

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Estudio farmacológico de los extractos etanólico, hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y acuoso de las hojas de *Daucus carota* (zanahoria) como sedante hipnótico (Fase II)

Lilian Haydée González Rosales

Química Farmacéutica

Guatemala, septiembre de 2004

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Estudio farmacológico de los extractos etanólico, hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y acuoso de las hojas de *Daucus carota* (zanahoria) como sedante hipnótico (Fase II)

Informe Final de Tesis

Presentado por

Lilian Haydée González Rosales

Para optar al título de

Química Farmacéutica

Guatemala, septiembre de 2004

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Lic. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Roberto José Garnica Marroquín	Vocal IV
Br. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A DIOS:

Por colocar generosamente su sabiduría y su amor a mi alcance para poder salir al mundo en busca de mis sueños. Porque éste es un trabajo totalmente tuyo, por permitirme servir de instrumento de tu obra en el mundo.

A MIS PADRES:

Por ser los seres especiales que Dios eligió para mi formación. Por enseñarme el valor de las pequeñas cosas y que la excelencia está en los detalles. Gracias porque siempre han creído en mí y por su amor incondicional.

A MI HERMANA:

Por poner el toque de sabor a cada día y hacer de cada momento una experiencia única.

A MIS ABUELOS (+)

Porque siempre conté con su apoyo, su cariño y la seguridad de sentirme bienvenida en sus corazones. Porque este triunfo representa el cumplimiento de una de sus mayores ilusiones: verme convertida en una profesional.

A MIS TIOS Y PRIMOS:

Por todo su cariño, su apoyo y por compartir conmigo los momentos más importantes de mi vida. En especial a tí, Kelita, por se mi amiga del alma, mi confidente, la persona que busco cuando no entiendo el mundo y necesito paz interior.

A MI COLEGIO

Instituto Belga Guatemalteco por se mi segunda casa durante mi infancia y mi adolescencia y por enseñarme que "quien no vive para servir no sirve para vivir".

A MIS AMIGAS DEL COLEGIO

Por ser mis compañeras de viaje por un tiempo y aunque nuestros caminos tomaron senderos distintos, nuestra amistad permanece.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Por darme la oportunidad de ser uno de los privilegiados que integran esta casa de estudios.

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Por abrirme sus puertas y darme una formación integral que me permite crecer y desenvolverme como profesional.

AL CLAUSTRO DE DOCENTES DE LA ESCUELA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

Por cada una de sus enseñanzas que formaron la profesional que soy y por darme el maravilloso privilegio de compartir con ellos la labor de la docencia. En especial a la Licda. Raquel Pérez Obregón, por darme la confianza de llamarla mi amiga, por brindarme su apoyo incondicional y por enseñarme que en la vida siempre debemos tener algo con que soñar; y la Dra. Amarillis Saravia, por darme las herramientas que me ayudan a ser mejor cada día y por creer en mí y en mi trabajo.

A MIS AMIGOS

Por ser los ángeles que Dios buscó para que me cuidaran aquí en la tierra.

A MI PROMOCIÓN DE LA UNIVERSIDAD

Porque lo importante no es llegar, sino el camino que recorrimos juntos, los lazos que nos unen y nos hacen más fuertes. Juntos alcanzamos esta meta que nos llena de satisfacción y nos demuestra lo mucho que podemos ser.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS Por ser mi guía y la luz que ilumina cada uno de mis pasos, gracias porque he visto la maravillosa manifestación de tu amor en mí y porque puedo verla en cada una de las sonrisas de aquellos que me aman.

A MI ASESORA, Dra. Amarillis Saravia, por su exigencia y rectitud, la cual llevo de ejemplo para la vida, realizando un trabajo ético y responsable con el emblema del servicio, tal y como lo realiza usted.

Gracias a la Licda. Sully Cruz, a Cristian López, Ruth Molina, Ana Luisa Hernández y Karla Hernández por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo que hoy me permite presentarme como una profesional con alto grado de responsabilidad para con mi país y con el mundo.

INDICE

	pag.
1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Antecedentes	5
4. Justificación	8
5. Objetivos	9
6. Hipótesis	10
7. Materiales y métodos.....	11
8. Resultados y Discusión de Resultados.....	28
9. Conclusiones	47
10. Recomendaciones	48
11. Bibliografía	49
12. Anexos	53

1. RESUMEN:

El presente trabajo constituye un estudio fito-farmacológico de las propiedades sedantes - hipnóticas de las hojas de *Daucus carota* (zanahoria). La infusión de hojas de esta planta ha demostrado tener actividad sedante hipnótica a dosis de 750mg/kg y de 1000mg/kg de peso en ratones machos albinos (11.16) y es importante continuar con el estudio fase II para determinar el principio activo responsable de dicha actividad.

Con este propósito se extrajeron con solventes de distintas polaridades (etanol, hexano, cloroformo, acetato de etilo y agua), las diferentes porciones de principios activos que posee la planta, para determinar cual de éstas es responsable de la acción sedante hipnótica. Los distintos extractos se disolvieron en solución de goma arábiga y se administraron por vía oral a dosis de 50, 125 y 300 mg/kg de peso a ratones machos albinos de 20g de peso aproximadamente; se procedió a la realización de los tests farmacológicos: Placa agujereada, Prueba del Rotarod, Prueba de la Chimenea y Prueba de Potenciación del Sueño, utilizando Se utilizó como fármaco de referencia en todas las pruebas el Haloperidol y además Pentobarbital para inducir el sueño en la prueba de potenciación del sueño.

Los resultados para los distintos extractos muestran una actividad sedante e hipnótica para el extracto etanólico y el extracto de acetato de etilo, puesto que disminuyeron la curiosidad, equilibrio y tono muscular y prolongaron el tiempo de sueño de los ratones en experimentación. Para la prueba de la placa agujereada se realizó un análisis de Kruskal-Wallis ($p=0.0001$). Para las pruebas de Rotarod, chimenea y potenciación del sueño se realizó un análisis de Dunnett. ($p<0.00001$)

Se determinó la toxicidad aguda de los extractos etanólico y de acetato de etilo, empleando dosis de 250, 350 y 450 mg/kg de peso de los extractos a 5 ratones machos albinos, observándose durante 8 días; se estableció que los extractos no son tóxicos a dosis $< 450\text{mg/kg}$ de peso en ratones albinos.

Al realizar el tamizaje fitoquímico de los extractos etanólico y de acetato de etilo, realizando ensayos macro y semimicro y cromatografía en capa fina, se evidencia la presencia de cumarinas, antraquinonas, principios amargos (terpenos) y aceites volátiles.

2. INTRODUCCIÓN:

La fitoterapia ha tomado auge en el mundo entero como una alternativa en el tratamiento de muchas afecciones del organismo. (11.32) Guatemala es un país con una gran variedad de plantas medicinales utilizadas comúnmente por la población desde hace miles de años, por esto es necesario que se realicen estudios científicos, tanto farmacológicos, fitoquímicos y toxicológicos de las especies vegetales para determinar su efectividad y seguridad; contribuyendo así con la base de datos referente a las actividades terapéuticas de las plantas nativas del país y dando un respaldo farmacológico a los tratamientos naturales que cada vez se utilizan más en el ámbito nacional e internacional.

Dentro de estas especies vegetales utilizadas por la población se encuentra *Daucus carota*, conocida como zanahoria. La infusión de hojas de esta planta ha demostrado tener actividad sedante hipnótica (11.16); es importante y necesario continuar con los estudios farmacológicos y fitoquímicos de fase II, extrayendo con solventes de distintas polaridades las diferentes porciones de principios activos que posee la planta, para determinar cual de éstas es responsable de la acción sedante hipnótica.

Luego de obtener los extractos, se procedió a realizar el ensayo farmacológico utilizando ratones albinos, dividiéndoles en grupos similares que recibieron agua, un fármaco de referencia (Haloperidol) y los distintos extractos respectivamente. Los extractos etanólico y acetato de etilo mostraron la mayor actividad sedante hipnótica y carecen de efecto tóxico al realizar el ensayo toxicológico. (DL₅₀). La caracterización fitoquímica evidencia que son ricos en cumarinas, antraquinonas, principios amargos y aceites volátiles.

3. ANTECEDENTES:

Fármacos sedantes hipnóticos

Los fármacos sedantes hipnóticos deprimen el Sistema Nervioso Central de manera dependiente de la dosis, con producción progresiva de sedación, sueño, pérdida del conocimiento, anestesia quirúrgica, como y depresión letal de la respiración y función cardiovascular. (11.8; 11.10; 11.28; 11.27)

***Daucus carota*: zanahoria.**

Es una planta perteneciente a la familia Umbellifera, se usa como alimento y es uno de los recursos terapéuticos más valiosos. Se utilizan las hojas, las semillas y principalmente la raíz de la planta.

(11.9; 11.11; 11.15; 11.23; 11.29; 11.36)

Principios activos:

- Raíz: Glucosa, sacarosa, mucílagos, pectina, vitaminas (C, B1, B2), proteínas, y sobre todo carotenos (provitamina A), transformada en el hígado en vitamina A.

(11.9; 11.11; 11.15; 11.23; 11.29; 11.36)

- Semillas: Aceite esencial, conteniendo pineno, limoneno, carotol, daucol, ácido isobutírico, asarona. Bases terciarias.

