671	25	R
0,482	10	R
0,447	5	R

HOJAS BHK		
DO(570nm)	Volumen (µL)	Extracto
0	100	B
0	50	B
0	25	B
0	10	B
0	5	B
0,45	100	C-
0,402	50	C-
0,363	25	C-
0,392	10	C-
0,428	5	C-
0,589	100	C+
0,467	50	C+
0,462	25	C+
0,491	10	C+
0,445	5	C+

DO: densidad óptica, ET: extracto total, F.H: fracción hexano, F.B: fracción butanol, F. Ac: fracción acetato de etilo, R: residuo. B: blanco (agua estéril), C+: control positivo (etanol al 20%), C-: control negativo (solo células)

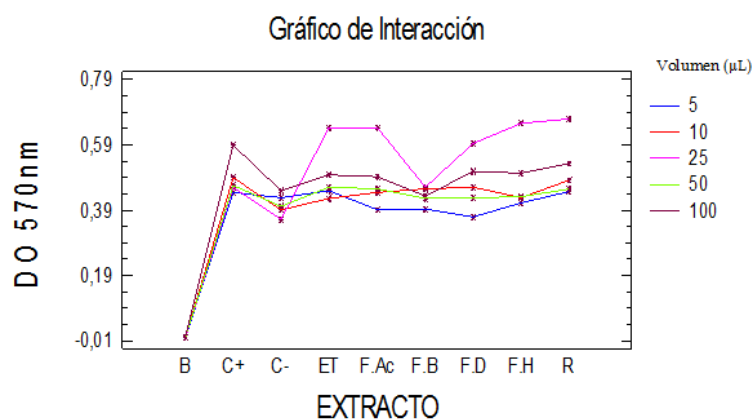
En la tabla 35 se encuentra el análisis de varianza para los resultados obtenidos en la tabla 34

Tabla 35. Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de BHK a 570 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas.

Análisis de varianza para las células de BHK a 570nm					
	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medio	cociente F	p-valor
<b>Extracto</b>	1,0441	8	0,130512	44,11	0,000
<b>Concentración</b>	0,0958303	4	0,0239576	8,10	0,001
<b>Residuos</b>	0,0946769	32	0,00295865		
<b>Total</b>	1,23461	44			

El análisis de varianza multifactorial realizado plantea una hipótesis nula ( $H_0$ ): “la inhibición de los procesos metabólicos o mortalidad de las células de BHK es homogénea para todos los extractos”, como hipótesis altera ( $H_1$ ): “la inhibición de los procesos metabólicos o mortalidad de las células de BHK para todos los extractos es heterogénea”, para comprobarlo debemos verificar que la  $H_0$  rechaza si el coeficiente  $F_{calculado} > F_{critico}$  donde  $44,11 > 1,2$  (valor teórico para ensayo a dos colas) por lo tanto  $H_0$  se rechaza existiendo heterogeneidad entre los extractos, siendo más evidente el efecto entre los diferentes tipos de extractos que la concentraciones pudiéndose evidenciar que la naturaleza de los metabolitos tienen el efecto más significativo en la mortalidad de las células, además que la prueba del p-valor lo confirma ya que el porcentaje de verdad de la hipótesis nula es cero por lo tanto la hipótesis alterna tiene el efecto entre las interacciones.

La comparación de los extractos frente a la densidad óptica se observa en la grafica 9, donde cada línea corresponde a un volumen adicionado de los extractos en microlitros versus la densidad óptica.



Grafica 9. Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de BHK a 570 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas.

En la tabla 39 se observan los resultados obtenidos para la determinación de la densidad óptica para el extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas a 630nm con células de BHK.

#### 7.5.1.2. Densidad óptica de las células de BHK a 630 nm de hojas.

Tabla 36. Determinación de la densidad óptica para las células de BHK a 630 nm del extracto etanólico total y sus fracciones para las hojas de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd.

HOJAS BHK			HOJAS BHK		
DO (630nm)	Volumen (μL)	Extracto	DO (630nm)	Volumen (μL)	Extracto
0,109	100	ET	0	100	B
0,122	50	ET	0	50	B
0,036	25	ET	0	25	B
-0,002	10	ET	0	10	B
-0,001	5	ET	0	5	B
0,118	100	F. H	0,004	100	C-
0,106	50	F. H	0,015	50	C-
0,028	25	F. H	-0,001	25	C-
0,007	10	F. H	-0,003	10	C-
0,011	5	F. H	0,003	5	C-
0,102	100	F. D	0,14	100	C+
0,017	50	F. D	0,109	50	C+
0,007	25	F. D	0,013	25	C+
-0,066	10	F. D	0	10	C+
0,004	5	F. D	0,008	5	C+
0,086	100	F. B			
0,111	50	F. B			
0,11	25	F. B			
0,004	10	F. B			
0,004	5	F. B			
0,117	100	F. Ac			
0,132	50	F. Ac			
0,016	25	F. Ac			
0,008	10	F. Ac			
0,008	5	F. Ac			
0,127	100	R			
0,123	50	R			
0,008	25	R			
0,002	10	R			
-0,001	5	R			

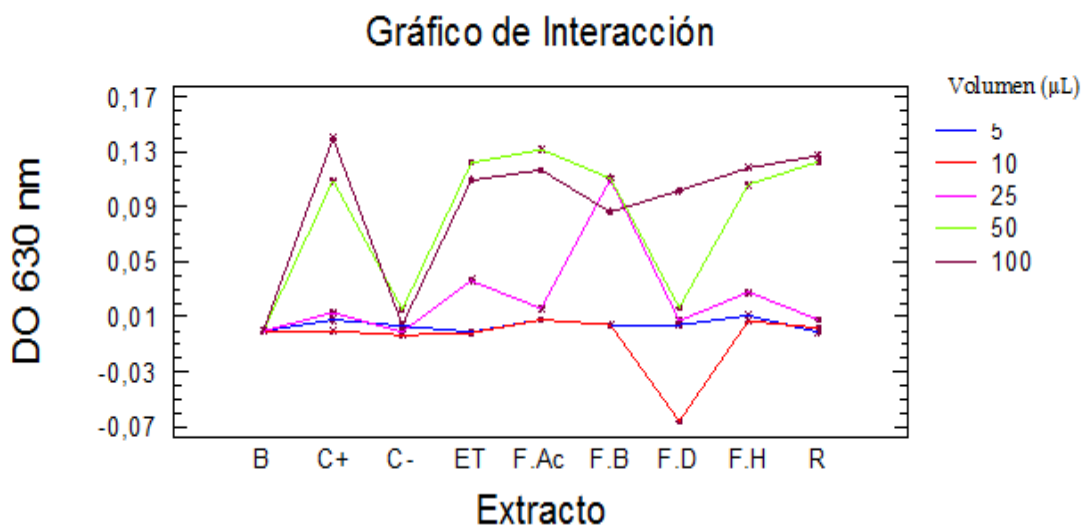
DO: densidad óptica, ET: extracto total, F.H: fracción hexano, F.B: fracción butanol, F. Ac: fracción acetato de etilo, R: residuo. B: blanco (agua estéril), C+: control positivo (etanol al 20%), C-: control negativo (solo células)

En la tabla 37 se encuentran los resultados para el análisis de varianza de los resultados de la tabla 36.

Tabla 37. Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de BHK a 630 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas.

Análisis de varianza para las células de BHK a 630 nm					
	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medio	cociente F	p-valor
<b>Concentración</b>	0,069967	4	0,0174917	16,99	0,0000
<b>Extracto</b>	0,0256792	8	0,00320991	3,12	0,0101
<b>Residuos</b>	0,0329374	32	0,00102929		
<b>Total</b>	0,128584	44			

La comparación de los extractos se observa en la grafica 10 donde cada línea corresponde a un volumen adicionado en microlitros versus la densidad óptica a 630 nm.



Grafica 10. Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de BHK a 630 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas.

En la tabla 38 se encuentran los valores de la densidad óptica para el extracto etanólico total y las fracciones provenientes de las flores, para las células de BHK a 570 nm.

### 7.5.1.3. Densidad óptica de las células de BHK a 570 nm de flores.

Tabla 38. Determinación de la densidad óptica para las células de BHK a 570 nm del extracto etanólico total y sus fracciones para las flores de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd.

FLORES BHK		
DO(570nm)	Volumen (μL)	Extracto
0,47	100	ET
0,545	50	ET
0,789	25	ET
0,511	10	ET
0,496	5	ET
0,487	100	F. H
0,496	50	F. H
0,618	25	F. H
0,438	10	F. H
0,437	5	F. H
0,512	100	F. D
0,497	50	F. D
0,492	25	F. D
0,386	10	F. D
0,41	5	F. D
0,511	100	F. B
0,426	50	F. B
0,481	25	F. B
0,443	10	F. B
0,384	5	F. B
0,562	100	F. Ac
0,47	50	F. Ac
0,602	25	F. Ac
0,303	10	F. Ac
0,393	5	F. Ac
0,508	100	R
0,445	50	R
0,666	25	R
0,449	10	R
0,38	5	R

FLORES BHK		
DO(570nm)	Volumen (μL)	Extracto
0	100	Blanco
0	50	Blanco
0	25	Blanco
0	10	Blanco
0	5	Blanco
0,45	100	C-
0,402	50	C-
0,363	25	C-
0,392	10	C-
0,428	5	C-
0,589	100	C+
0,467	50	C+
0,462	25	C+
0,491	10	C+
0,445	5	C+

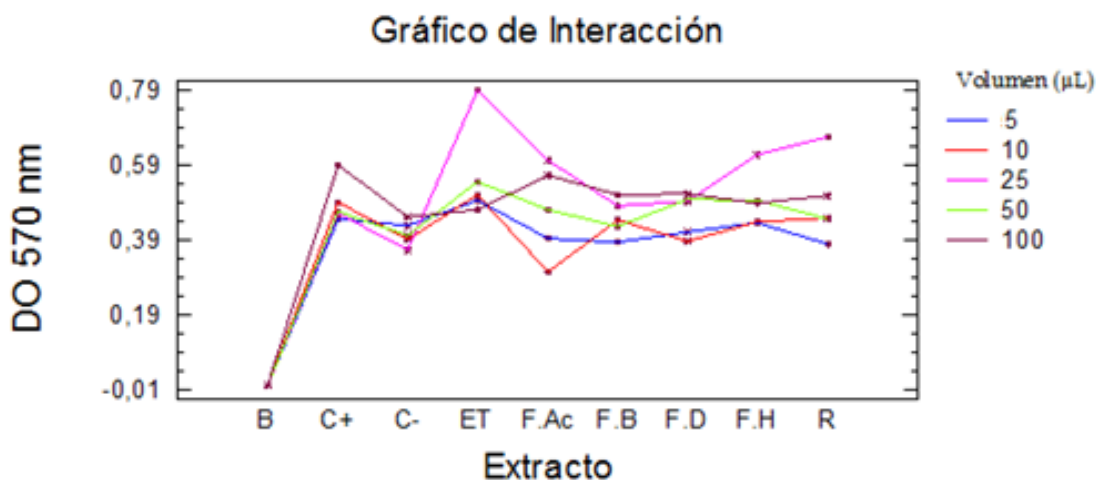
DO: densidad óptica, ET: extracto total, F.H: fracción hexano, F.B: fracción butanol, F. Ac: fracción acetato de etilo, R: residuo. B: blanco (agua estéril), C+: control positivo (etanol al 20%), C-: control negativo (solo células)

En la tabla 39 se observa el analisis de varianza para los resultados obtenidos en la tabla 38.

Tabla 39. Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de BHK a 570 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las flores

Análisis de varianza para las células de BHK a 570 nm					
	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medio	cociente F	p-valor
<b>Concentración</b>	0,096601	4	0,0241502	5,54	0,0017
<b>Extracto</b>	1,0832	8	0,1354	31,06	0,0000
<b>Residuos</b>	0,139518	32	0,00435993		
<b>Total</b>	1,31932	44			

La comparación de los extractos se observa en la grafica 11 donde cada línea corresponde a un volumen adicionado en microlitros versus la densidad óptica a 570 nm.



Grafica 11. Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de BHK a 570 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las flores.

En la tabla 40 se muestran los resultados obtenidos de la densidad óptica de cada uno de los extractos de las flores a 630 nm para las células de BHK.

#### 7.5.1.4. Densidad óptica de las células de BHK a 630 nm de flores.

Tabla 40. Determinación de la densidad óptica para las células de BHK a 630 nm del extracto etanólico total y sus fracciones para las flores de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd.

FLORES BHK		
DO(630nm)	Volumen (μL)	Extracto
0,086	100	ET
0,126	50	ET
0,029	25	ET
-0,002	10	ET
0	5	ET
0,106	100	F. H
0,133	50	F. H
0,06	25	F. H
0,001	10	F. H
0,04	5	F. H
0,11	100	F. D
0,123	50	F. D
0,122	25	F. D
-0,007	10	F. D
-0,003	5	F. D
0,122	100	F. B
0,102	50	F. B
0,116	25	F. B
0,017	10	F. B
-0,002	5	F. B
0,13	100	F. Ac
0,115	50	F. Ac
0,012	25	F. Ac
0	10	F. Ac
-0,007	5	F. Ac
0,113	100	R
0,107	50	R
0,053	25	R
0,017	10	R
0,006	5	R

FLORES BHK		
DO (630nm)	Volumen (μL)	Extracto
0	100	Blanco
0	50	Blanco
0	25	Blanco
0	10	Blanco
0	5	Blanco
0,004	100	C-
0,015	50	C-
-0,001	25	C-
-0,003	10	C-
0,003	5	C-
0,14	100	C+
0,109	50	C+
0,013	25	C+
0	10	C+
0,008	5	C+

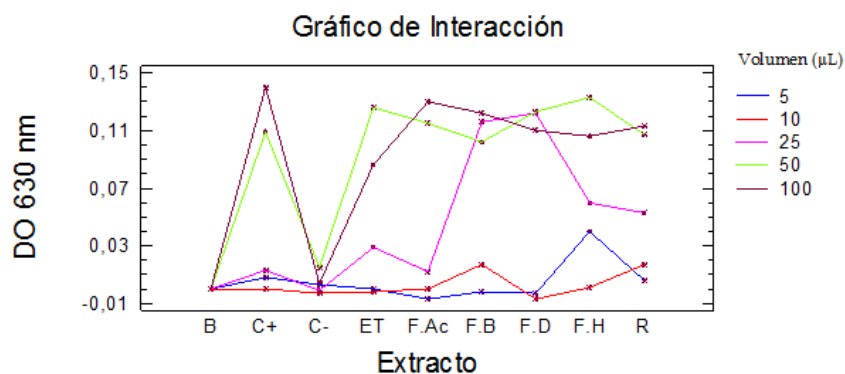
DO: densidad óptica, ET: extracto total, F.H: fracción hexano, F.B: fracción butanol, F. Ac: fracción acetato de etilo, R: residuo. B: blanco (agua estéril), C+: control positivo (etanol al 20%), C-: control negativo (solo células)

En la tabla 41 se encuentran los resultados del análisis de varianza para los resultados obtenidos en la tabla 40.

Tabla 41. Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de BHK a 630 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las flores

Análisis de varianza para las células de BHK a 630 nm					
	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medio	cociente F	p-valor
<b>Concentración</b>	0,0688264	4	0,0172066	17,18	0,0000
<b>Extracto</b>	0,0290051	8	0,00362564	3,62	0,0042
<b>Residuos</b>	0,0320464	32	0,00100145		
<b>Total</b>	0,129878	44			

Las interacciones obtenidas de cada uno de los extractos con respecto al blanco se observan en el grafico 12.



Grafica 12. Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de BHK a 630 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las flores.

Para este ensayo se observó que a 100 y 50 µL la inhibición de la propagación y posiblemente del metabolismo celular se debió al etanol al 20% en todas las fracciones, ya que el control positivo no presentó cambio de coloración a las 24 horas, siendo muestra clara de la muerte o inhibición de los procesos metabólicos, ya que solo las células vivas pueden cambiar de color el medio de azul a rosa. Únicamente a partir de los 25 µL el control positivo presentó cambio del medio alamarblue o resazurina, por lo tanto las fracciones que dieron resultados positivos fueron butanol hojas, butanol y diclorometano flores, aunque la fracción de hexano y etanol flores trató de dar positivo, ya que se observó un leve cambio en la coloración. Las demás fracciones no presentaron efecto citotóxico sobre las células de BHK. Según las gráficas observadas todos los extractos presentaron una actividad citotóxica muy similar.



### 7.5.2. Células Mieloma Murino.

Al igual que en las células de BHK, al iniciar el ensayo para la determinación de la citotoxicidad, las células de Mieloma Murino se encontraban formando monocapa y con las membranas bien definidas como se observa a continuación.

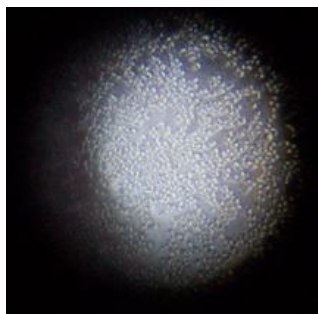


Figura 22. Células de Mieloma Murino formando monocapa antes de iniciar el ensayo de citotoxicidad.

Al terminar el ensayo después de las 24 horas de haber adicionado la rezasurina se pudo observar un cambio de coloración evidente en algunos de los extractos tanto de flores como de las hojas y de las flores.



Figura 23. Cambio de coloración de la rezarsurina de azul a rosa en células de Mieloma Murino

En los pozos que no presento cambio de coloración (color azul- violeta), se observo un cambio en la morfología de las células y no fue posible observar la distribución en monocapa. Esto se debe a la posible inactivación de los procesos metabólicos de las células o a su muerte.

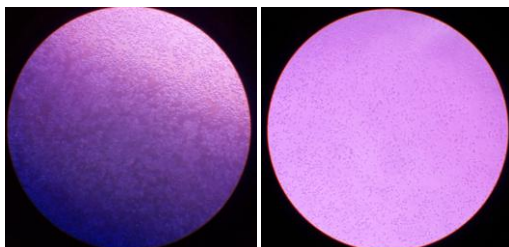


Figura 24. Células de Mieloma Murino antes y después del ensayo con los extractos madre y sus fracciones.

En la tabla 42 se observan los resultados obtenidos de la densidad óptica para los extractos de las hojas a 570 nm con células de mieloma murino.

### 7.5.2.1. Densidad óptica de las células de Mieloma Murino a 570 nm.

Tabla 42. Determinación de la densidad óptica para las células de Mieloma murino a 570 nm del extracto etanolico total y sus fracciones para las hojas de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd

HOJAS MIELOMA MURINO			HOJAS MIELOMA MURINO		
DO(570nm)	Volumen (μL)	Extracto	DO(570nm)	Volumen (μL)	Extracto
0,307	100	ET	0	100	B
0,282	50	ET	0	50	B
0,476	25	ET	0	25	B
0,47	10	ET	0	10	B
0,452	5	ET	0	5	B
0,278	100	F. H	0,517	100	C-
0,211	50	F. H	0,498	50	C-
0,521	25	F. H	0,389	25	C-
0,463	10	F. H	0,48	10	C-
0,515	5	F. H	0,391	5	C-
0,319	100	F. D	0,228	100	C+
0,305	50	F. D	0,44	50	C+
0,531	25	F. D	0,506	25	C+
0,501	10	F. D	0,476	10	C+
0,515	5	F. D	0,493	5	C+
0,302	100	F. B			
0,262	50	F. B			
0,379	25	F. B			
0,502	10	F. B			
0,489	5	F. B			
0,32	100	F. Ac			
0,286	50	F. Ac			
0,431	25	F. Ac			
0,456	10	F. Ac			
0,476	5	F. Ac			
0,302	100	R			
0,301	50	R			
0,544	25	R			
0,543	10	R			
0,528	5	R			

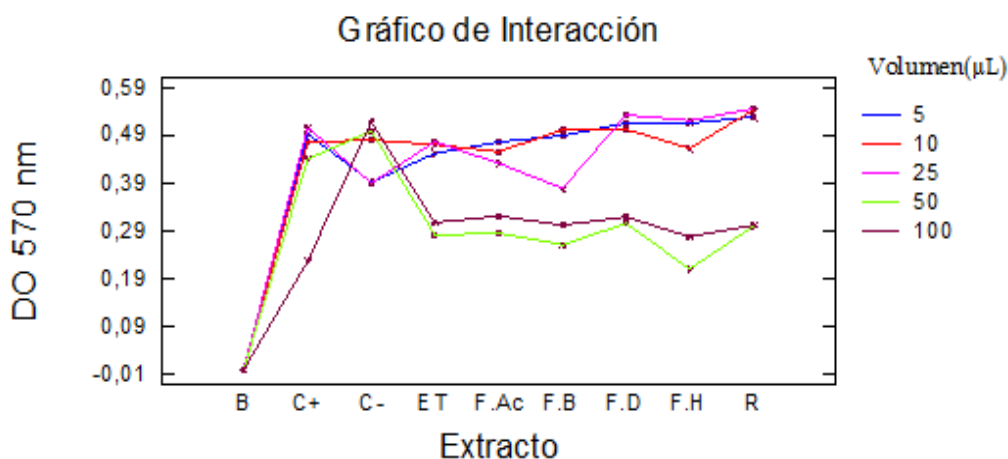
DO: densidad óptica, ET: extracto total, F.H: fracción hexano, F.B: fracción butanol, F. Ac: fracción acetato de etilo, R: residuo. B: blanco (agua estéril), C+: control positivo (etanol al 20%), C-: control negativo (solo células)

En la tabla 43 se encuentra el análisis de varianza para los resultados obtenidos en la tabla 42.

Tabla 43. Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de Mieloma murino a 570 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas

Análisis de varianza para las células de Mieloma Murino a 570 nm					
	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medio	cociente F	p-valor
<b>Concentración</b>	0,797267	4	0,0996583	19,25	0,0000
<b>Extracto</b>	0,213578	8	0,0533944	10,31	0,0000
<b>Residuos</b>	0,165691	32	0,00517786		
<b>Total</b>	1,17654	44			

Las interacciones obtenidas de cada uno de los extractos con respecto al blanco se observan en el grafico 13.



Grafica 13. Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de Mieloma murino a 570 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas.

En la tabla 44 se observan los resultados para la densidad óptica de los extractos de las hojas a 630 nm con células de mieloma murino

### 7.5.2.2. Densidad óptica de las células de Mieloma Murino a 630 nm de hojas

Tabla 44. Determinación de la densidad óptica para las células de Mieloma murino a 630 nm del extracto etanolico total y sus fracciones para las hojas de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd.

HOJAS MIELOMA MURINO			HOJAS MIELOMA MURINO		
DO (630nm)	Volumen(μL)	Extracto	DO (630nm)	Volumen (μL)	Extracto
0,121	100	ET	0	100	B
0,141	50	ET	0	50	B
0,013	25	ET	0	25	B
0,002	10	ET	0	10	B
0,005	5	ET	0	5	B
0,108	100	F. H	-0,003	100	C-
0,095	50	F. H	0,067	50	C-
0,009	25	F. H	-0,002	25	C-
-0,002	10	F. H	0,019	10	C-
0,019	5	F. H	0,005	5	C-
0,13	100	F. D	0,002	100	C+
0,134	50	F. D	0,028	50	C+
0,014	25	F. D	0,0026	25	C+
0	10	F. D	-0,004	10	C+
0,006	5	F. D	0	5	C+
0,12	100	F. B			
0,125	50	F. B			
0,013	25	F. B			
-0,09	10	F. B			
0,005	5	F. B			
0,11	100	F. Ac			
0,1	50	F. Ac			
0,093	25	F. Ac			
0,082	10	F. Ac			
-0,001	5	F. Ac			
0,109	100	R			
0,107	50	R			
0,013	25	R			
0,01	10	R			
0,004	5	R			

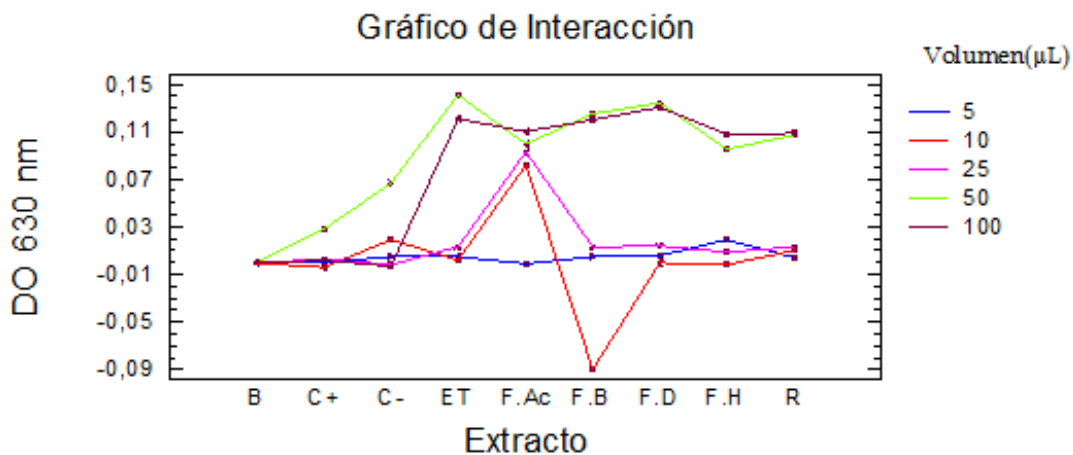
DO: densidad óptica, ET: extracto total, F.H: fracción hexano, F.B: fracción butanol, F. Ac: fracción acetato de etilo, R: residuo. B: blanco (agua estéril), C+: control positivo (etanol al 20%), C-: control negativo (solo células)

En la tabla 45 se observan los resultados para el análisis de varianza de los datos que se encuentran en la tabla 44.

Tabla 45. Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de Mieloma murino a 630 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas.

<b>Análisis de varianza para las células de Mieloma Murino a 630 nm</b>					
	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medio	cociente F	p-valor
<b>Concentración</b>	0,0625357	4	0,0156339	11,89	0,0000
<b>Extracto</b>	0,0265042	8	0,00331302	2,52	0,0300
<b>Residuos</b>	0,0420603	32	0,00131438		
<b>Total</b>	0,1311	44			

Las interacciones de los extractos a distintos microlitros frente a la densidad óptica se observa en la grafica 14.



Grafica 14. Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de mieloma murino a 630 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las hojas.

En la tabla 46 se muestran los resultados de la densidad óptica a 570nm obtenidos para los extractos de las flores a 570 nm con células de mieloma murino.

### 7.5.2.3. Densidad óptica de las células de Mieloma Murino a 570 nm de flores

Tabla 46. Determinación de la densidad óptica para las células de Mieloma murino a 570 nm del extracto etanólico total y sus fracciones para las flores de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd.