(11.9; 11.23; 11.29; 11.36)

Acción Farmacológica

- Raíz: utilizada popularmente como antidiarreica, remineralizante y vitamínica. Según algunos estudios prospectivos, el consumo de zanahorias puede reducir el

riesgo de cáncer pulmonar y de otros tipos de cáncer, aunque debemos ser prudentes a la hora de hacer una valoración de estos datos.

También se ha dicho que el zumo de zanahoria disminuye los niveles de colesterol. Experimentalmente se ha visto que tiene un papel protector sobre el daño hepático agudo provocado por tetracloruro de carbono en animales.

(11.9; 11.11; 11.15; 11.21,11.23; 11.24; 11.29; 11.36)

Son importantes para la alimentación sobre todo por la cantidad de Beta-caróteno, precursor de la vitamina A. El betacaroteno es un carotenoide un pigmento vegetal que, una vez ingerido, se transforma en el hígado y en el intestino delgado en vitamina A. Es un componente antioxidante que favorece la no aparición del cáncer, especialmente el de pulmón, boca y estómago. También se ha demostrado que previene la aparición de enfermedades del corazón. Además, como se transforma en vitamina A, tiene propiedades antidermatósica, antianémica, cicatrizante gástrica. De igual forma por la presencia de pectina y en mucílago urónico (antidiarréico), se emplea en dietética infantil, en las diarreas infantiles, en las dermatosis, gastritis, úlceras gastroduodenales y la disminución de la agudeza visual.

(11.9; 11.11; 11.15; 11.23; 11.22; 11.24; 11.25; 11.29)

Encierra sustancias hipoglucemiantes, lo que les hace un alimento recomendable en los diabéticos. La pulpa de zanahoria ha sido empleada, en aplicaciones externas, contra diferentes afecciones cutáneas, ya que calma el prurito.

(11.9; 11.11; 11.15; 11.23; 11.24; 11.29)

Se le han atribuido propiedades vermífugas, antisépticas, diuréticas, digestivas, cicatrizantes; sin embargo un estudio farmacológico realizado por Montúfar, M y Saravia A. en 1994, en ratas albinas demostró que la infusión de raíz de *Daucus carota* al 10% no posee actividad diurética.

(11.7; 11.14; 11.24)

- Semillas: usadas tradicionalmente como aperitivas, carminativas, diuréticas, galactógenas y vermífugas. El aceite esencial ha mostrado, in vitro, producir un efecto antiespasmódico sobre la fibra muscular lisa (útero, aparato digestivo, vasos sanguíneos), además de un efecto bactericida sobre gérmenes gram positivos. La infusión de la semillas puede disminuir los niveles de colesterol.

(11.9; 11.11; 11.15; 11.21,11.23; 11.29)

Experimentalmente se ha demostrado una actividad hipotensora debida a un bloqueo en los canales del calcio. Del mismo modo se ha mostrado un estímulo de la respuesta inmune humoral, aumentando la producción de linfocitos CD4. Contienen una sustancia antiespasmódica y cardioactiva cuyo efecto se parecería al de la teofilina.

(11.9; 11.11; 11.15; 11.23; 11.28; 11.29)

Numerosos autores han señalado la presencia de un compuesto coronario dilatador cuya estructura no ha sido determinada. Su aceite esencial se muestra antimicrobiano. Las simientes y semillas son diuréticas, colagogas, eupépticas (compuestos de estructura mal conocida).

(11.9; 11.11; 11.15; 11.23; 11.28; 11.29)

- Hojas: las hojas picadas en fresco y mezcladas con miel se usan para tratar heridas. Estudios farmacológicos recientes realizados por Reyes, M y Saravia, A. en ratones, muestran que la infusión al 10% de hojas de *Daucus carota* posee actividad sedante hipnótica.

(11.7; 11.9; 11.16; 11.23; 11.29)

4. JUSTIFICACIÓN:

En Guatemala, la medicina tradicional es un pilar fundamental en materia de salud, tanto por la crisis económica que se vive como por las tradiciones propias de cada comunidad en cuanto a los "remedios caseros". Sin embargo, es importante que se realicen estudios científicos que respalden la eficacia de dichos productos para darle mayor seguridad al consumidor y mayor validez a la actividad terapéutica de las plantas. Estudios anteriores han demostrado la actividad sedante hipnótica de la infusión de hojas de *Daucus carota* (zanahoria) a distintas dosis. Para validar el uso de ésta, es necesario continuar con los ensayos farmacológicos y fitoquímicos de fase II, que demuestren por medio de una separación con extractos de distintas polaridades, qué porción es la responsable de dicha actividad.

5. OBJETIVOS:

5.1 Objetivos Generales:

- 5.1.1 Contribuir con el estudio que realiza la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, sobre la validación de plantas medicinales de uso popular en Guatemala.
- 5.1.2 Proporcionar información que sirva de base para futuras investigaciones.

5.2 Objetivos específicos:

- 5.2.1 Dar seguimiento a los estudios realizados anteriormente con la especie *Daucus carota* (zanahoria).
- 5.2.2 Determinar el extracto o los extractos de hojas de *D. carota* (zanahoria) que presente mayor actividad sedante hipnótica en ratones albinos.
- 5.2.3 Evaluar la toxicidad aguda del extracto o extractos de hojas de *Daucus carota* (zanahoria) responsable del efecto sedante - hipnótico.
- 5.2.4 Realizar un tamizaje fitoquímico al extracto o extractos de hojas de *D. carota* (zanahoria) que presente mejor respuesta sedante hipnótica.

6 HIPOTESIS:

Al menos uno de los extractos etanólico, hexánico, clorofórmico, acetato de etilo o acuoso de las hojas de *Daucus carota* posee actividad sedante hipnótica al evaluarlos en ratones albinos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS:

7.1 Universo de trabajo:

Extractos etanólico, hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y acuoso obtenidos de las hojas de la especie *Daucus carota* (zanahoria).

7.2 Medios:

7.2.1 Recursos humanos:

- Autor del trabajo: Br. Lilian Haydée González Rosales
- Asesora: Dra. Amarillis Saravia Gómez

7.2.2 Recursos materiales:

- Laboratorio de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Laboratorio de Productos Naturales LIPRONAT, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Material y equipo de laboratorio.
- Ratonos machos albinos de 20-23g de peso.
- Reactivos químicos
- Cromatoplasmas de sílica gel
- Solventes para las extracciones: etanol, hexano, cloroformo, acetato de etilo, agua.
- Fármacos de referencia: Haloperidol y Pentobarbital
- Rotavapor
- Ampollas de decantación
- Balanza para animales
- Tabla agujereada
- Rotarod
- Tubo de vidrio: chimenea
- Beakers
- Probetas
- Jeringas de 1mL
- Sondas orogástricas

7.3 Procedimiento:

7.3.1 Revisión bibliográfica

7.3.2 Recolección de las hojas de *Daucus carota*

7.3.3 Secado de la planta (hojas) por secado indirecto al sol

7.3.4 Molienda de la planta: utilizando tijeras para cortar el material vegetal, las hojas secas de *Daucus carota* se redujeron de tamaño y se pasaron por un molino de aspas para disminuir el tamaño de la partícula.

7.3.5 Obtención de los extractos:

- Obtención del extracto etanólico: En un percolador de 2000mL adaptado, se extrajo el material vegetal seco de hojas con 1500mL de etanol por medio de percolación a temperatura ambiente y durante varios días se repitió este procedimiento. Luego se filtró el extracto obtenido y se reconcentró en rotavapor a temperatura controlada menor de 45°C y a presión reducida. Finalmente se llevó a sequedad en una desecadora con sílica gel.

(11.1; 11.6; 11.13; 11.31; 11.33; 11.34)

- Obtención del extracto hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y acuoso: se disolvió lo obtenido del extracto etanólico en etanol al 70% al cual se le realizó una partición líquido-líquido con disolventes de distinta polaridad: hexano, cloroformo, acetato de etilo y agua. Los disolventes se eliminan por concentración con rotavapor y con liofilización para el extracto acuoso.

(11.1; 11.31; 11.34).

7.3.6 Ensayo farmacológico:

7.3.6.1 Prueba de la placa agujereada:

Este test mide la actividad de un ratón colocado en situación libre, en tabla cuadrada con 16 agujeros, es una prueba de estudio de comportamiento que permite apreciar la curiosidad, actividad exploradora y eventualmente la ansiedad.

Procedimiento:

- Material: tabla cuadrada de madera con 16 perforaciones, cronómetro.
- Condiciones del experimento: se utilizan ratones blancos de un peso aproximado de 20 gramos.
- Testigos: reciben por vía oral una suspensión gomosa 30 minutos antes de la experimentación.
- Fármaco de Referencia: se administra por vía IP Haloperidol 5mg/kg de peso, 30 minutos antes de la experimentación.
- Extractos a investigar: se administra por vía oral los distintos extractos a investigar (etanólico, hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y acuoso), 30 minutos antes de la experimentación.
- Técnica: El ratón es colocado delicadamente sobre la tabla y pasa periódicamente la cabeza dentro de los agujeros. Se determina el número de agujeros explorados cada minuto durante 5 minutos. No se toma en cuenta ni cuando el animal se para delante de un agujero sin explorarlo ni cuando explora los bordes, así como cuando explorados o más veces el mismo agujero.
- Evaluación: se anota el número de agujeros explorados por minuto y el número total durante los 5 minutos. Este test es positivo cuando el número de agujeros explorados por el animal tratado con los extractos a investigar, disminuye hasta acercarse o igualarse al tratado con Haloperidol.