FLORES MIELOMA MURINO		
DO(570nm)	Volumen(μL)	Extracto
0,324	100	ET
0,352	50	ET
0,592	25	ET
0,989	10	ET
0,894	5	ET
0,339	100	F. H
0,269	50	F. H
0,554	25	F. H
0,873	10	F. H
0,577	5	F. H
0,324	100	F. D
0,288	50	F. D
0,343	25	F. D
0,558	10	F. D
0,521	5	F. D
0,238	100	F. B
0,209	50	F. B
0,236	25	F. B
0,399	10	F. B
0,442	5	F. B
0,242	100	F. Ac
0,218	50	F. Ac
0,436	25	F. Ac
0,399	10	F. Ac
0,443	5	F. Ac
0,282	100	R
0,194	50	R
0,224	25	R
0,466	10	R
0,46	5	R

FLORES MIELOMA MURINO		
DO(570nm)	Volumen(μL)	Extracto
0	100	B
0	50	B
0	25	B
0	10	B
0	5	B
0,517	100	C-
0,498	50	C-
0,389	25	C-
0,48	10	C-
0,391	5	C-
0,228	100	C+
0,44	50	C+
0,506	25	C+
0,476	10	C+
0,493	5	C+

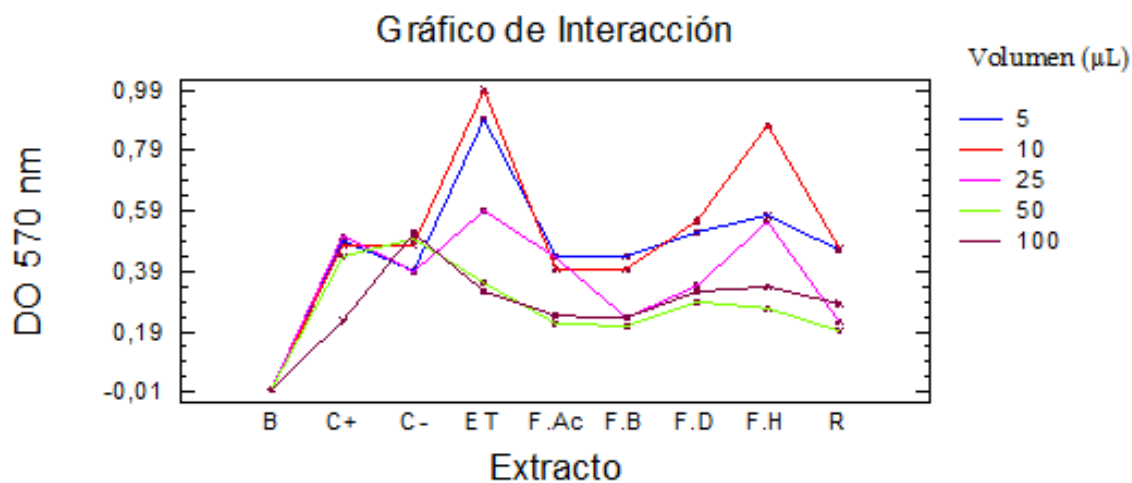
DO: densidad óptica, ET: extracto total, F.H: fracción hexano, F.B: fracción butanol, F. Ac: fracción acetato de etilo, R: residuo. B: blanco (agua estéril), C+: control positivo (etanol al 20%), C-: control negativo (solo células)

En la tabla 47 se observan los resultados obtenidos para el análisis de varianza de los resultados de la tabla 46

Tabla 47. Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de Mieloma murino a 570 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las flores.

Análisis de varianza para las células de Mieloma Murino a 570 nm					
	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medio	cociente F	p-valor
<b>Concentración</b>	0,43482	4	0,108705	7,73	0,0002
<b>Extracto</b>	1,22845	8	0,153557	10,91	0,0000
<b>Residuos</b>	0,0450229	32	0,0140697		
<b>Total</b>	2,1135	44			

La relación entre los extractos y los volúmenes adicionados versus la densidad óptica a 570 nm se observan en la grafica 15.



Grafica 15. Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de Mieloma murino a 570 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las flores.

En la tabla 48 se observan los resultados obtenidos para la densidad óptica de las células de mieloma murino con los extractos de las flores a 630 nm de absorción.

#### 7.5.2.4. Densidad óptica de las células de Mieloma Murino a 630 nm de flores

Tabla 48. Determinación de la densidad óptica para las células de Mieloma murino a 630 nm del extracto etanolico total y sus fracciones para las flores de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd.

FLORES MIELOMA MURINO			FLORES MIELOMA MURINO		
DO (630nm)	Volumen (μL)	Extracto	DO (630nm)	Volumen (μL)	Extracto
0,129	100	ET	0	100	B
0,128	50	ET	0	50	B
0,006	25	ET	0	25	B
0,012	10	ET	0	10	B
0,013	5	ET	0	5	B
0,126	100	F. H	-0,003	100	C-
0,116	50	F. H	0,067	50	C-
0,012	25	F. H	-0,002	25	C-
0,027	10	F. H	0,019	10	C-
0,027	5	F. H	0,005	5	C-
0,111	100	F. D	0,002	100	C+
0,106	50	F. D	0,028	50	C+
0,115	25	F. D	0,0026	25	C+
0,035	10	F. D	-0,004	10	C+
0,003	5	F. D	0	5	C+
0,127	100	F. B			
0,127	50	F. B			
0,092	25	F. B			
-0,004	10	F. B			
0,003	5	F. B			
0,131	100	F. Ac			
0,127	50	F. Ac			
-0,004	25	F. Ac			
-0,005	10	F. Ac			
0,026	5	F. Ac			
0,148	100	R			
0,12	50	R			
0,093	25	R			
-0,007	10	R			
0,02	5	R			

DO: densidad óptica, ET: extracto total, F.H: fracción hexano, F.B: fracción butanol, F. Ac: fracción acetato de etilo, R: residuo. B: blanco (agua estéril), C+: control positivo (etanol al 20%), C-: control negativo (solo células)

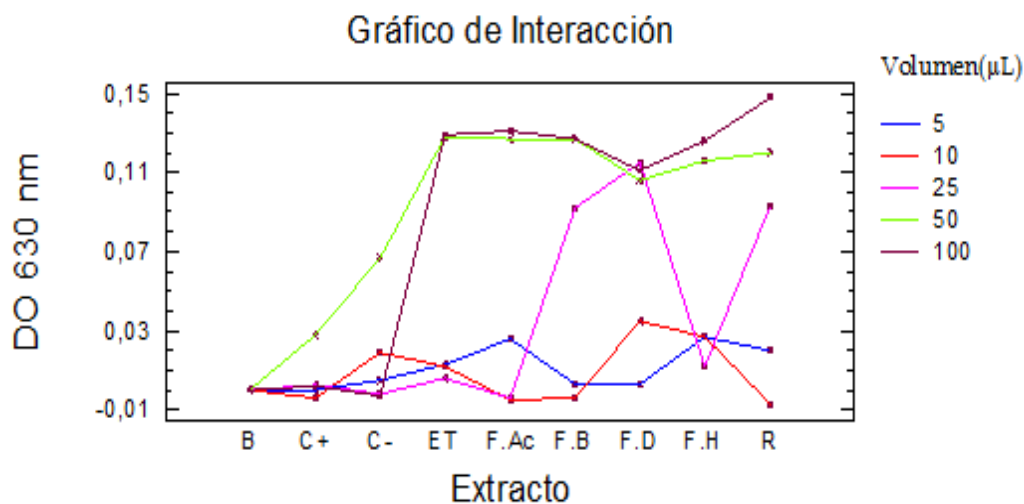


En la tabla 49 se observa el análisis de varianza para los resultados obtenidos en la tabla 48.

Tabla 49. Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad con las células de Mieloma murino a 630 nm del extracto etanólico total y sus fracciones de las flores.

<b>Análisis de varianza para las células de Mieloma Murino a 630 nm</b>					
	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medio	cociente F	p-valor
<b>Concentración</b>	0,0575689	4	0,0143922	11,77	0,0000
<b>Extracto</b>	0,0358459	8	0,00448074	3,67	0,0039
<b>Residuos</b>	0,0391203	32	0,00122251		
<b>Total</b>	0,132535	44			

La interacción de los extractos a diferentes adiciones en microlitros de estos versus la densidad óptica a 630 nm se observa en la grafica 16.



Grafica 16. Interacción para la evaluación de la citotoxicidad con células de mieloma murino a 630 nm en el extracto etanólico total y sus fracciones de las flores.

Para este ensayo en células de Mieloma Murino se observó que a 100 µL la inhibición de la propagación celular y de sus metabolismos se debió al etanol al 20% y no al efecto citotóxico de los extractos, ya que el control positivo (etanol al 20%) no mostró cambio de la coloración del alamar blue, siendo la muestra más clara de que la inactivación de los procesos celulares se debieron al etanol y no al

extracto, a 50  $\mu$ L todos los extractos presentaron actividad en las células, esta queda claro ya que el control positivo no inactivó el metabolismo celular permitiendo un cambio en la coloración del alamarblue de azul a rosa en los pozos que contenían este, mientras que en los pozos con los extractos la inhibición fue notable por no haberse hecho notable el cambio del medio; a 25  $\mu$ L únicamente los extractos butanol hojas, residuo, y diclorometano flores, presentaron actividad frente a las células de BHK ya que estos no presentaron cambio del alamarblue y sus controles positivos sí, dejando claro que las células de estos pozos continuaron sus procesos metabólicos. .

## 7.6. BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE *Solanum lycopersicum* Y *Lactuca sativa*.

### 7.6.1. Semillas de tomate *Solanum lycopersicum*

Se trabajaron concentraciones desde 1000 hasta 5 ppm, el resultado del ensayo se observó a los 5 días, para este se determinó el porcentaje de inhibición con las mediciones de la longitud que había crecido la raíz en este tiempo.

Para la determinación de la Concentración inhibitoria (CI50) se utilizó el número de semillas que no habían germinado por efecto de los extractos.



Figura 25. Semillas de tomate a 1000ppm y 5ppm después del ensayo.

### CONTROL NEGATIVO

En la tabla 50 se observan los resultados para el control negativo utilizando agua estéril como blanco para el ensayo con semillas.

Tabla 50. Resultados para el control negativo en el ensayo del % inhibición en el crecimiento de las raíces de semillas de tomate

Lectura del crecimiento de la longitud de la raíz en milímetros de 10 semillas de tomate por ensayo Agua destilada estéril					
1	Media ( $\bar{X}$ )	2	Media ( $\bar{X}$ )	3	Media ( $\bar{X}$ )
11,5,15,0,13, 7,10,8,15,9	9,3	0,0,35,18,23,11,20, 28,21,20	17,6	0,8,13,11,10,22,8, 12,15,10	10,9

### 7.6.1.1. Extracto etanolico madre hojas.

- **Determinación del % de crecimiento y % de inhibición.**

En la tabla 51 se muestran los resultados obtenidos para la evaluación con semillas de tomate a diferentes concentraciones del extracto etanólico total de las hojas utilizando 10 semillas por cada ensayo.

Tabla 51. Lectura del crecimiento de las raíces de las semillas de tomate frente al extracto etanólico total de las hojas.

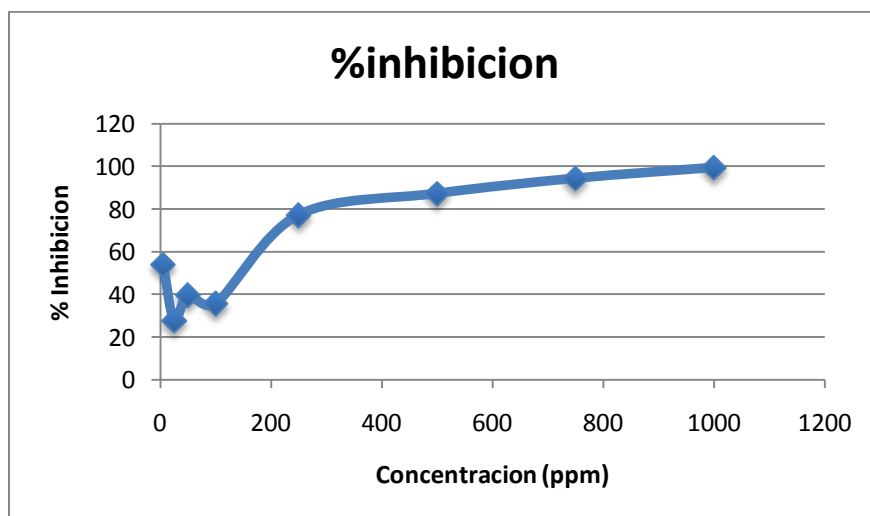
Concentra- ción ppm	Lectura del crecimiento de la longitud de la raíz en milímetros de 10 semillas de tomate por ensayo Extracto madre hojas					
	1	Media ( $\bar{X}$ )	2	Media ( $\bar{X}$ )	3	Media ( $\bar{X}$ )
1000	0,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	0	2,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	0,2	0,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	0
750	2,2,0,0,0, 0,0,0,0,0	0,4	5,4,0,0,0, 0,0,0,0,0	0,9	3,2,1,0,0, 0,0,0,0,0	0,82
500	4,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	0,4	2,4,0,0,0, 0,0,0,0,0	0,6	5,8,6,6,13, 0,0,0,0,0	3,8
250	2,2,0,0,0, 0,0,0,0,0	0,4	13,8,2,6,11, 5,0,0,0,0	4,5	7,8,1,5,9, 7,0,0,0,0	3,7
100	7,10,9,20,18, 15,5,3,0,0	8,7	9,12,10,8,7, 17,10,9,8,10	10	9,7,6,0,0, 8,6,9,6,,5	5,6
50	15,23,14,10, 10,14,10,8,5,0	10,9	7,0,5,7,8, 7,10,9,8,3	6,4	0,0,10,4,10, 11,8,2,4,6	5,5
25	16,8,7,12,10, 4,0,11,5,10	8,3	10,9,0,0,2,25, 30,12,15,22	12,5	10,5,6,6,3, 6,7,9,4,9	6,5
5	9,6,9,0,0, 8,0,10,6,7	5,5	9,7,10,3,0, 11,9,7,8,0	6,4	10,0,3,9,8, 7,0,8,10, 0	5,5

En la tabla 52 se observan los resultados de la media, desviación estándar, % de crecimiento y %de inhibición para el ensayo con 10 semillas de tomate para las distintas concentraciones del extracto etanólico total de las hojas.

Tabla 52. Determinación del % de inhibición del crecimiento de las raíces de las semillas de tomate frente al extracto etanólico total de las hojas.

Concentración ppm	Media	Desviación estándar	% crecimiento	%inhibición	Actividad
1000	0,067	0,21	0,531	99,47	Muy activo
750	0,71	1,28	5,60	94,40	Muy activo
500	1,6	2,38	12,70	87,30	Muy activo
250	2,87	3,19	22,75	77,25	Muy activo
100	8,1	4,39	64,29	35,71	Activo
50	7,6	4,45	60,32	39,68	Activo
25	9,1	5,79	72,22	27,78	Poco activo
5	5,8	4,10	46,03	53,97	Poco activo
Blanco (C-)	12,6	7,15	100	0	-----

La grafica 17 revela que la relación del porcentaje de inhibición y la concentración presentan una relación con un comportamiento exponencial por encima del valor calculado del CI50, por debajo de este valor no existe relación entre el % de inhibición y la concentración del extracto etanólico total de las hojas, siendo muy activas las concentraciones hasta 500 ppm, activas 100 y 50 ppm y muy poco activas 25 y 5 ppm.



Grafica 17. Concentración en ppm Vs % inhibición del extracto etanolico madre hojas en semillas de tomate.

- Determinación de la concentración inhibitoria (CI50)

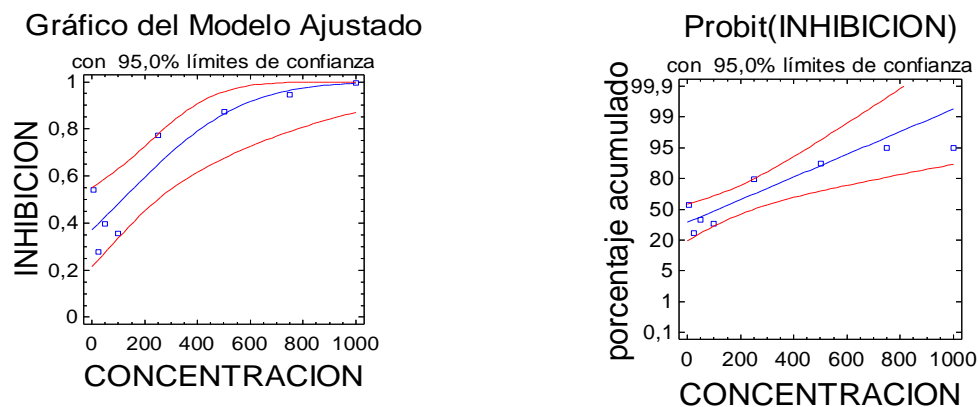
En la tabla 53 se observan los resultados obtenidos para el análisis de las variables indispensables de bioactividad de las semillas de tomate para el extracto etanólico total de las hojas.

Tabla 53. Determinación del % de inhibición del crecimiento de las raíces de las semillas de tomate frente al extracto etanólico total de las hojas.

Análisis Probit				
Extracto etanolico madre hojas				
	Estimación	Estimación de error	Límite inferior	Límite superior
Constante	-0,330113	0,233105	-0,900503	0,240277
Concentración	0,00284953	0,000829038	0,000820943	0,00487812
Análisis de desviación				
	Desviación	G.L	p-valor	
Modelo	20,3955	1	0,0000	
Residuos	2,58717	6	0,8586	
CI50	115,848 ppm			

La tabla anterior muestra el modelo regresión Probit para describir la relación entre %inhibición y la concentración. La ecuación del modelo ajustado es

$$\%INHIBICION = -0,330113 + 0,00284953 * CONCENTRACION$$



Grafica 18. Relación del porcentaje de inhibición del crecimiento de las semillas de tomate versus la concentración del extracto etanólico total de las hojas a los 5 días de ensayo..

En la grafica 18 se observa el modelo sin ajustar (grafica de la izquierda) y el modelo ajustado (grafica de la derecha).

### 7.6.1.2. Extracto etanolico madre flores.

- **Determinación del % de crecimiento y % de inhibición.**

En la tabla 54 se muestran los resultados obtenidos para la evaluación con semillas de tomate a diferentes concentraciones del extracto etanólico total de las flores utilizando 10 semillas por cada ensayo.

Tabla 54. Lectura del crecimiento de las raíces de las semillas de tomate frente al extracto etanólico total de las flores.

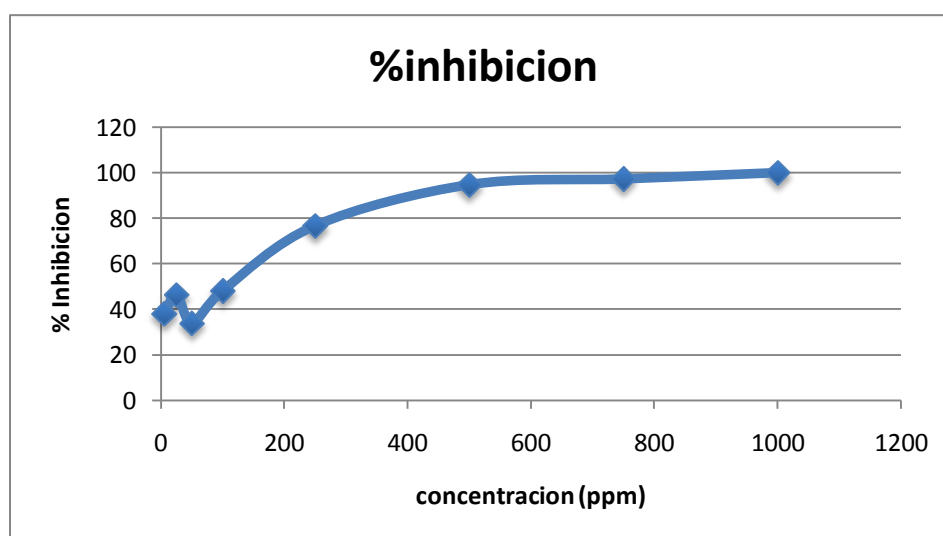
Concentración ppm	Lectura del crecimiento de la longitud de la raíz en milímetros de 10 semillas de tomate por ensayo Extracto madre flores					
	1	Media ( $\bar{X}$ )	2	Media ( $\bar{X}$ )	3	Media ( $\bar{X}$ )
1000	0,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	0	0,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	0	0,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	0
750	2,2,0,0,0, 0,0,0,0,0	0,4	0,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	0	3,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	0,63636 364
500	3,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	0,3	4,2,6,0,0,0, 0,0,0,0,0	1,2	2,3,0,0,0, 0,0,0,0,0	0,5
250	2,4,3,8,0, 0,0,0,0,0	1,7	3,8,6,8,9, 5,0,0,0,0	3,9	7,8,5,6,6, 0,0,0,0,0	3,2
100	23,20,7,15,6, 5,9,13,0,0	9,8	5,7,6,10,8, 9,11,7,5,6	7,6	2,5,4,7,4, 0,0,0,0,0	2,2
50	5,1,5,0,7 9,9,6,7,8	5,7	5,0,9,10,7, 7,10,10,9,8	7,5	5,0,4,7,0,20 15,25,20,22	11,8
25	16,30,18,0,0,20,14 ,0,9,7	11,4	6,6,0,0,0, 3,7,8,5,10	4,5	5,0,0,0,0, 10,9,6,4,10	4,4
5	15,15,0,10,10,10,1 0,13,0,14,0	8,7	7,6,10,5,6, 7,4,4,3,0	5,2	0,0,0,14,13,15, 18,9,15,11	9,5

En la tabla 55 se observan los resultados de la media, desviación estándar, % de crecimiento y % de inhibición para el ensayo con 10 semillas de tomate para las distintas concentraciones del extracto etanólico total de las flores.

Tabla 55. Determinación del % de inhibición del crecimiento de las raíces de las semillas de tomate frente al extracto etanólico total de las flores.

Concentración ppm	Media	Desviación estándar	% crecimiento	%inhibición	Actividad
1000	0	0	0	100	Muy activo
750	0,34	0,60	2,74	97,26	Muy activo
500	0,67	1,39	5,29	94,71	Muy activo
250	2,93	3,29	23,28	76,72	Muy activo
100	6,53	4,12	51,85	48,15	Activo
50	8,33	5,27	66,14	33,86	Activo
25	6,77	5,97	53,70	46,30	Activo
5	7,8	5,33	61,90	38,09	Activo
Blanco (C-)	12,6	7,15	100	0	-----

La grafica 19 revela que la relación del porcentaje de inhibicion y la concentración presentan una relación con un comportamiento exponencial por encima del valor calculado del CI50, por debajo de este valor no existe relación entre el % de inhibición y la concentración del extracto etanólico total de las flores, siendo muy activas las concentraciones hasta 250 ppm, por debajo de este valor son activas.



Grafica 19. Concentración en ppm Vs % inhibición del extracto etanolico madre flores en semillas de tomate.

- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CI50)

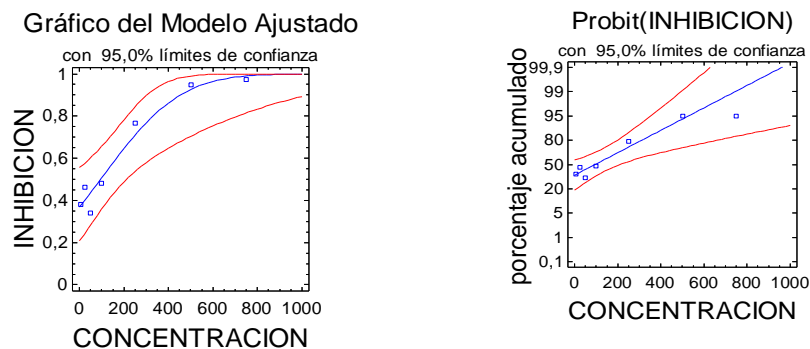
En la tabla 56 se observan los resultados obtenidos para el análisis de las variables indispensables de bioactividad de las semillas de tomate para el extracto etanólico total de las flores.

Tabla 56. Análisis Probit para el % de inhibición del crecimiento de las raíces de tomate frente al extracto etanólico total de las flores.

Análisis Probit				
Extracto etanolico madre flores				
	Estimación	Estimación de error	Límite inferior	Límite superior
Constante	-0,337532	0,243864	-1,00769	0,332632
Concentración	0,0035664	0,00114712	0,000413881	0,00671891
Análisis de desviación				
	Desviación	G.L	p-valor	
Modelo	16,4542	1	0,0000	
Residuos	0,830418	5	0,9751	
CI50	94,642 ppm			

La tabla anterior muestra el modelo regresión Probit para describir la relación entre %inhibición y la concentración. La ecuación del modelo ajustado es

$$\%INHIBICION = -0,337532 + 0,0035664 * CONCENTRACION$$



Grafica 20. Relación del porcentaje de inhibición del crecimiento de las semillas de tomate versus la concentración del extracto etanólico total de las flores a los 5 días de ensayo.

En la grafica 20 se observa el modelo sin ajustar (grafica de la izquierda) y el modelo ajustado (grafica de la derecha).



### 7.6.2. Semillas de lechuga *Lactuca sativa*.

Se trabajaron concentraciones desde 1000 hasta 5 ppm, el resultado del ensayo se observó a los 5 días, para este se determinó el % de inhibición con las mediciones de la longitud que había crecido la raíz en este tiempo.

Para la determinación de la concentración inhibitoria (CI50) se utilizó el número de semillas que no habían germinado por efecto de los extractos.



Figura 26. Semillas de lechuga a 1000ppm y 5ppm después del ensayo.

### CONTROL NEGATIVO

En la tabla 57 se observan los resultados para el control negativo utilizando agua estéril como blanco para el ensayo con semillas de lechuga.

Tabla 57. Resultados para el control negativo en el ensayo del % inhibición en el crecimiento de las raíces de semillas de lechuga.

Lectura del crecimiento de la longitud de la raíz en milímetros de 10 semillas de lechuga por ensayo Agua destilada estéril					
1	Media ( $\bar{X}$ )	2	Media ( $\bar{X}$ )	3	Media ( $\bar{X}$ )
30,15,40,50, 10,22 ,2,5,0,0	17,4	45,32,25,40,45 ,32,50,0,0,0	27,1	32,26,25,22,1 5,55,20,0,0,0,	19,5

### 7.6.2.1. Extracto etanolico madre hojas.

- **Determinación del % de crecimiento y % de inhibición.**

En la tabla 58 se muestran los resultados obtenidos para la evaluación con semillas de lechuga a diferentes concentraciones del extracto etanólico total de las hojas utilizando 10 semillas por cada ensayo.

Tabla 58. Lectura del crecimiento de las raíces de las semillas de lechuga frente al extracto etanólico total de las hojas.

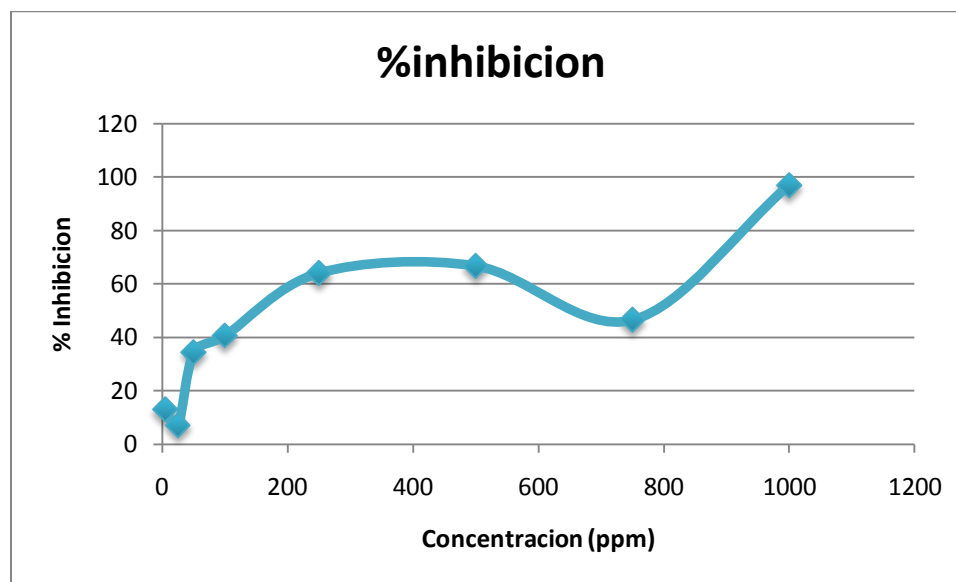
Concentración ppm	Lectura del crecimiento de la longitud de la raíz en milímetros de 10 semillas de lechuga por ensayo Extracto madre hojas					
	1	Media ( $\bar{X}$ )	2	Media ( $\bar{X}$ )	3	Media ( $\bar{X}$ )
1000	3,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	0,3	10,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	1	7,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	0,7
750	40,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	4,2	50,22,32,40, 0,0,0,0,0,0	14,4	51,25,18,22, 28,25,0,0,0, 0	15,636 3636
500	20,15,5,2,0, 0,0,0,0,0	4,2	35,22,12,0,0, 0,0,0,0,0	6,9	22,20,15,20, 25,0,0,0,0,0	10,2
250	20,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	3,5	30,8,11,5,3 10,5,0,0,0	7,2	42,35,34,12, 0,0,0,0,0,0	12,3
100	50,32,25,38, 34,45,0,0,0,0	22,4	15,18,18,15, 0,0,0,0,0,0	6,6	28,32,30,0, 0,0,0,0,0	9
50	2,35,20,30,0,0, 0,0,0,0	8,7	22,25,32,40, 28,0,0,0,0,0	14,7	40,25,45,25, 35,0,0,0,0,0	18,6
25	35,40,50,18, 45,42,20,0,0,0	23,88888 89	55,34,55,0,0,4 2,0,0,0,0	18,6	40,25,45,25, 35,0,0,0,0,0	17
5	10,37,35,25, 22,18,25,0,0,0	17,2	20,25,30,48, 36,50,34,0,0,0	24,3	36,30,18,30, 28,0,0,0,0,0	14,2

En la tabla 59 se observan los resultados de la media, desviación estándar, % de crecimiento y % de inhibición para el ensayo con 10 semillas de lechuga para las distintas concentraciones del extracto etanólico total de las hojas.