(11.3; 11.4; 11.5; 11.14;11.16;11.17)

7.3.6.2 Prueba del Equilibrio o Coordinación: Rota Rod.

Se determina el tiempo durante el cual el ratón mantiene su posición sobre el eje que da vueltas a una velocidad lenta. La administración previa de un inhibidor del sistema nervioso central, provoca disturbios de coordinación, produciendo la caída del ratón. Ello permite el estudio de los reflejos de equilibrio y coordinación de los animales bajo estudio.

- Aparato: cilindro que da vueltas, con discos verticales de 22cm de diámetro, colocados a intervalos de 10cm separado en compartimientos, el movimiento de rotación es de 14rev/min.
- Condiciones del experimento: se utilizan ratones albinos de un peso aproximado de 20 gramos.
- Testigos: reciben por vía oral una suspensión gomosa 30 minutos antes de la experimentación.
- Fármaco de Referencia: se administra por vía IP Haloperidol 5mg/kg de peso, 30 minutos antes de la experimentación.
- Extractos a investigar: se administra por vía oral los distintos extractos a investigar (etanólico, hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y acuoso), 30 minutos antes de la experimentación.
- Técnica: Los ratones antes del inicio del test son entrenados varias veces consecutivas quedándose un tiempo mínimo de 2 minutos sobre el cilindro que gira; los animales que caen son eliminados.

Se inicia el test 30 minutos después de la administración y se anota el tiempo de la caída de cada uno. Se inicia así cada media hora durante 2 horas. Los ratones deben mantenerse en equilibrio al menos 3 minutos.

(11.3; 11.4; 11.5; 11.14;11.16;11.17)

7.3.6.3 Prueba de la Chimenea:

Este test de estudio permite apreciar los efectos sobre el tono muscular y el equilibrio.

- Material. Se utiliza un tubo de vidrio de 30cm de largo en donde el diámetro es seleccionado según el peso del animal, varilla de vidrio, cronómetro.
- Condiciones del experimento: se utilizan ratones albinos de un peso aproximado de 20 gramos. Testigos: reciben por vía oral una suspensión gomosa 30 minutos antes de la experimentación.
- Fármaco de Referencia: se administra por vía IP Haloperidol 5mg/kg de peso, 30 minutos antes de la experimentación.
- Extractos a investigar: se administra por vía oral los distintos extractos a investigar (etanólico, hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y acuoso), 30 minutos antes de la experimentación.
- Técnica: Con el tubo en posición horizontal, se introduce en él el ratón con la cabeza hacia delante, empujándolo con la varilla de vidrio. Cuando el animal llega al otro extremo del

tubo, se pone el tubo en posición vertical. Inmediatamente el ratón tiende a subir de retroceso. Es test es positivo cuando la subida se efectúa en menos de 30 segundos.

(11.3; 11.4; 11.5; 11.14;11.16;11.17)

7.3.6.4 Prueba de la potencialización del sueño: búsqueda de la acción sedativa.

La potencialización de la narcosis, es uno de los test de sedación, que permite medir la influencia de medicamentos o plantas medicinales sobre la duración del sueño, inducido por un hipnótico. Esta prueba es utilizada para el estudio de los fármacos psicodépticos (hipnóticos).

- Condiciones del experimento: se utilizan ratones albinos de un peso aproximado de 20 gramos, sometidos a un ayuno de 24 horas.
- Testigos: reciben por vía oral una suspensión gomosa 30 minutos antes de la administración de Pentobarbital IP a dosis de 60mg/kg de peso, al tiempo 0.
- Fármaco de Referencia: se administra por vía IP Haloperidol 5mg/kg de peso, 30 minutos antes de la administración IP de Pentobarbital a dosis de 60mg/kg de peso, al tiempo 0.
- Extractos a investigar: se administra por vía oral los distintos extractos a investigar (etanólico, hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y acuoso), 30 minutos antes de la administración IP de Pentobarbital a dosis de 60mg/kg de peso, al tiempo 0.
- Técnica: se utiliza el criterio de endormecimiento, pérdida del "righting reflex" (reflejo de enderezamiento), que permite anotar el tiempo de endormecimiento de los ratones. El regreso del enderezamiento marca el despertar del ratón. La pérdida del reflejo de enderezamiento es cuando el animal queda en posición acostada y no camina.
- Evaluación: se anota a partir del tiempo 0, la duración del adormecimiento y la duración del sueño. Se comparan los tiempos de adormecimiento y tiempo total de sueño de los testigos y los tratados con fármaco de referencia y extractos.

(11.3; 11.4; 11.5; 11.14;11.16;11.17)

7.3.7 Ensayo toxicológico: Método de Spearman y Karber

Se determinó la DL₅₀ al extracto etanólico y de acetato de etilo los cuales presentaron un efecto sedante hipnótico significativo comparado con el fármaco de referencia. El ensayo preliminar se trabajó con 5 lotes de 5 ratones albinos, con un peso aproximado de 20 gramos procedentes de una misma camada. La alimentación es idéntica para todos los sujetos experimentales.

La sustancia a ensayar se administra por vía oral y la dosis se aumenta en progresión geométrica, se evaluaron dosis diferentes, siendo estas: 250, 350 y 450 mg/kg de peso, observándose el comportamiento de los ratones y número de animales muertos. La muerte puede manifestarse a las 1, 2, 4, 6, 24, 48 horas y un máximo de 8 días o bien morir instantáneamente o pocos minutos después de administrar la dosis. El extracto a ensayar se administra por vía oral, la mortalidad se anota 8 días después del ensayo. A dosis altas, la muerte aparece en algunos minutos, a veces instantáneamente. Los signos precursores de muerte pueden ser temblores, sialorrea, sudores, espasmos respiratorios, convulsiones, etc.

Cálculos: se aplica la fórmula de Karber y Behrenus:

$$DL_{50} = Df - \frac{(a) * (b)}{(n)}$$

Df = Primera dosis que mata todos los animales

a = suma de muertes de 2 lotes consecutivos/2

b = Diferencia entre 2 dosis consecutivas.

n = número de animales por lote

Los resultados para la dosis letal 50 son dados en mg o g por kg de peso.

$$DL_{50} = X \text{ mg/kg}$$

$$DL_{50} = X \text{ g/kg}$$

(11.6; 11.14)

7.3.8 Caracterización fitoquímica:

Se realizó un tamizaje fitoquímico al extracto etanólico y al de extracto de acetato de etilo, que fueron los que presentaron mayor respuesta sedante - hipnótica, para ello se utilizaron ensayos macro y semimicro y cromatografías en capa fina.

7.3.7.1 Ensayos macro y semimicro:

La caracterización de los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico y de acetato de etilo de las hojas de *Daucus carota* se realizó por medio de la formación de precipitados y complejos coloreados. Estos se disuelven previamente en metanol y se tratan químicamente de acuerdo al metabolitos secundarios a identificar. (Cuadro 7.1)

(11.1; 11.11; 11.16)

Cuadro 7.1 Ensayos macro y semimicro

Metabolito secundario	Tratamiento químico	Detección
Alcaloides	Pesar 0.01g del extracto. Adicionar 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10% hasta pH 8-9, añadir 25ml de metanol a 60°C. Filtrar y acidificar con HCl 2N y dividir en 4 tubos: Tubo 1: 5 gotas de reactivo de Mayer`s Tubo 2: 5 gotas de reactivo de Dragendorff Tubo 3: 5 gotas de reactivo de Wagner. Tubo 4: Testigo	Formación de precipitados, turbidez o precipitación por complejo.
Flavonoides y Antocianinas	Extraer 0.01 g del extracto con 10 mL de etanol o metanol al 80%. Triturar con 15mL de éter de petróleo hasta que la extracción sea incolora. Disolver el residuo en 30mL de metanol al 80%, filtrar y dividir en 5 tubos: Tubo 1: Agregar HCl 2N en n-propanol, dejar en reposo de 15 a 30 minutos.	