Tabla 59. Determinación del % de inhibición del crecimiento de las raíces de las semillas de lechuga frente al extracto etanólico total de las hojas.

Concentración ppm	Media	Desviación estándar	% crecimiento	%inhibición	Actividad
1000	0,67	2,11	3,12	96,87	Muy activo
750	11,41	16,45	53,49	46,50	Activo
500	7,1	10,22	33,28	66,72	Muy activo
250	6,9	11,21	35,94	64,062	Muy activo
100	12,67	14,51	59,37	40,62	Activo
50	12,57	15,21	65,62	34,37	Activo
25	13,42	16,02	92,95	7,049	Poco activo
5	13,6	11,73	87,03	12,97	Poco activo
Blanco (C-)	21,33	18,29	100	0	-----

La grafica 21 revela la relación del porcentaje de inhibición con las concentraciones del extracto etanólico total de las hojas.



Grafica 21. Concentración en ppm Vs % inhibición del extracto etanolico madre hojas en semillas de lechuga.

- Determinación de la concentración inhibitoria (CI50)

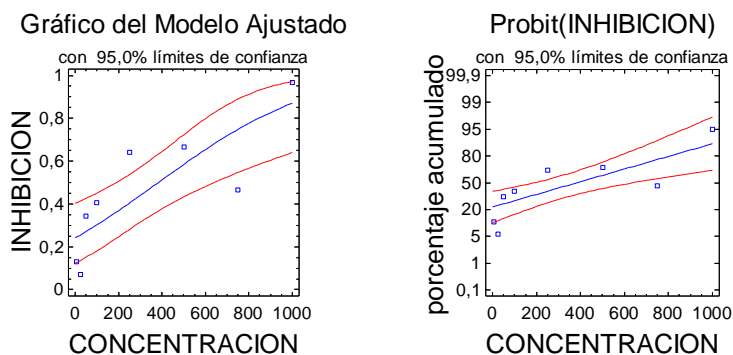
En la tabla 60 se observan los resultados obtenidos para el análisis de las variables indispensables de bioactividad de las semillas de lechuga para el extracto etanólico total de las hojas.

Tabla 60. Análisis Probit para el % de inhibición del crecimiento de las raíces de lechuga frente al extracto etanólico total de las hojas.

Análisis Probit				
Extracto etanolico madre hojas				
	Estimación	Estimación de error	Límite inferior	Límite superior
Constante	-0,699734	0,232953	-1,26975	-0,129717
Concentración	0,00182678	0,000514274	-0,000568392	0,00308517
Análisis de desviación				
	Desviación	G.L	p-valor	
Modelo	14,052	1	0,002	
Residuos	9,03265	6	0,1718	
CI50	383,043 ppm			

La tabla anterior muestra el modelo regresión Probit para describir la relación entre %inhibición y la concentración como variable independiente. La ecuación del modelo ajustado es

$$\%INHIBICION = 0,699734 + 0,00182678 * CONCENTRACION$$



Grafica 22. Relación del porcentaje de inhibición del crecimiento de las semillas de lechuga versus la concentración del extracto etanólico total de las hojas a los 5 días de ensayo.

### 7.6.2.2. Extracto etanolico madre flores.

- **Determinación del % de crecimiento y % de inhibición.**

En la tabla 61 se muestran los resultados obtenidos para la evaluación con semillas de lechuga a diferentes concentraciones del extracto etanólico total de las hojas utilizando 10 semillas por cada ensayo.

Tabla 61. Lectura del crecimiento de las raíces de las semillas de lechuga frente al extracto etanólico total de las flores.

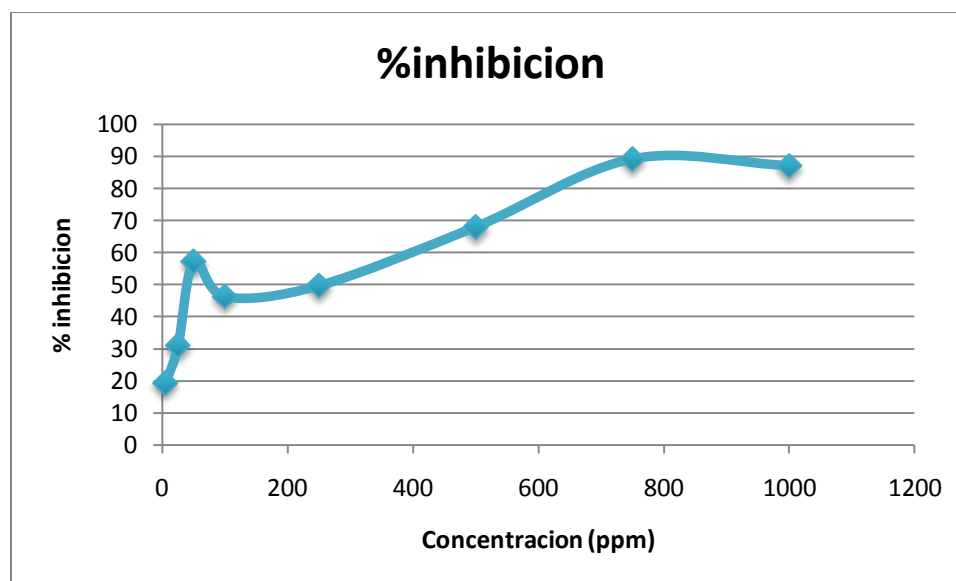
Concentración ppm	Lectura del crecimiento de la longitud de la raíz en milímetros de 10 semillas de lechuga por ensayo Extracto madre flores					
	1	Media ( $\bar{X}$ )	2	Media ( $\bar{X}$ )	3	Media ( $\bar{X}$ )
1000	10,13,5,0,0, 0,0,0,0,0	2,8	15,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	1,5	15,18,7,0,0, 0,0,0,0,0	4
750	25,2,0,0,0, 0,0,0,0,0	2,7	20,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	2	22,0,0,0,0, 0,0,0,0,0	2,27272 727
500	18,24,22,20, 25,0,0,0,0,0	10,9	25,22,0,0,0, 0,0,0,0,0	4,7	24,25,0,0,0, 0,0,0,0,0	4,9
250	42,38,46,42, 35,0,0,0,0,0	16,8	20,30,20,0,0, 0,0,0,0,0	7	30,29,25,0,0, 0,0,0,0,0	8,4
100	28,20,31,29, 40,0,0,0,0,0	14,8	15,50,0,0,0, 0,0,0,0,0	6,5	30,51,35,15, 0,0,0,0,0,0	13,1
50	38,24,0,0,0, 0,0,0,0,0	6,2	35,30,0,0,0, 0,0,0,0,0	6,5	30,25,42,50, ,0,0,0,0,0,0	0
25	42,45,20,35, 36,40,0,0,0,0	19,555555 6	28,48,38,30, 0,0,0,0,0,0	14,4	17,25,33,27, 0,0,0,0,0,0	10,2
5	39,30,23,44, 40,0,0,0,0	17,6	3,11,40,37, 15,48,0,0,0,0	19,9	39,40,41,40, 39,0,0,0,0,0	14,2

En la tabla 62 se observan los resultados de la media, desviación estándar, % de crecimiento y %de inhibición para el ensayo con 10 semillas de lechuga para las distintas concentraciones del extracto etanólico total de las flores.

Tabla 62. Determinación del % de inhibición del crecimiento de las raíces de las semillas de lechuga frente al extracto etanólico total de las flores.

Concentración ppm	Media	Desviación estándar	% crecimiento	%inhibición	Actividad
1000	2,77	5,54	12,97	87,03	Muy activo
750	2,32	7,05	10,89	89,10	Muy activo
500	6,83	10,64	32,03	67,97	Muy activo
250	10,73	15,65	50,31	49,69	Activo
100	11,47	17,09	53,75	46,25	Activo
50	7,1	15,06	42,81	57,19	Activo
25	13,24	17,34	68,99	31,01	Activo
5	13,4	18,07	80,78	19,22	Poco activo
Blanco (C-)	21,33	18,29	100	0	-----

La grafica 23 revela la relación del porcentaje de inhibición con las concentraciones del extracto etanólico total de las flores.



Grafica 23. Concentración en ppm Vs % inhibición del extracto etanolico madre flores en semillas de lechuga.

- Determinación de la concentración inhibitoria (CI50)

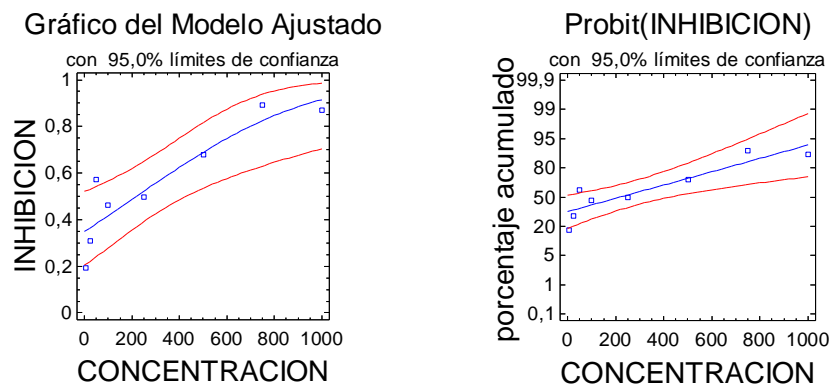
En la tabla 63 se observan los resultados obtenidos para el análisis de las variables indispensables de bioactividad de las semillas de lechuga para el extracto etanólico total de las flores.

Tabla 63. Análisis Probit para el % de inhibición del crecimiento de las raíces de lechuga frente al extracto etanólico total de las flores.

Análisis Probit				
Extracto etanolico madre flores				
	Estimación	Estimación de error	Límite inferior	Límite superior
Constante	-0,386342	0,223928	-0,934276	0,161592
Concentración	0,00176035	0,000540578	0,000437604	0,00308311
Análisis de desviación				
	Desviación	G.L	p-valor	
Modelo	12,4847	1	0,0004	
Residuos	2,82351	6	0,8307	
CI50	219,468 ppm			

La tabla anterior muestra el modelo regresión Probit para describir la relación entre %inhibición y la concentración como variable independiente. La ecuación del modelo ajustado es

$$\%INHIBICION = -0,386342 + 0,00176035 * CONCENTRACION$$



Grafica 24. Relación del porcentaje de inhibición del crecimiento de las semillas de lechuga versus la concentración del extracto etanólico total de las flores a los 5 días de ensayo.

## 7.7. SEPARACION DE UN COMPUESTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO MADRE DE LAS HOJAS.

### 7.7.1. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se realizo para el extracto etanólico madre de las hojas con una extracción asistida por ultrasonido a los 10 minutos. Se utilizaron placas cromatograficas con silica gel. Se realizaron varias pruebas con solventes de distinta polaridad como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 64. Solventes utilizados para cromatografía en capa delgada para la separación de un compuesto del extracto etanólico total de las hojas de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd.

Nombre Solvente	Factor de resolución (Rf)
Hexano	0
Éter de petróleo	0
Tolueno	Vela
Éter etílico	0,84
Acetato de etilo	0,923
Isopropanol	Vela
Acetona	1
cloroformo-hexano-acetato de etilo (4:2:0,5)	6,7

Donde Rf= 0 el compuesto no arrastra, Rf=1 el compuesto arrastra todo.

Con base en estos resultados se utilizo una mezcla de cloroformo- hexano-acetato de etilo (4:2:0,5), generando una buena separación de los compuestos de interés. Para confirmar estos resultados las placas además de ser observadas con luz ultravioleta fueron previamente aspersadas con vainillina, utilizando esta reacción como revelador.



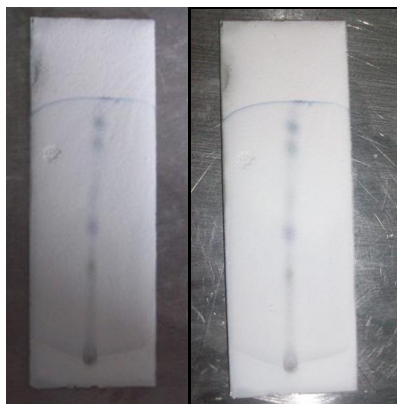


Figura 27. Cromatografía del extracto etanólico madre de las hojas con cloroformo- hexano-acetato de etilo (4:2:0,5) como eluyente, aspersado con vainillina.

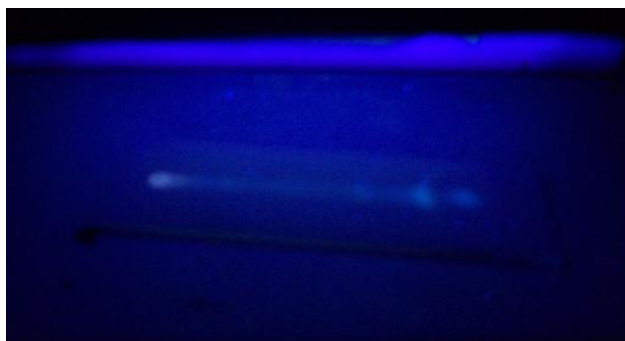


Figura 28. Cromatografía del extracto etanólico madre de las hojas con cloroformo- hexano-acetato de etilo (4:2:0,5) como eluyente (Lámpara ultravioleta 254 nm).

### 7.7.2. Cromatografía en capa fina bidimensional

Debido a que no se lograba una buena separación de los puntos observados en las placas, se procedió a realizar una cromatografía bidimensional para aclarar y mejorar la separación de estos. Para esta se utilizó como primer eluyente la mezcla de éter de petróleo - acetato de etilo (8,5:1,5). Después de esto la placa (20 cm x 20 cm) se giró 90° y se eluyó con la mezcla cloroformo- hexano-acetato de etilo (4:2:0,5).



Figura 29. Cromatografía bidimensional del extracto etanólico madre hojas.



Figura 30. Cromatografía bidimensional del extracto etanólico madre hojas aspersado con vainillina.

### 7.7.3. Cromatografía en columna

Con los resultados obtenidos en la cromatografía en capa fina mono y bidimensional, se llevó a cabo la cromatografía en columna utilizando una fase móvil de varios solventes empezando por la mezcla de cloroformo-hexano-acetato de etilo (4:2:0,5) obteniendo 30 fracciones, a cada fracción se le realizó una cromatografía en placa para asegurar la separación y extracción de el compuesto de interés, donde solo la fracción (I.d. Col.Hex.A. Etilo Col 9) presentó un punto con un  $R_f=0,384$ , después se utilizó éter etílico obteniendo 10 fracciones donde solo la primera (I.d. E.etílico. Col 1) y sexta (I.d. Et.Et Col. 6) presentaron un punto con  $R_f= 0,615$  y  $R_f=0,923$ . En orden de polaridades se adicionó cloroformo con 10 fracciones pero ninguna presento puntos, seguido se adiciono metanol obteniendo 10 fracciones donde la primera (I.d. MeOH Col. 1) y quinta (I.d. MeOH. Col 5) las cuales mostraron en las placas cromatografías un punto con el mismo  $R_f= 0,769$  para ambas, por lo que se decidió juntar estas dos fracciones y dejar solo la fracción (I.d. MeOH. Col 5). Para finalizar se utilizó acetonitrilo obteniendo 10 fracciones de las cuales ninguna arrojó algún punto al ser reveladas con vainillina.

Tabla 65. Índice de polaridad para cada uno de los solventes utilizados para la separación por cromatografía de columna de un compuesto del extracto etanólico total de las hojas de *Iresine Difussa* Humb & Bonpl. Ex Willd.

Solvente	Índice de polaridad
Mezcla cloroformo-hexano-acetato de etilo (4:2:0,5)	1,86
Éter etílico	2,8
Cloroformo	4,0
Metanol	5,0
Acetonitrilo	6,0

El índice de polaridad de la mezcla se determino con la siguiente fórmula:

$$I.P = (ID * F) + (ID * F) + n ...$$

Donde IP: es el índice de polaridad de la mezcla, ID: índice de polaridad de cada solvente, F: fracción o cantidad de solvente adicionado a la mezcla.

Los resultados de las pruebas fitoquímicas preliminares realizadas a las fracciones se encuentran en la siguiente tabla:

Tabla 66. Pruebas fitoquímicas preliminares realizadas a las fracciones obtenidas de la separación por cromatografía en columna.

<b>Metabolito</b>	<b>Prueba</b>	I.d. MeOH Col. 5	I.d. Clo.Hex.A. Etilo Col 9	I.d. Et.Et . Col 6	I.d. E.etilico. Col 1
<b>Taninos</b>	FeCl <sub>3</sub>	-	-	-	-
	Acetato de Plomo	-	-	-	-
	Gelatina-sal	-	-	-	-
<b>Esteroles</b>	Lieberman-buchard	++ Coloración naranja	++ Coloración azul	+ Coloración azul	+ Coloración azul
<b>Carodiotonicos</b>	Baljet	++	-	-	-
	Legal	+	-	-	-
	Kedde	-	-	-	-
	Antrona	+++	++	+	++
<b>Desoxiazucares</b>	Keller-killiani	-	-	-	-
<b>Azucares</b>	Tollens	+++	-	-	-
	Fehling	-	-	-	-
	Molish	+++	+++	++	++
<b>Saponinas</b>	Rosenthaler	++ Anillo violeta	+++ Anillo verde	++ Anillo Verde	++ Anillo Verde
<b>Sesquiterpen-lactonas</b>	Hidroxamato Férrico	++	-	-	-

En las fracciones I.d. Col .Hex.A. Etilo Col 9, I.d. E.etilico. Col 6 y I.d. E.etilico. Col 1 se debió omitir la prueba de hidroxamato férrico ya que el solvente en el que se encontraban solubilizados los extractos para realizar las pruebas era el acetato de

etilo el cual reacciona con el reactivo de identificación generando una coloración roja intensa y por consiguiente un falso positivo.

- Análisis IR y UV de la fracción I.d. MeOH Col. 5.

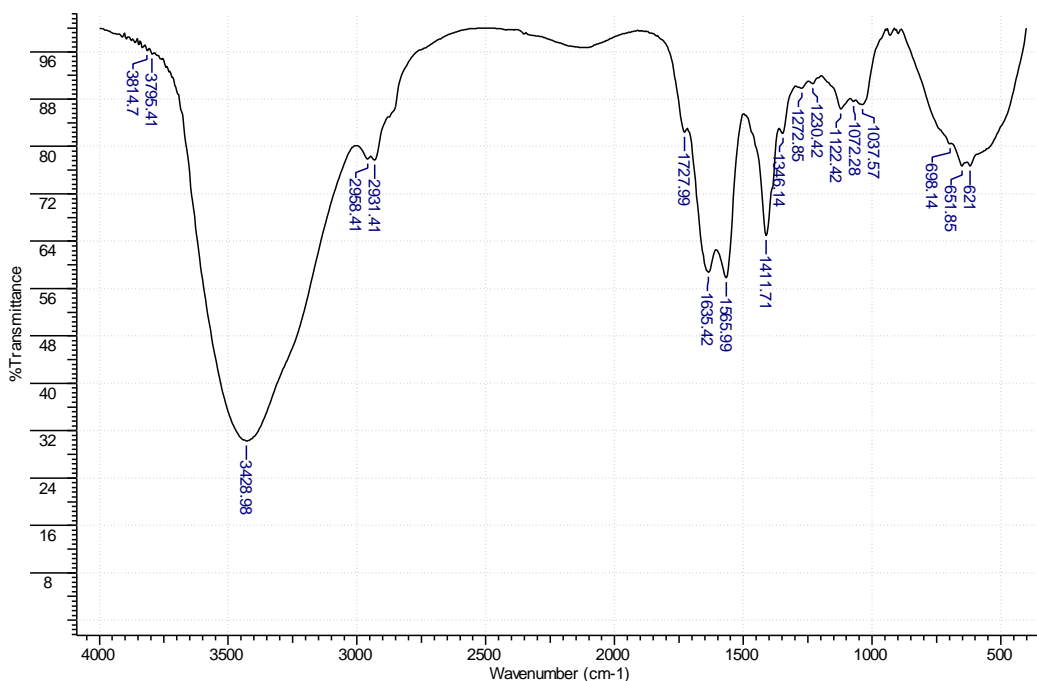


Figura 31. Espectro infrarrojo de la fracción I.d. MeOH Col. 5 obtenida con metanol de la separación por cromatografía de columna.

No	cm-1	%T	Intensity
1	621.00	76.714	M
2	651.85	76.729	M
3	698.14	80.459	W
4	1037.57	87.100	W
5	1072.28	87.617	W
6	1122.42	86.326	W
7	1230.42	90.608	W
8	1272.85	89.824	W
9	1346.14	82.234	W
10	1411.71	64.921	M
11	1565.99	57.831	S
12	1635.42	58.734	M
13	1727.99	82.383	W
14	2931.41	77.655	M
15	2958.41	77.836	M
16	3428.98	30.274	VS
17	3795.41	95.628	VW
18	3814.70	96.191	VW

Tabla 67. Resultados de espectro infrarrojo de la fracción I.d.MeOH Col. 5 obtenida con metanol de la separación por cromatografía en columna.

Bandas 3400 a 3200  $\text{cm}^{-1}$

La banda a 3428,98  $\text{cm}^{-1}$  se genera por vibraciones de tensión del enlace hidroxilo (O-H) no asociado por interacciones moleculares de puentes de hidrógeno y la banda a 1037,57  $\text{cm}^{-1}$  se debe a vibraciones de flexión del enlace O-H (según lo reporta Domínguez); correspondientes a los hidroxilos de la porción azúcar <sup>(61)</sup>.

Banda 2958,41  $\text{cm}^{-1}$  y 2931,41  $\text{cm}^{-1}$

Esta banda se produce por vibraciones de tensión asimétrica del enlace C-H de los grupos metileno y/o metilo del anillo esteroidal o sustituyentes unidos a él, además se aprecian otras bandas características en las regiones de 1411  $\text{cm}^{-1}$  producidas por las vibraciones de flexión simétricas y asimétricas del enlace C-H. La banda 2931,41  $\text{cm}^{-1}$ , corresponde a la vibración simétrica del C-H.

Banda a 1727.97  $\text{cm}^{-1}$  y 1272.85  $\text{cm}^{-1}$

El grupo pentadienólido absorbe fuertemente a 1760  $\text{cm}^{-1}$  y 1740  $\text{cm}^{-1}$  con estiramiento C-O enlace sigma 1280.03  $\text{cm}^{-1}$

Banda 1680 -1600  $\text{cm}^{-1}$

En esta región se encuentra el estiramiento del enlace C=C con hibridación ( $\pi$ ), este corresponde al sistema pentadienólido alfa-beta y gama-sigma

Banda a 1173-1061  $\text{cm}^{-1}$

En esta región se presentan vibraciones de tensión y flexión del enlace C-O de los azúcares o desoxiazúcares con hidroxilo en posición alfa, en igual forma aparecen en esta región vibraciones C-O correspondiente a esteroides (cíclicos) <sup>(62)</sup>.

Banda de 1000  $\text{cm}^{-1}$  y 600  $\text{cm}^{-1}$

En esta región se presenta vibraciones de flexión dentro y fuera del plano correspondiente a los enlaces C-H de los alcanos y alquenos, la vibración que se encuentran a 600 $\text{cm}^{-1}$ , corresponden a las deformaciones fuera del plano de C-H, por enlaces C=C-H.

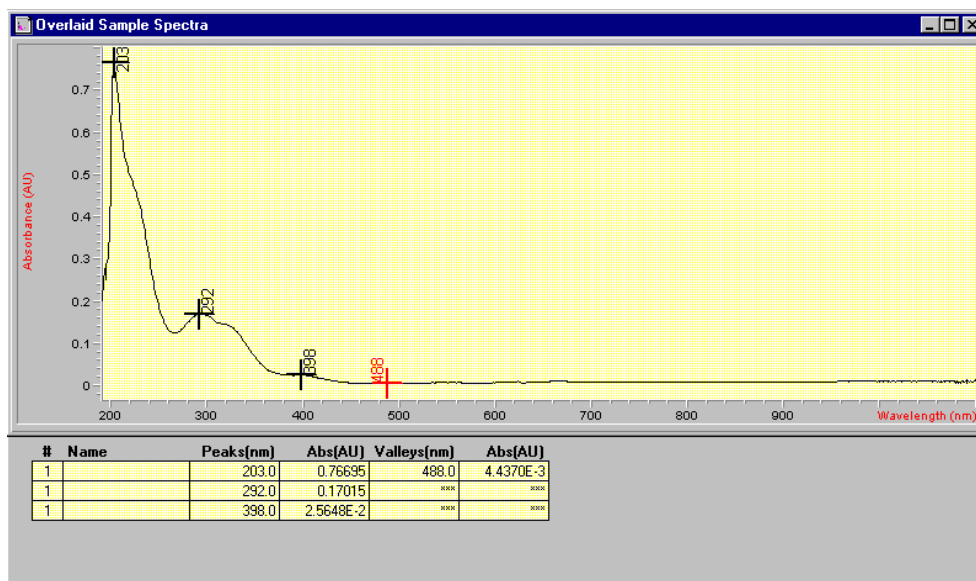


Figura.32. Espectro ultravioleta de la fracción I.d. MeOH Col. 5

La banda con mayor intensidad, observada a 203 nm corresponde al solvente utilizado, metanol cuya banda teóricamente se observa a los 205 nm (Anexo 4).

La banda observada a 292 nm característica de un sistema pentadienolido o de lactona terpenica. También se observa una banda a 398 nm que posiblemente corresponde a un sistema  $\Delta^{3,5,7,9}$ -3-hidroxiandrostetraeno los cuales presentan máximos de absorción alrededor de 330, 340, y 350 nm.

Según las reglas de Woodward se obtiene teóricamente el valor de la enona cíclica de 6 miembros, 215 nm, a esta se le deben sumar 30 nm correspondientes a doble enlace extensión de la conjugación, mas 18 nm del residuo del anillo en posición  $\gamma$  y 39 nm del componente dieno homocíclico. Sumando un total de 302 nm.

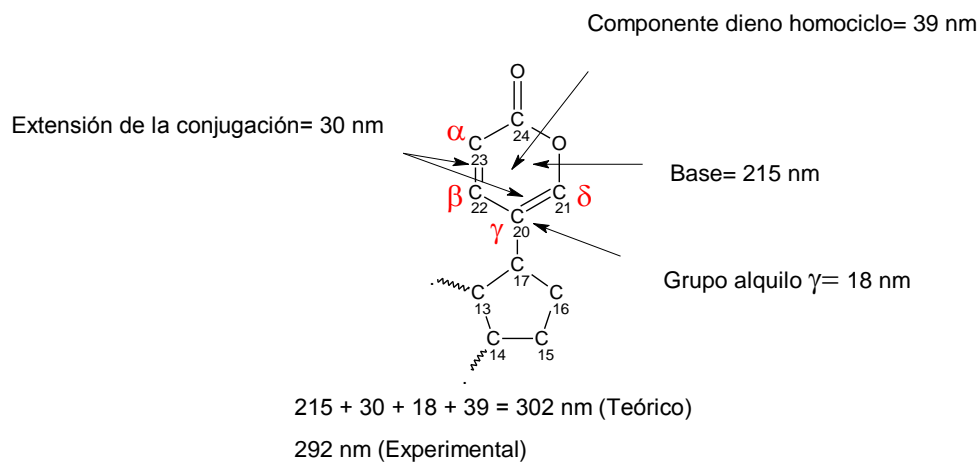


Figura 33. Anillo característico de los pentadienolidos.