	<p>Tubo 2: Agregar 3 a 5 gotas de FeCl_3 Al 10%</p> <p>Tubo 3: Agregar 0.5mL de HCl concentrado y calentar en baño maría por 5 minutos.</p> <p>Tubo 4: Agregar magnesio metálico y 0.5 mL de HCl concentrado.</p> <p>Tubo 5: Testigo.</p>	<p>Tubo 1: color rojo violeta da positivo.</p> <p>Tubo 2: color azul-verde catequinas.</p> <p>Tubo 3: Color rojo a violeta da para leucoantocianinas.</p> <p>Tubo 4: Flavonas dan color rojo-naranja.</p> <p>Flavonoles: carmesí</p> <p>Heterósidos agliconas : verde-azul.</p>
Cumarinas	<p>Pesar 0.01g del extracto y adicionar 10mL de metanol. Agregar 1mL de agua destilada hirviendo. Con un capilar aplicar 2 manchas en papel filtro. A una mancha agregar 1 gota de KOH 0.5N.</p>	<p>Observar bajo luz UV a 365nm fluorescencia azul o verde: positivo.</p>
Cardenólidos y Bufadienólidos	<p>Presencia de lactonas insaturadas:</p> <p>Pesar 0.003 g del extracto y disolver en 10 mL de metanol al 80%. Colocar 3 manchas en papel filtro: 0.1, 0.2 y 0.3mL. Secar y agregar unas gotas del reactivo de Kedde. Secar.</p> <p>Presencia de azúcares 2-desoxigenadas:</p> <p>Evaporar 10mL del extracto etanólico, eliminar los pigmentos coloreados con éter de petróleo. Secar el residuo y agregar 3mL del reactivo de Kéller-Killiani. Pasar a un tubo, mezclar y resbalar 1-2mL de ácido sulfúrico concentrado por la pared del tubo.</p>	<p>Observar cambio de color: mancha o anillo púrpura: positivo. Utilizar como estándar un extracto de <i>Digitalis purpurea</i> en metanol al 80%</p> <p>Observar la formación de un anillo púrpura en la interfase.</p>

Saponinas	<p>Prueba de espuma</p> <p>Tubo 1: 0.001g del extracto</p> <p>Tubo 2: 2mL del control de saponinas.</p> <p>Tubo 3: 2mL de agua.</p> <p>Añadir a cada tubo 10mL de agua destilada. Calentar en baño maría por 30 minutos. Enfriar. Agitar vigorosamente por 30 segundos.</p>	Capa de espuma mayor de 3 centímetros después de 30 minutos.
Taninos	<p>Pesar 0.001 g del extracto, disolver en 30mL de etanol o metanol al 80%. Añadir 25mL de agua caliente, agitar con una varilla, dejar enfriar.</p> <p>Agregar 1mL de solución de NaCl al 10%, filtrar.</p> <p>Adicionar 3mL del filtrado a 4 tubos de ensayo.</p> <p>Tubo 1: Testigo</p> <p>Tubo 2: solución de gelatina al 1%</p> <p>Tubo 3: solución de gelatina sal</p> <p>Tubo 4: solución de FeCl₃ al 10%</p>	<p>Precipitados o flóculos evidentes.</p> <p>Para el cloruro férrico: coloración grisácea-negro tipo catecol</p> <p>Coloración negro-azulado tipo pirogalol.</p>
Glicósidos Cianogénicos	<p>Prueba de Guignard:</p> <p>Colocar 0.005g del extracto en un erlenmeyer de 125mL y humedecer con agua, adicionar 1mL de cloroformo. Aparte, introducir 1 tira de papel Whatman No. 1 en picrato de sodio (recién preparado) y posteriormente secar: la tira de papel húmedo insertarla en el erlenmeyer que contiene el material vegetal, cuidando de no topar las paredes y dejar a 1cm de distancia de la muestra. Doblar el papel y tapar el erlenmeyer con un corcho. Calentar en baño maría a 37°C durante 3 horas o más.</p>	Observar cualquier cambio de color en el papel. (de amarillo a rojo o rojo-café)

	atropina o papaverina al 1%		
Flavonoides	<p>Mezclar 0.01g del extracto en 10mL de metanol a 60°C en baño maría.</p> <p>FM: Acetato de etilo-ácido fórmico- ácido acético glacial-agua (100:11:11:27)</p> <p>Estándar: solución de flavonoides al 0.05% en metanol.</p>	<p><i>Sin tratamiento</i></p> <p><i>Con tratamiento</i> Reactivo de productos naturales- polietilenglicol. Solución 1: solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina NP, solución etanólica al 5% de polietilenglicol 400 PEG (10:8)</p>	<p>UV-254nm: fluorescen como zonas azules oscuras sobre amarillo.</p> <p>UV 365nm: fluorescen azul, amarillo o verde.</p> <p>Intensa fluorescencia después de 15 minutos en UV-365nm</p> <p><i>Flavonoles</i>: glicósidos de quercetina y miricetina: anaranjado</p> <p>Glicósidos de kanferol e isorametina: amarillo-verde.</p> <p><i>Flavonas</i>: glicósidos de luteolina: anaranjado.</p> <p>Glicósidos de apigenina: amarillo-verde.</p>
Antocianinas	<p>Mezclar 0.01g del extracto en 6mL de metanol/HCl (9:1 HCl al 25%)</p> <p>FM: n-butanol, ácido acético glacial, agua (40:10:20)</p> <p>Estándar: Solución de azul de metileno/ rojo sudán</p>	<p><i>Sin tratamiento</i></p> <p><i>Con tratamiento</i> Anisaldehído – ácido sulfúrico. Luego de esprayar, calentar de 5 a 10 minutos la cromatoplaca.</p>	<p>Rojo o azul violeta en visible.</p> <p>Rojo-violeta en visible, azul violeta.</p>

<p>Antraquinonas</p>	<p>Mezclar 0.01g del extracto en 5mL de metanol y calentar en baño maría por 5 minutos.</p> <p>FM: Acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13)</p> <p>Estándar: solución al 0.1% de Antraquinonas en metanol</p>	<p><i>Sin tratamiento</i></p> <p><i>Con tratamiento</i> Hidróxido de potasio al 5% alcohólico</p>	<p>UV-365nm color amarillo, rojo o café fluorescente.</p> <p>Antraquinonas: zonas rojas en visible y fluorescencia roja. Antronas y antronas: zonas amarillas en visible y fluorescencia amarilla (UV-365nm)</p>
<p>Cumarinas</p>	<p>Mezclar 0.01g del extracto en 10mL de metanol agitando constantemente, calentando en baño maría por 30 minutos.</p> <p>FM: tolueno, acetato de etilo (93:7)</p> <p>Estándar: canela en metanol al 1%</p>	<p><i>Sin tratamiento</i></p> <p><i>Con tratamiento</i> Hidróxido de potasio al 5% alcohólico</p>	<p>UV-254nm todas las cumarinas fluorescen UV-365nm las cumarinas simples fluorescen azul o azul-verde. Las furanocumarinas algunas veces fluorescen amarillo, azul o café. Fluorescencia azul o verde, las cumarinas no sustituidas fluorescen amarillo-verde (UV-365nm)</p>
<p>Cardenólidos y Bufadienólidos</p>	<p>Disolver 0.01g del extracto en 20mL de etanol al 50% manteniendo reflujo por 15 minutos.</p>	<p><i>Sin tratamiento</i></p>	<p>UV-254nm: los cardenólidos producen fluorescencia, muchas zonas fluorescentes son producidas por bufadienólidos UV-365nm: los glicósidos</p>

	<p>Enfriar, filtrar, tratar con ácido acético glacial y extraer con tres porciones de 15mL de diclorometano. Filtrar y concentrar.</p> <p>FM: acetato de etilo, metanol, agua (81:11:8)</p> <p>Estándar: digoxina 5mg/2mL de metanol.</p>	<p><i>Con tratamiento</i></p> <p>Cloruro de antimonio, calentar a 100°C por 6 minutos.</p>	<p>cardenólidos no fluorescen.</p> <p>Visible: zonas violeta o café.</p> <p>UV-365nm: derivados de strophantidina de color anaranjado, café o azul.</p> <p>Glicósidos digitálicos de color café oscuro, azul oscuro o pálido. Glicósidos olander azul claro y los bufadienólidos de color amarillo-café o verde.</p>
Saponinas	<p>Mezclar 0.01g del extracto en 10mL de etanol al 70%, filtrar y concentrar a 5mL.</p> <p>FM: Cloroformo-metanol-agua (32:25:5)</p> <p>Estándar: solución de saponinas al 0.1% en metanol.</p>	<p><i>Sin tratamiento</i></p> <p><i>Con tratamiento</i></p> <p>Vainillina-ácido sulfúrico Anisaldehído ácido sulfúrico. Calentar a 110°C por 5-10 minutos.</p>	<p>Con excepción del ácido glicirrético, las saponinas no son detectadas por la exposición UV-254 o UV-365nm</p> <p>Zonas azules y verdes para saponinas esteroidales; rojas y violetas para saponinas triterpenoides (UV-365nm o visible)</p>
Principios amargos	<p>Mezclar 0.01g del extracto en 10mL de metanol a 60°C en baño maría. Filtrar, reducir a 2mL.</p>	<p><i>Sin tratamiento</i></p>	<p>UV-254nm: sustancias con doble conjugación muestran fluorescencia</p> <p>UV-365nm: algunos muestran fluorescencia inespecífica.</p>

	<p>FM: acetato de etilo, metanol, agua (77:15:8)</p> <p>Estándar: artemisa al 1% en metanol.</p>	<p><i>Con tratamiento</i></p> <p>Vainillina-ácido sulfúrico. Calentar a 100°C por 10 min.</p>	<p>Visible:</p> <p>Neohesperirina, naringina, harpagoside: rojo violeta.</p> <p>Gentiopicoside, swetiamarina: rojo café.</p> <p>Condurangina: azul verde.</p> <p>Foliomentina, mentiafolina, quasina: azul.</p>
Aceites volátiles	<p>Pesar 0.01g del extracto y diluirlo en 1mL de tolueno.</p> <p>FM: tolueno, acetato de etilo (93:7)</p> <p>Estándar: eugenol, timol, mentol, citral; diluido 1:30 en tolueno.</p>	<p><i>Sin tratamiento</i></p> <p><i>Con tratamiento</i></p> <p>Anisaldehído ácido sulfúrico. Calentar a 110°C por 5-10 minutos.</p>	<p>UV-254nm: los componentes con doble conjugación aparecen como zonas oscuras y luego fluorescen a verde claro.</p> <p>UV-365nm: algunos fluorescen azul</p> <p>Visible: zonas azul, verde, rojo y café. Algunos componentes fluorescen en UV-365nm.</p>

(11.1;11.11; 11.18;11.31; 11.35)

7.4 Diseño experimental:

Se utilizó un diseño totalmente al azar, con 3 dosis para cada extracto: 50, 125 y 300 mg/kg de peso.

7.4.1 Integración del diseño:

Tratamientos:

- Control (grupo control negativo con agua)
- Fármaco de Referencia (grupo control positivo)
- Grupo del extracto etanólico a dosis n
- Grupo del extracto hexánico a dosis n
- Grupo del extracto clorofórmico a dosis n
- Grupo del extracto acetato de etilo a dosis n
- Grupo del extracto acuoso a dosis n

Réplicas: el número de ratones por tratamiento se calculó según:

$$n_j = \frac{2Nc^2\sigma^2}{\Delta^2} \quad \text{donde}$$

Nc = nivel de confianza

σ^2 = variabilidad

Δ^2 = límite de error

$$\sigma = \Delta$$

$$n_j = 2Nc^2$$

$$Nc = Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta} = 3.422$$

$$\alpha = 0.05$$

$$\beta = 0.20$$

$$n_j = 2 \cdot 3.422^2 = 6.844 \approx 7 \text{ ratones por tratamiento.}$$

7.4.2 Análisis estadístico:

Para la prueba de la placa agujereada se realizó un análisis de Kruskal-Wallis y comparaciones pareadas con el control negativo. Para las pruebas de Rotarod, chimenea y potenciación del sueño se realizó un análisis de varianza de una vía y comparaciones pareadas con el control negativo, es decir un análisis de Dunnett.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

8.1 Porcentaje de Rendimiento de los extractos de las hojas de *Daucus carota* (zanahoria)

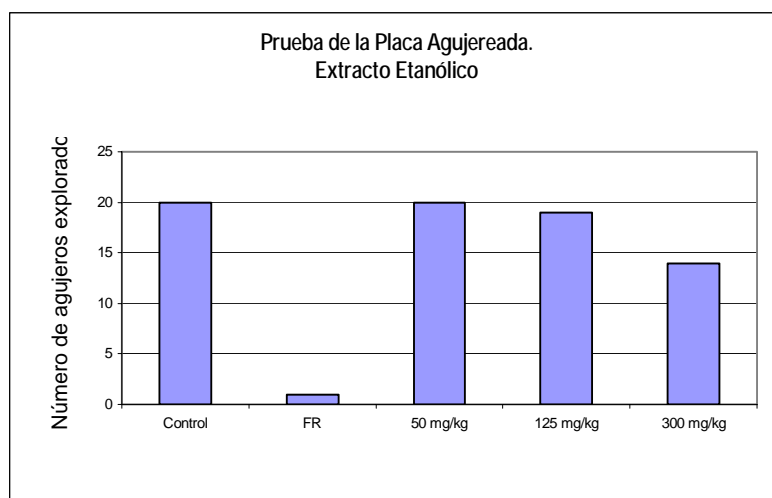
EXTRACTO	PORCENTAJE

Etanólico	38.04
Hexánico	5.60
Clorofórmico	2.68
Acetato de etilo	11.40
Acuoso	19.65

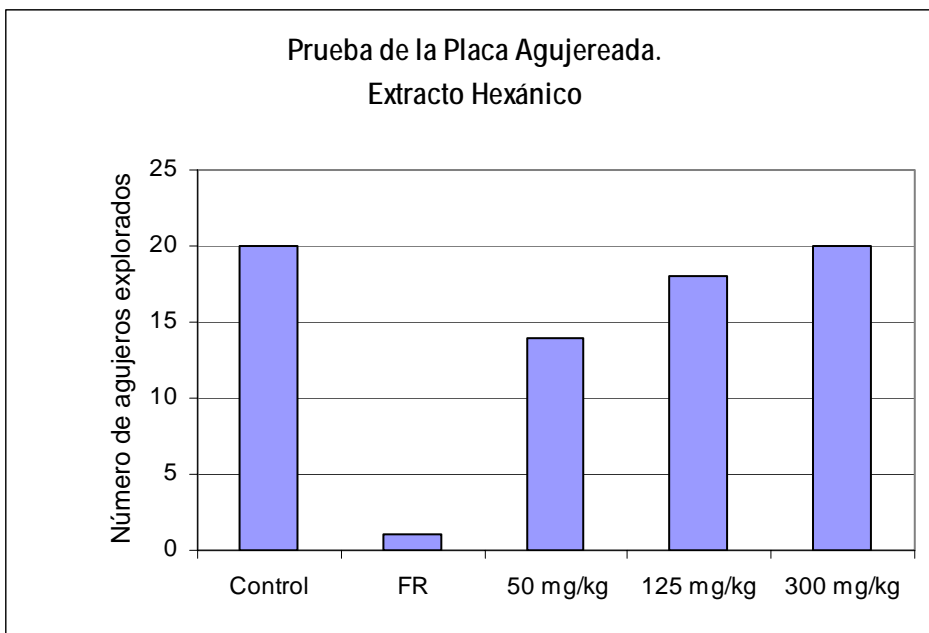
Tabla No. 1: Fuente: experimental. El extracto con mayor porcentaje de rendimiento es el extracto etanólico.

8.2 Prueba de la Placa Agujereada:

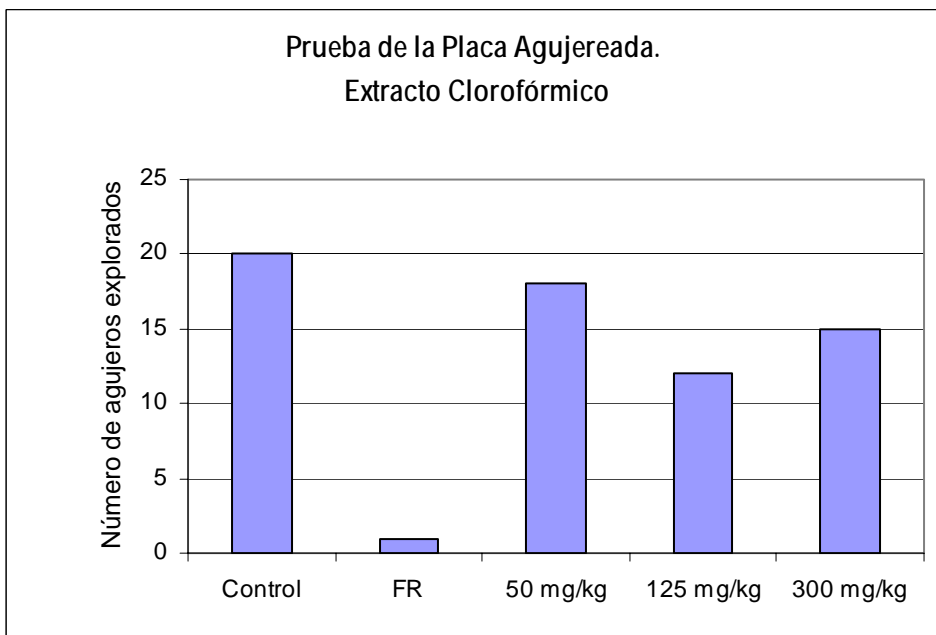
Se realizó el Test de Kruskal-Wallis para el análisis de esta prueba, la cual evalúa el nivel de curiosidad y la reacción exploratoria del ratón. De todos los tratamientos el extracto de acetato de etilo a dosis de 125 y 300 mg/kg de peso muestra una disminución estadísticamente significativa comparado con el control. ($p=0.0001$) Mostrando los primeros indicios de la actividad sedante al aumentar el estado de calma y somnolencia de los ratones.