Para el análisis de la segunda absorbancia se tomo como base 253 correspondiente a el sistema de dieno homoanular, a este se le deben sumar 25 nm de 5 residuos al anillo, 15 nm de los 3 dobles enlaces exociclicos, además de sumar 60 nm por poseer 2 dobles enlaces conjugados. Dando un total de 353 nm.

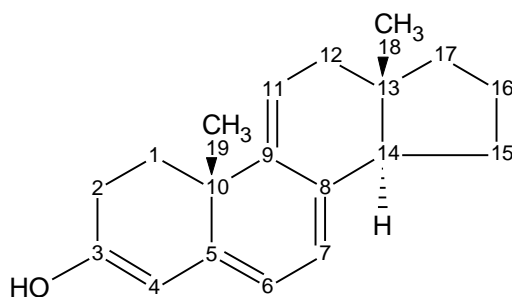


Figura 34. Anillo de Ciclopentanoperhidrofenantreno de tipo  $\Delta^{3-4,5-6,7-8,9-11-3}$ -hidroxiandrostatrieno

Con base a las pruebas fitoquímicas realizadas a esta fracción y los análisis de IR y UV se puede sugerir que el compuesto obtenido de la columna con metanol, es un glicosido cardiotónico.

- Análisis IR y UV de la fracción I.d. Et.Et. Col 1.

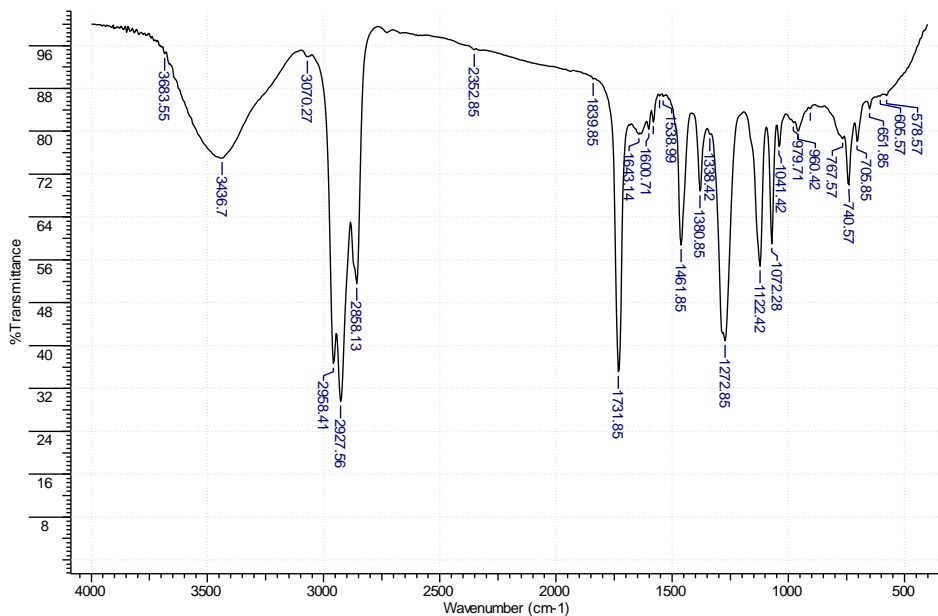


Figura 36. Espectro infrarrojo de la fracción I.d. E.ético. Col 1.

No	cm-1	%T	Intensity				
1	578.57	86.650	W	16	1461.85	58.723	M
2	605.57	86.576	W	17	1538.99	86.501	W
3	651.85	84.145	W	18	1554.42	86.578	W
4	705.85	78.149	M	19	1581.42	81.713	W
5	740.57	70.002	M	20	1600.71	80.372	W
6	767.57	78.650	M	21	1643.14	79.480	W
7	906.42	84.229	W	22	1731.85	35.116	VS
8	960.42	80.043	W	23	1839.85	89.788	W
9	979.71	81.650	W	24	2352.85	95.224	VW
10	1041.42	77.192	M	25	2858.13	51.567	S
11	1072.28	59.030	M	26	2927.56	29.583	VS
12	1122.42	54.849	S	27	2958.41	36.656	S
13	1272.85	40.923	S	28	3070.27	93.929	VW
14	1338.42	79.416	W	29	3436.70	74.978	M
15	1380.85	68.810	M	30	3683.55	94.460	VW

Tabla 68. Resultados del espectro infrarrojo de la fracción I.d. E.etilico. Col 1 obtenida con éter etílico de la separación por cromatografía en columna.

Bandas 3400 a 3200  $\text{cm}^{-1}$

La presencia de una señal amplia de intensidad muy fuerte a 3436.70  $\text{cm}^{-1}$ , indica la presencia de O-H, esta es una banda característica de hidroxilo.

Banda 2958.41  $\text{cm}^{-1}$  y 2931.41  $\text{cm}^{-1}$

Esta banda se produce por las vibraciones de tensión generadas por los enlaces de C-H de grupos metil y metileno se observan con estiramientos asimétricos entre los 3000 y 2900  $\text{cm}^{-1}$ , en el espectro se observan a los 2958.41. 2927.56 y 2858.13  $\text{cm}^{-1}$ .

Banda a 1727.97  $\text{cm}^{-1}$  y 1272.85  $\text{cm}^{-1}$

A 1731.85  $\text{cm}^{-1}$  se observa la banda característica de C=O perteneciente a un ester, el enlace C-O se observa a 1041.42.

Entre 1475-1300 se presentan las vibraciones de deformación de C-H, donde se observan las bandas a 1641.85 y 1380.85  $\text{cm}^{-1}$ .

Banda de 1000  $\text{cm}^{-1}$  y 600  $\text{cm}^{-1}$

En esta región se encuentran los estiramientos del enlace C=C con hibridación  $\pi$  Las señales que se observan por debajo de los 1000  $\text{cm}^{-1}$  posiblemente corresponden a las señales características de las saponinas esteroidales (900, 920, 982  $\text{cm}^{-1}$ ) (63).



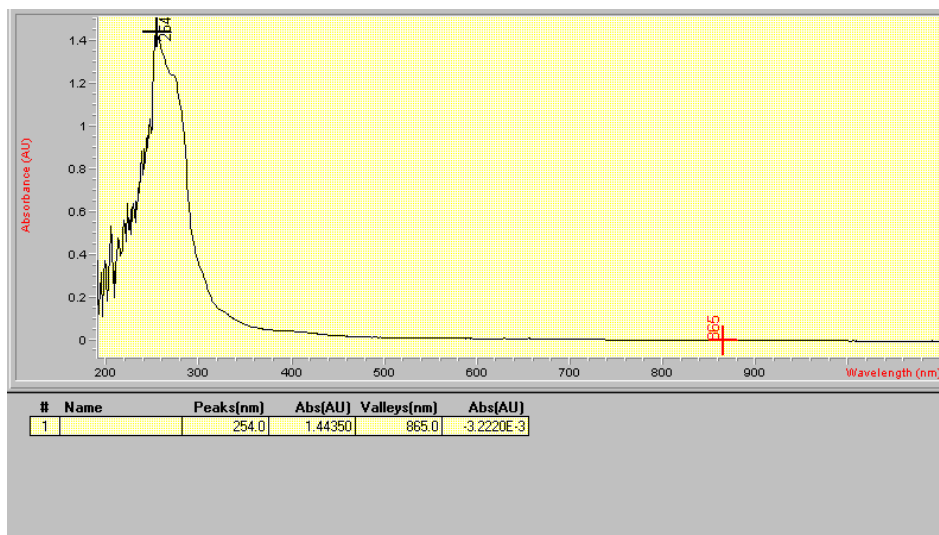


Figura 37. Espectro ultravioleta de la fracción I.d. E.ético. Col 1

En este espectro se observa una única banda correspondiente al solvente utilizado, acetato de etilo teóricamente este se observa a 256 nm. Por lo que se supone que el compuesto analizado genera ninguna señal en el UV.

Según los resultados de las pruebas analizadas el compuesto obtenido con acetato de etilo es posiblemente un triterpeno pentacíclico o una sapogenina esteroideal, ya que estos dan positiva la prueba de rosenthaler con una coloración verdosa.



Figura 38. Resultados de la prueba Rosenthaler para la fracción I.d. E.ético. Col 1 positiva para sapogeninas esteroidales o triterpenoideas.

## 8. CONCLUSIONES

- En el análisis fitoquímico realizado a los extractos etanólicos de hojas y flores de la *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. Ex Willd se determinó posiblemente la presencia esteroides, isoprenoides, glicosidos cardiotónicos, saponinas, sesquiterpenlactonas, alcaloides y cumarinas volátiles.
- No se determinó la presencia de heterosidos cianogenéticos, flavonoides, de quinonas oxidadas y reducidas y de taninos, en las hojas, ni en las flores de *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. Ex Willd.
- En los tiempos de extracción asistida por ultrasonido se determino que el tiempo óptimo de extracción en ambas partes de la planta es a los 10 minutos, ya que en estos extractos se observaron los mejores resultados.
- En el análisis preliminar de las hojas y las flores de *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd según las pruebas realizadas, se encontró mayor abundancia de glicosidos cardiotónicos y de saponinas.
- La humedad de las hojas y las flores de *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd fueron de 83,382 % y 80,199 %.
- La concentración letal media estimada para cada uno de los extractos fue de 390,404 ppm; 1686,64 ppm; 315,202 ppm; 240,201 ppm; (madre, hexano, diclorometano, acetato de etilo) para las hojas y para las flores 489,427 ppm; 383,592 ppm; 158,532 ppm; 184,638ppm (madre, hexano, acetato de etilo, residuo). Con tiempos de exposición de 48 y 72 horas Presentando mayor toxicidad las flores que las hojas.
- Los extractos etanólicos madre de las hojas y las flores no presentaron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *E. coli*, ni actividad antifungica frente *C. albicans*.
- En la prueba antitumoral realizada con las células de Mieloma Murino, se observo una inhibición de la propagación de las células y de sus funciones metabolicas, en todos los extractos tanto de flores como de hojas al adicionar 50µL a 1000 ppm, a 25µL únicamente en los extractos de butanol hojas, residuo butanol y diclorometano flores.

- En la prueba de citotoxicidad realizada con células de BHK, se observaron resultados positivos al adicionar 25µL a 1000 ppm en butanol hojas, butanol y diclorometano flores.
- En el ensayo de germinación de semillas de tomate *Solanum lycopersicum* y lechuga *Lactuca sativa* la CI50 (concentración inhibitoria) fue de: 115,848 ppm hojas, 94,642 ppm flores y 383,043 ppm hojas, 219,468 ppm flores, las cuales son bastante altas causando un efecto letal sobre el embrión de las semillas, dejando claro que la *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd presenta un posible efecto alelopático para impedir el crecimiento de otras plantas.
- Se logró el aislamiento de dos de los compuestos presentes en el extracto etanólico madre de las hojas por medio de cromatografía de columna, en la cual la fracción I.d. MeOH Col. 5 obtenida con metanol, presentó pruebas químicas y resultados de IR y UV característicos de un glicosido cardiotónico de tipo pentadienolido. Mientras que la fracción I.d. E.ético. Col 1 obtenida con acetato de etilo presentó pruebas químicas y de IR y UV características de una saponina esterooidal o de una saponina triterpeno pentacíclico.

## RECOMENDACIONES

- Para futuras investigaciones se recomienda realizar estudios sobre la capacidad antitumoral, antifúngica y antimicrobiana que la *Iresine diffusa* Humb & Bonpl. ex Willd pueda tener, con las fracciones de distintas polaridades y con las obtenidas en la separación por columna cromatográfica.
- Realizar cromatografías de capa fina y columna del extracto etanólico madre de las flores para comparar con los resultados obtenidos del extracto etanólico madre de las hojas, ya que en las pruebas fitoquímicas preliminares se observan diferencias entre las hojas y las flores.
- Llevar a cabo una comparación de las diferentes especies de *Iresine diffusa*, para determinar sus posibles aplicaciones.

## BIBLIOGRAFIA

- 1- PEZZUTO JM. Plant - Derived Anticancer Agents. *Biochemical Pharmacology* 1997. 53: 121-133p.
- 2- OSORIO D., EDISON J. Aspectos Básicos de Farmacognosia. Universidad de Antioquia. 2009.
- 3- RÍOS M., ALVAREZ L. Magn. Reson. Chem. 2005; **43**: 339-342p.
- 4- SÁNCHEZ DEL PINO I., FLORES H., VALDES J. La Familia Amaranthaceae en la Flora Halófila y Gipsofila de México. Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México. *Seria Botánica*. 1999. 70(1): 29-135p.
- 5- YIZHONG C., MEI S., HAROLD C. Department of Botany and Department of Zoology, The University of Hong Kong, *J. Agric. Food Chem.* 2003. 51: 2288-2294p.
- 6- RÍOS M. Op. Cit. 24p.
- 7- DJERASSIP C., SENGUPTA A S., HERRAANN J., WALLS D F. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química. December, 1953.
- 8- CRABBE P., LEEMING P. R., DJERASSI C. The Department of Chemistry of Wayne State University. 1958.
- 9- GÓMEZ A. ALVARO; RIVERA P. HORACIO; Descripción de Malezas en Plantaciones de café, CENICAFE 1987. 138-139p.
- 10- RZEDOWSKI G. C., RZEDOWSKI J. 2001. Flora Fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.

- 11-Instituto de Ciencias Naturales. Herbario Nacional Colombiano. Identificación Taxonómica. Bogotá D.C. Noviembre 2009.
- 12-Instituto de Biología. "*Iresine diffusa* Humb. & Bonpl. ex Willd. - IBUNAM: MEXU:OAX626986".UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2008-10-22. Universidad Nacional Autónoma de México. (Consultada en: 2010-2-26). Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX626986>.
- 13-GÓMEZ A. Op. Cit. 139p.
- 14-RÍOS M. Op. Cit. 1p.
- 15-ARANGO A., GABRIEL J. Introducción al Metabolismo Secundario, Compuestos Derivados del Ácido Shikimico. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. 2008. 3, 4p.
- 16-BILBAO M.R., Análisis Fitoquímico Preliminar. Universidad del Quindío. 1997. 57p.
- 17-DOMÍNGUEZ X.A. Métodos de Investigación Fitoquímica. Centro Regional de Ayuda Técnica. AID. Editorial Limusa, México. 1978. 139p.
- 18-BILBAO M.R. Op. Cit. 59p.
- 19-DOMÍNGUEZ X.A Op. Cit. 195p.
- 20-BILBAO M.R. Op. Cit. 65p.
- 21-SANABRIA A. Análisis Fitoquímico Preliminar. Universidad Nacional. 1983. 27p.
- 22-BILBAO M.R. Op. Cit. 35p.
- 23-ARANGO A. Op. Cit. 20p.
- 24-DOMÍNGUEZ X.A Op. Cit. 153p.