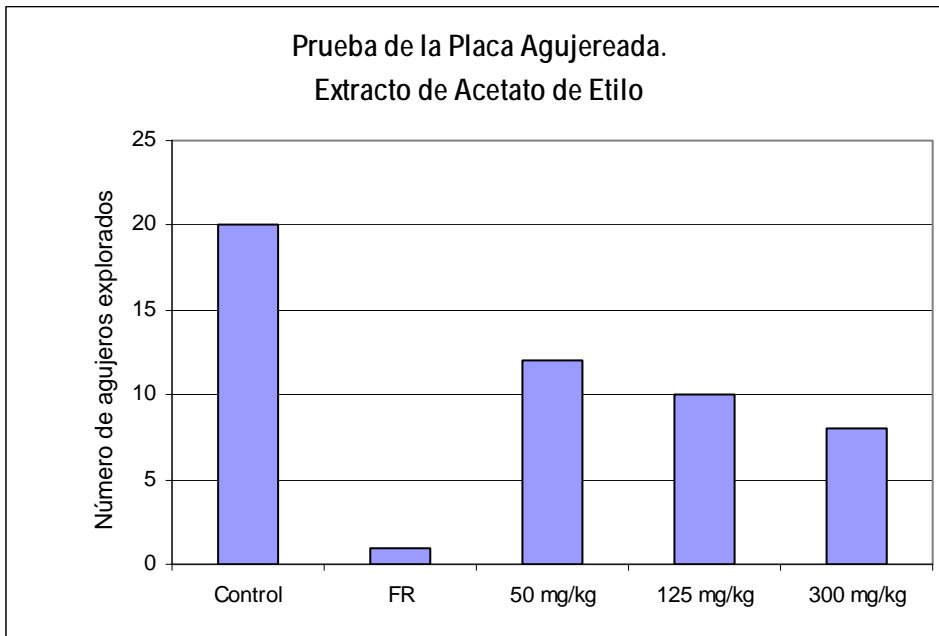
Gráfica No. 1: El extracto etanólico no muestra diferencia significativa.
FR = Fármaco de Referencia (Haloperidol)



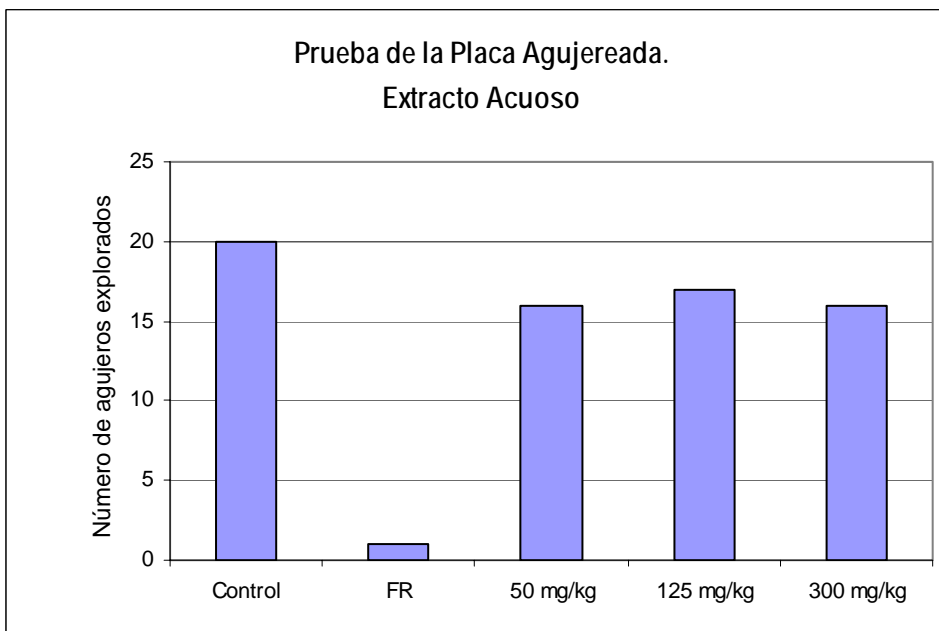
Gráfica No. 2: El extracto hexánico no muestra diferencia significativa.



Gráfica No. 3: El extracto clorofórmico no muestra diferencia significativa al compararlo con el control y el fármaco de referencia.



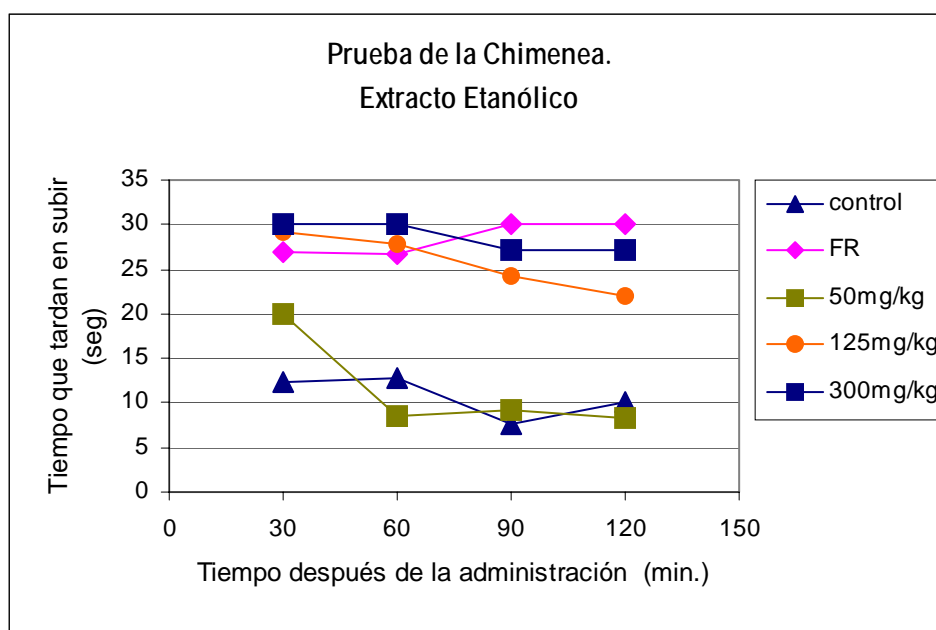
Gráfica No. 4: El extracto de acetato de etilo muestra una diferencia significativa ($p=0.0001$), disminuyendo en más del 50% la curiosidad de los ratones a una dosis de 300mg/kg de peso.



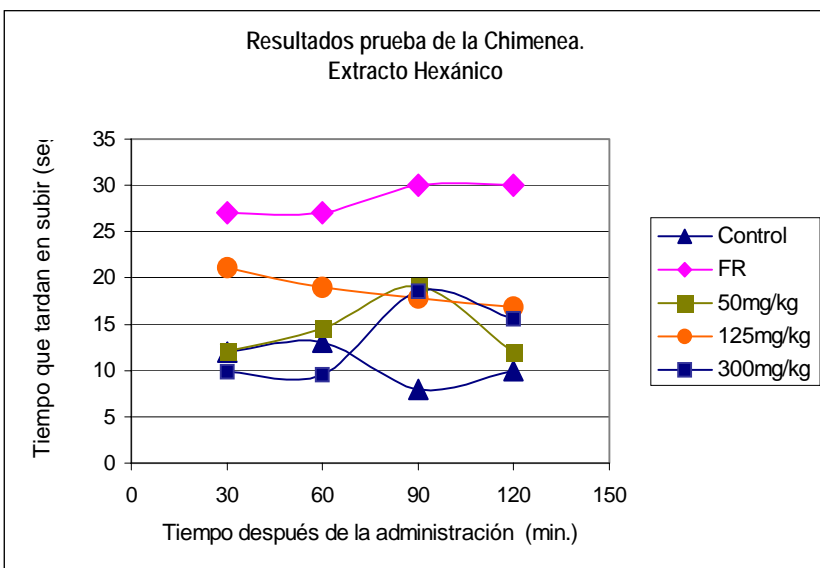
Gráfica No. 5: El extracto acuoso no muestra diferencia significativa con el control y el fármaco de referencia.

8.3 Prueba de la Chimenea:

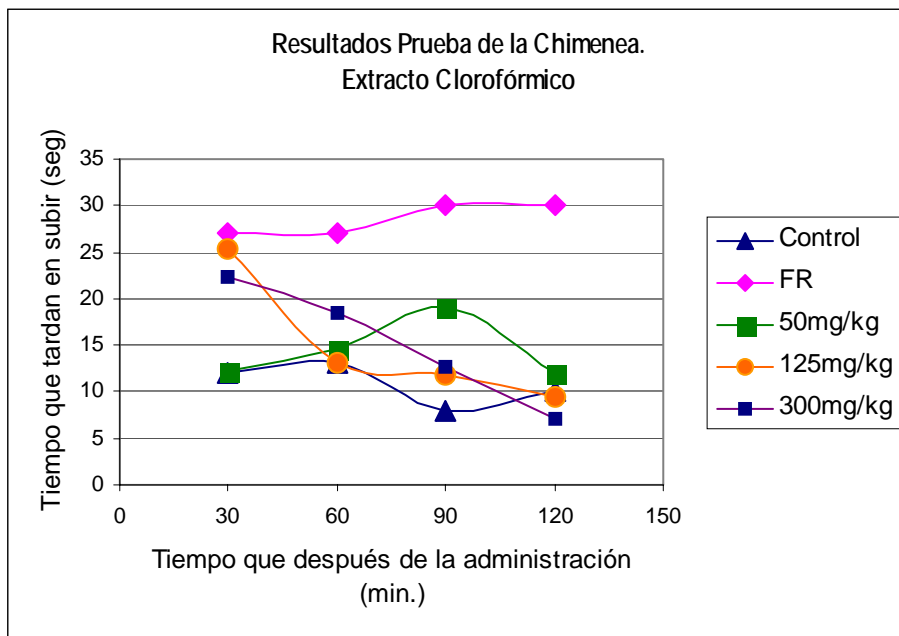
Se trabajó estadísticamente con el área bajo la curva de tiempo de subida vrs. tiempo transcurrido después de la administración. Los tratamientos que mostraron diferencia significativa con el control fueron el extracto etanólico a dosis de 125 y 300mg/kg; los extractos clorofórmico a 125mg/kg, acetato de etilo a dosis de 125 y 300mg/kg de peso mostraron actividad durante los primeros 60 minutos después de la administración, pero luego esta disminuyó hasta alcanzar valores similares al grupo control; lo que demuestra una actividad que no permanece a lo largo del tiempo. ($p < 0.00001$).



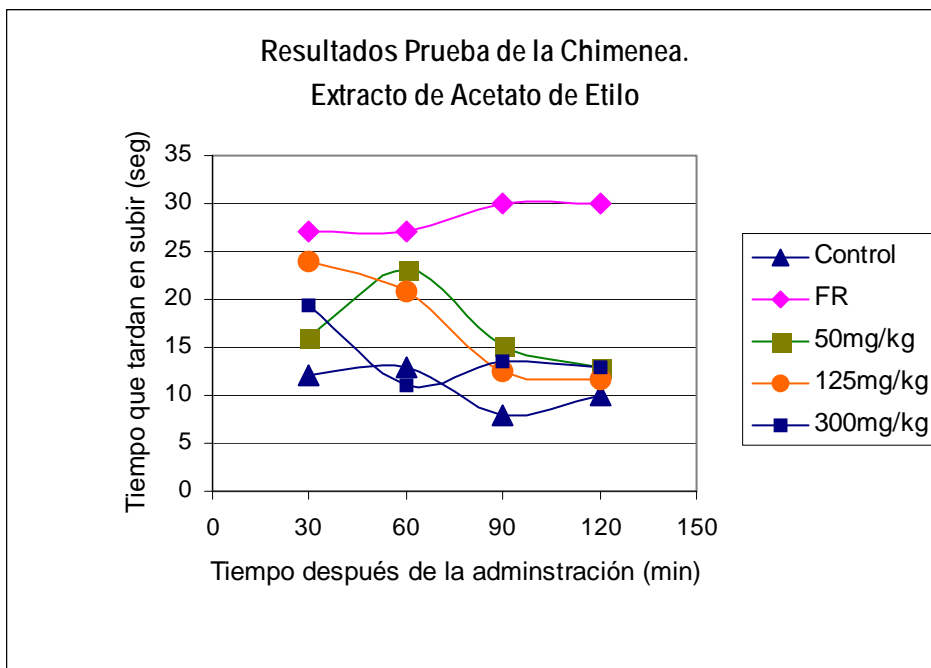
Gráfica No. 6: El extracto etanólico muestra actividad a dosis de 125 y 300mg/kg de peso. ($p < 0.00001$).



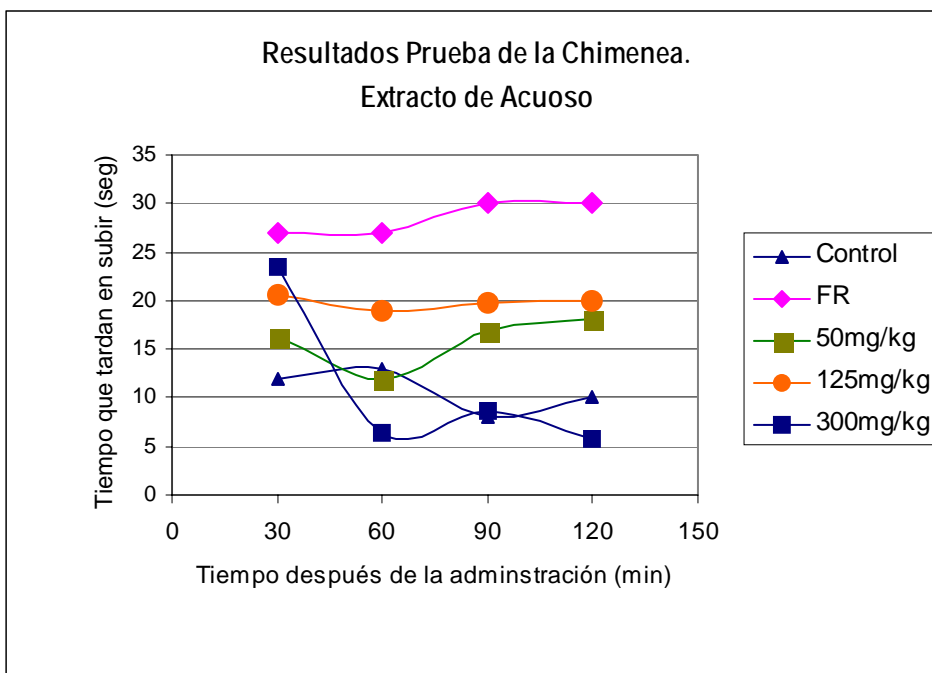
Gráfica No.7 : El extracto hexánico no muestra actividad.



Gráfica No. 8 : Se observa actividad luego de la administración a dosis de 125 y 300mg/kg de peso; sin embargo ésta disminuye a lo largo del tiempo y al hacer el análisis del área bajo la curva, el extracto clorofórmico no muestra una diferencia significativa al grupo control.



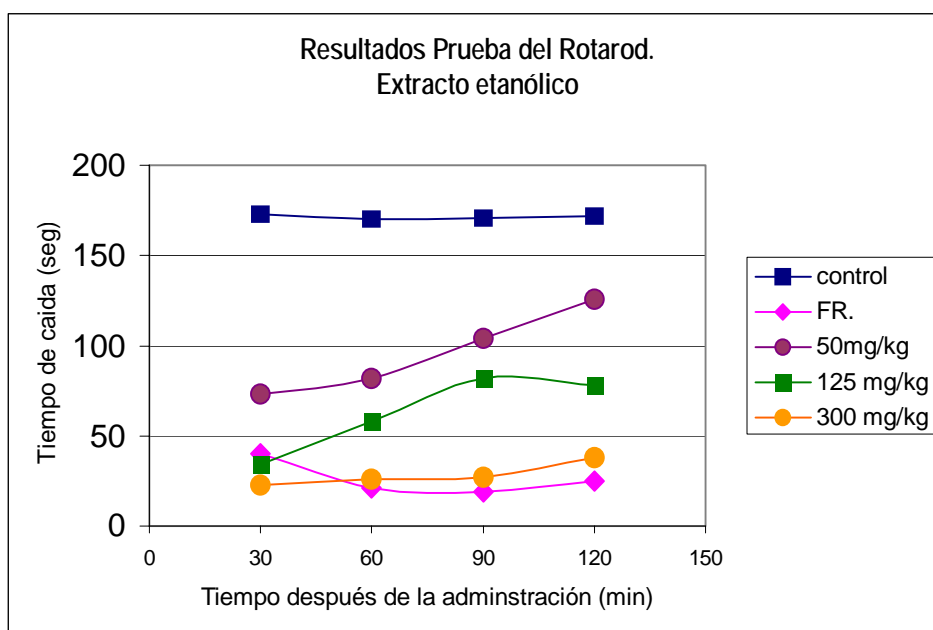
Gráfica No. 9: Se observa actividad al inicio de la administración, la cual disminuye después de los 90 minutos hasta alcanzar los mismos valores del grupo control.



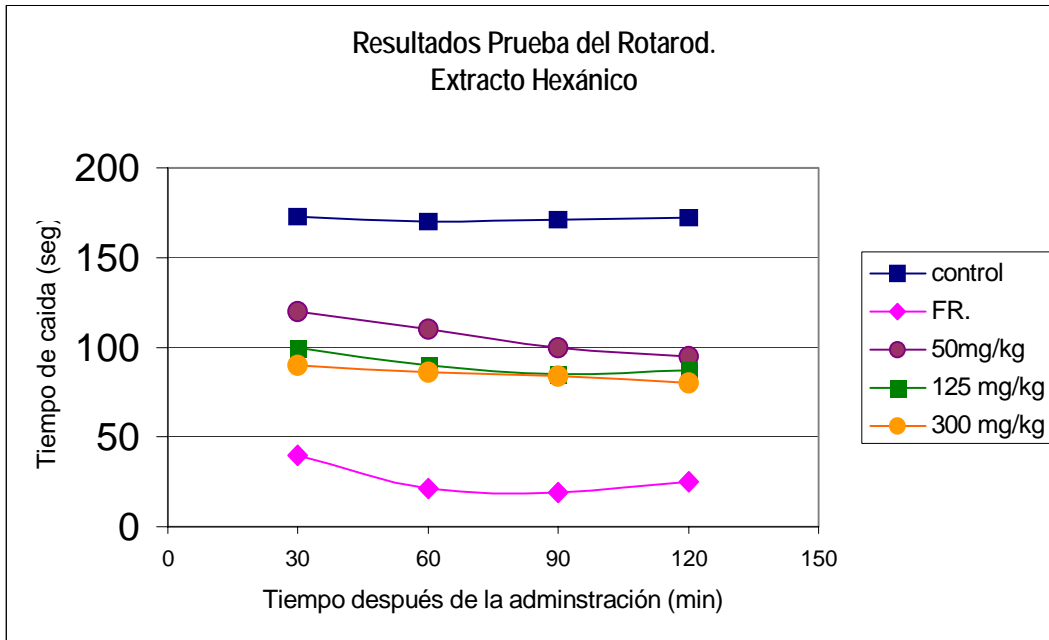
Gráfica No. 10: Al inicio del tratamiento se observa actividad, pero al hacer el análisis del área bajo la curva, no se observa diferencia significativa con el grupo control.