- 25- BILBAO M.R. Op. Cit. 43p.
- 26- SANABRIA A. Op. Cit. 39p.
- 27- BILBAO M.R. Op. Cit. 33p.
- 28- GAO M. LIU C. 2005. "Comparison Techniques for the Extraction of Flavonoids From Cultures Cells of *Saussurea medusa* Maxim". *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21: 1461-1463p.
- 29- ROSTAGNO M., Palma M. Barroso C. 2003. "Ultrasound-Assisted Extraction of Soy Isoflavones". *Journal of Chromatography A*. 1012: 119-128p.
- 30- VINATORU M. 2001. "An Overview of the Ultrasonically Assisted Extraction of Bioactive Principles From Herbs". *Ultrasonics Sonochemistry*. N.º 8: 303-313p.
- 31- BENSON. AGRICULTURE & FOOD INSTITUTE & CORPORATION. Determinación de Toxicidad y de Bioactividad de Cuatro Insecticidas Orgánicos Recomendados Para el Control de Plagas en Cultivos Hortícolas. <http://bensoninstitute.org/Publication/RELAN/V13/V133/Determinacion.asp>. Consultado el día 16 de mayo del 2010.
- 32- MARTÍNEZ P. N. Análisis del Procedimiento para la Determinación de la DL50 (Dosis Letal Media) A Través del Método de Probit en un Bioensayo. Revista de investigaciones de la Universidad del Quindío Vol 4, N° 12, Septiembre. [On line] © Copyright 1997 Monografias.com S.A. [Citado 30/06/07] disponible en Internet <http://www.monografias.com/trabajos14/dosis-letal/dosis-letal.shtml>
- 33- PRATS G. Microbiología Clínica. Panamericana, Buenos Aires. 50-51p.
- 34- RIVERO M.A., Padola N.L., Etcheverria A.I., Parma A.E. *Escherichia coli* Enterohemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. *Journal of Medicina*. 2004; 64: 352-356p.
- 35- NABÓN A., Staphylococcus aureus Resistente a Betalactámicos en Infecciones Detectadas en la Comunidad. *Revista de Salud Militar*. 2006. 28(1):26-33p.

- 36- MONTENEGRO J., Tratado de Diálisis Peritoneal. ELSEVIER, España. 2009. 325-326p.
- 37- VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA ISSN 0121-4004, ISSN 2145-2660. Volumen 17 número 1, año 2010. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 67-74p.
- 38- MANUAL DE FITOQUÍMICA TOMO III. UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN. INSTITUTO DE ESTUDIOS VEGETALES.
- 39- CASTILLO G. (ed.). 2004. *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*. IDRC, IMTA, Canadá. 202p.
- 40- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 1984. Terrestrial Plants: Growth Test. Guideline for Testing of Chemicals N ° 208. OECD Publications Service, París.
- 41- WANG W, 1987. Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 6: 409-414p.
- 42- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1989. Protocols for shortterm toxicity screening of hazardous waste sites. US EPA 600/3-88/029, Corvallis.
- 43- BILBAO M.R. Op. Cit. 104 -117p.
- 44- BILBAO M.R. Op. Cit 125-127p.
- 45- ZULUAGA F., Obando B., Yates B. Análisis Orgánico Clásico y Espectral. Santiago de Cali. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. 2000.
- 46- SKOOG, HOLLER, NIEMAN, Principios de Análisis Instrumental, Quinta Edición. Mc Graw Hill. Madrid. España 2001. 435p.
- 47- ALBA M., JORGE E., DURAN R., MELVIN A., VALENCIA S., HOOVER A., Físicoquímica Aplicada, Fundamentación Experimental. Universidad Tecnológica de Pereira. 2008. 104-106p.



- 48-SANABRIA A. Análisis Fitoquímico Preliminar. Universidad Nacional. 1983.
- 49-COOKE R.D., MADUAGWU E.N. 1978. The Effects of Simple Processing on the Cyanide Content of Cassava Chips. *J. Food Technol.*, 13: 299-306.  
SÁNCHEZ V. D., SANDOVAL P., HERRERA. (1982). *Rev. Cubana Farm.* 16: 39-44p.
- 50-MESA T.J. Plantas Medicinales, Aromáticas y Venenosas de Cuba. Ed. Ciencia y Técnica, Instituto del Libro, La Habana, (1965). 540-1p.
- 51-FAO. Manual para el cultivo y uso de artemia en acuicultura <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab474s/AB474S08.htm#ch8.4.2>. Consultado el día domingo, 14 de marzo de 2010.
- 52-DESMARCHELIER. CRISTIAN; MONGELLI. ELENA; COUSSIO JORGE; *Acta Farm. Bonaerense* 14 (3): 195-208 (1995).
- 53-PRATS G. Op. Cit. 50p.
- 54-GATICA C., GESCHE E. "Método de las 5 Placas" para la Detección de Residuos de Antibacterianos en Leche. *Revista Científica. Revista Científica.* 2007 Vol. XVII, N°3, 231-238p.
- 55-ESCOBAR L., —Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT empleados en la evaluación de citotoxicidad sobre tres líneas celulares tumorales , Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana, 2007.
- 56-O'Brien J., Wilson I., Orton T. Pognan F., Investigation of the Alamar Blue (resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity, *Eur. J: Biochem.* 2000. 267, 5421-5426p.
- 57-Nociari M.M., Shalev A., Benias P., Russo C., A Novel one-step, Highly Sensitive Fluorometric Assay to Evaluate Cell-Mediated Cytotoxicity, *Journal of Immunological Methods.*1998. 213,157-167p.
- 58-CASTILLO G. Op. Cit. 5p.

- 59- BILBAO M.R. Op. Cit. 118-123p.
- 60- ROJAS R. Preservación de la Guadua. *Universidad San Buenaventura-Cali*. 2003.
- 61- DOMÍNGUEZ X.A Op. Cit. 200p.
- 62- NAKANISHI K. Infrared Adsorption Spectroscopy. Tohoku: Nakodo Company Limited, 1964. 150p.
- 63- Wall M.E., Krider M.M., Rothman E.S., Eddy C.R. Steroidal Sapogenins. I. Extraction, Isolation and Identification. *J, Biol Chem*. 1952. 198, 533p.

# ANEXOS

## Tabla de miscibilidades



### Tabla de Miscibilidad de Disolventes

	Solubilidad en agua %m/m	Índice de Refracción 20°C	UV (nm) Cutoff 1 AU	Punto de Ebullición °C	Viscosidad cPoise	Índice de Polaridad
Xileno						
Tricloroetileno						
Tolueno						
Tetrahidrofurano (THF)						
Tetracloruro de Carbono						
Di-Isopropil Eter						
Iso-Propanol5						
n-Propanol						
Pentano						
Metil Etil Cetona4						
Metil-t-Butil Eter3						
Metanol						
Hexano						
Heptano						
Eter Dietílico						
Etanol						
Dioxano						
Dimetilsulfóxido (DMS)						
Dimetilformamida (DMF)						
Diclorometano2						
1,2-Dicloroetano1						
Cloroforno						
Ciclohexano						
n-Butanol						
Benceno						
Agua						
Acetonitril						
Acetona						
Acetato de Etilo						
Acetato de Butilo						
Acido Acético						
Acido Acético	100	1.372	230	118	1.26	6.2
Acetato de Butilo	7.81	1.399	215	118	2.98	3.9
Acetato de Etilo	8.7	1.372	260	77	0.45	4.4
Acetona	100	1.359	330	56	0.32	5.1
Acetonitrilo	100	1.344	190	82	0.37	5.8
Agua	100	1.333	200	100	1.00	9.0
Benceno	0.18	1.501	280	80	0.65	2.7
n-Butanol	0.43	1.394	254	125	0.73	4.0
Ciclohexano	0.01	1.426	200	81	1.00	0.2
Cloroforno	0.815	1.446	245	61	0.57	4.1
1,2-Dicloroetano1	0.81	1.444	225	84	0.79	3.5
Diclorometano2	1.6	1.424	235	41	0.44	3.1
Dimetilformamida (DMF)	100	1.431	268	155	0.92	6.4
Dimetil Sulfóxido (DMS)	100	1.478	268	189	2.00	7.2
Dioxano	100	1.422	215	101	1.54	4.8
Etanol	100	1.360	210	78	1.20	5.2
Eter Dietílico	6.89	1.353	220	35	0.32	2.8
Heptano	0.0003	1.387	200	98	0.39	0.0
Hexano	0.001	1.375	200	69	0.33	0.0
Metanol	100	1.329	205	65	0.60	5.1
Metil-t-Butil Eter3	4.8	1.369	210	55	0.27	2.5
Metil Etil Cetona4	24	1.379	329	80	0.45	4.7
Pentano	0.004	1.358	200	36	0.23	0.0
n-Propanol	100	1.384	210	97	2.27	4.0
Iso-Propanol5	100	1.377	210	82	2.30	3.9
Di-Isopropil Eter		1.368	220	68	0.37	2.2
Tetracloruro de Carbono	0.08	1.466	263	77	0.97	1.6
Tetrahidrofurano (THF)	100	1.407	215	65	0.55	4.0
Tolueno	0.051	1.496	285	111	0.59	2.4
Tricloroetileno	0.11	1.477	273	87	0.57	1.0
Xileno	0.018	1.500	290	139	0.61	2.5

- <sup>1</sup> Cloruro de Etileno
- <sup>2</sup> Cloruro de Metileno
- <sup>3</sup> Terc- Butil Metil Eter
- <sup>4</sup> 2-Butanona
- <sup>5</sup> 2-Propanol

■ Inmiscible □ Miscible

## Estandarizacion de reactivos

Metabolito	Patrón	Prueba	Resultado
Taninos	Acido tánico	FeCl <sub>3</sub>	++
		Acetato de plomo	++
		Gelatina-sal	++
Flavonoides	Hesperidina Ginkgo biloba	Shinoda	++
Quinonas	Hidroquinona	Acido Base	- +
Triterpeno pentacíclico	Extracto de ruibarbo	Liebermann Buchard	++
Esteroles	Colesterol	Liebermann Buchard	+++
Saponinas	Extracto de zarzaparrilla	Vainilla	++
Glicosidos cardiotonicos	$\beta$ -metil digoxina	Baljet Kedde Legal	++ ++ ++
Esteres	Acetato de etilo	Hidroxamato ferrico	++
	Acetato de amilo		++
Carotenoides	B-caroteno	Acido sulfúrico	+++
Azucares	Glucosa	Fehling	+++
		Tollens	+++
		Molish	+++

Estandarización de solventes

Solvente	hexano	Éter de petróleo	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	CHCl <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Butanona	Acetato de amilo	Propanona	Etanol	metanol
<b>Taninos</b>										
-FeCl <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Acetato de Pb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Gel-sal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Flavonoides</b>										
-Shinoda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Quinonas</b>										
- H <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- OH <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Esteroles</b>										
-Liebermann Burchard	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Saponinas</b>										
-Vainillina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Cardiotónicos</b>										
- Baljet	-	-	-	-	-	-	-	F+	-	-
- Kedde	-	-	-	-	-	-	-	F+	-	-
-Legal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Azucres</b>										
-Molish	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Tollens	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Fehling	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Keller-Killiani	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Carotenos</b>										
-Karr-price	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Lactonas terpenicas</b>										
-hidroxamato ferrico	-	-	-	-	F+	-	-	-	-	-

Tabla de absorancias en el UV- Vis de solventes.

Disolvente	UV Cutoff (nm)	Disolvente	UV Cutoff (nm)
1-Nitropropano	380	Dietilamina	275
2-Butoxietanol	220	Dioxano	215
Acetona	330	Etanol	210
Alcohol amílico	210	Éter de petróleo	210
Acetato de etilo	256	Etilen glicol	210
Acetato de metilo	260	Iso-octano	215
Acetonitrilo	190	Isopropanol	205
Benceno	280	Isopropil éter	220
Ciclohexano	200	Metanol	205
Ciclopentano	200	Metil etil cetona	330
Cloroformo	245	Metil isobutil cetona	334
Cloruro amílico	225	Nitrometano	380
Cloruro de isopropilo	225	n-Pentano	190
Cloruro de metileno	233	n-Propanol	210
Cloruro de n-Propilo	225	Piridina	330
Disulfuro de carbono	380	Tetracloruro de carbono	265

Identificación taxonómica Instituto de ciencias naturales Universidad nacional.



Bogotá D.C., 26 de Noviembre de 2009  
Col - 186

Señores  
AYLIN VIVIANA SILVA  
Bogotá

Asunto: Identificación Taxonómica.


Cordial Saludo,

Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

Nombre:	<i>Iresine diffusa</i> Hum & Bonpl. ex Willd.
Familia:	AMARANTHACEAE
No. COL:	538510
Colección:	A, Silva, J. Sierra
No Colección:	0.01
Determinó:	S. Suárez, Nov. 2009

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.

Cordialmente,

  
Prof. Luis Carlos Jiménez  
Curador General  
Herbario Nacional Colombiano -COL.  
E-mail: herbacol\_fcbog@unal.edu.co

Copia Archivo COL  
-266- 2"

ciencia y tecnología para el país

Carrera 30 No. 45-04, Ciudad Universitaria, Edificio 425, Entrada Calle 53.  
Tel: (57-1) 3165305 Comutador: (57-1) 3165000 Ext. 11538 - Aparrado 7495  
Fax (57-1) 3165365 Comutador: (57-1) 316 50 00 Ext. 11502 o 11538  
Correo electrónico: herbacol\_fcbog@unal.edu.co  
Bogotá, Colombia, Sur America