8.4 Prueba del Rotarod:

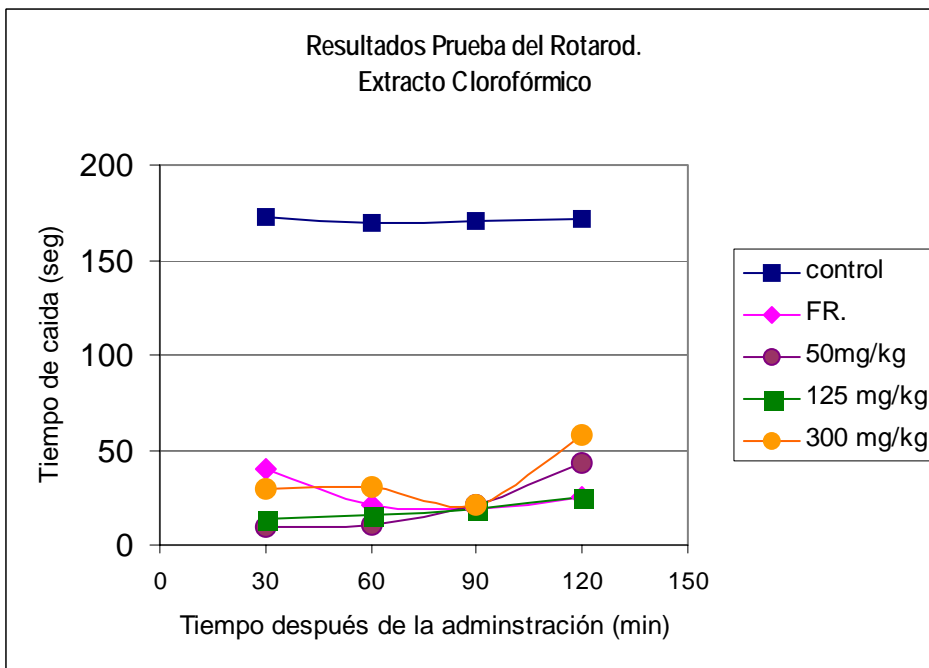
PRUEBA DE DUNNET: Se trabajó estadísticamente con el área bajo la curva de tiempo que tardaron en caer vrs. tiempo transcurrido después de la administración. Todos los tratamientos dieron diferencia significativa con el control, siendo los más evidentes los extractos clorofórmico a dosis de 50 y 125 mg/kg y el de acetato de etilo a 50, 125 y 300mg/kg. ($p < 0.00001$), los cuales presentaron valores de inhibición del equilibrio y la coordinación de los ratones mayor a la presentada por el fármaco de referencia durante los primeros treinta minutos de experimentación; luego de una hora de haber administrado el extracto la actividad había disminuido, pero seguía siendo muy similar al grupo con Haloperidol.



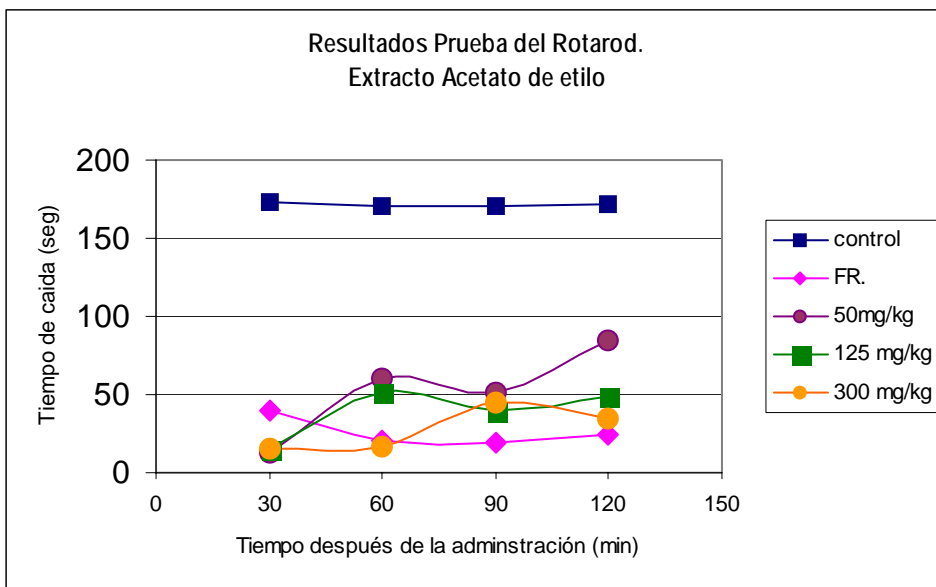
Gráfica No. 11: El extracto etanólico muestra actividad a dosis de 125 y 300mg/kg.



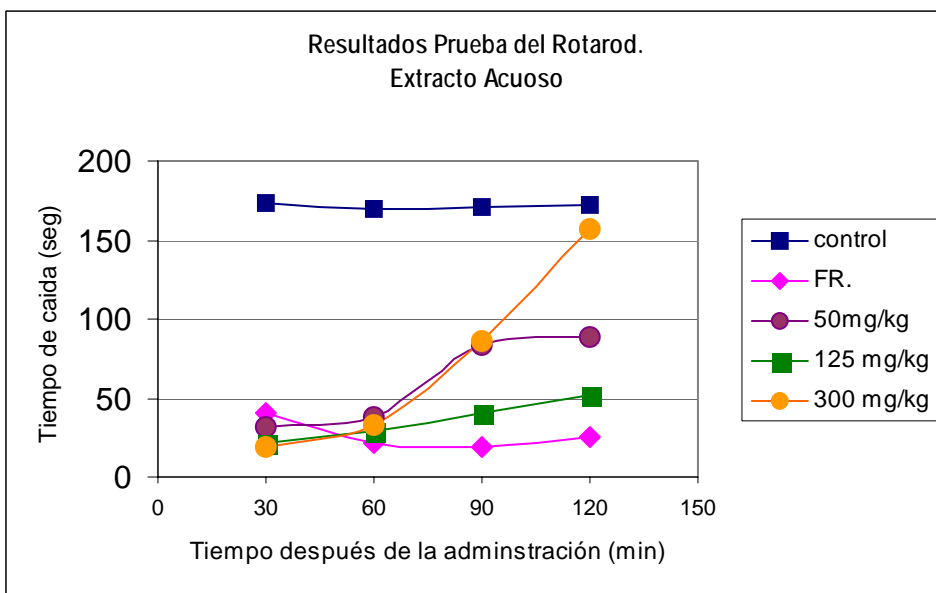
Gráfica No. 12: El extracto hexánico no muestra un comportamiento similar al del fármaco de referencia (Haloperidol).



Gráfica No. 13: El extracto clorofórmico muestra un comportamiento similar al fármaco de referencia y una actividad aún mayor a dosis de 50, 125 y 300 mg/kg de peso del ratón.



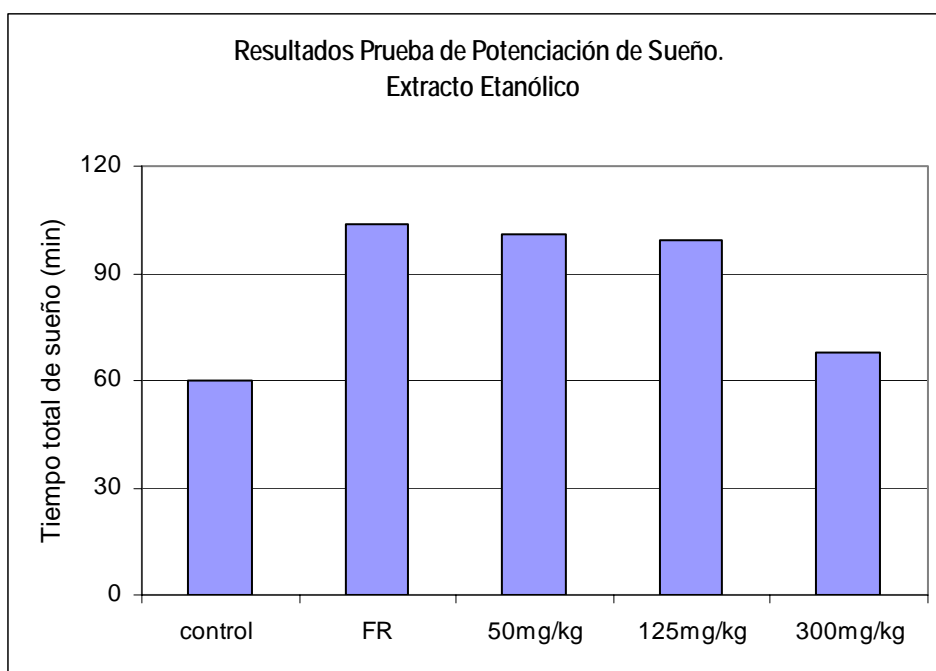
Gráfica No. 14: El extracto de acetato de etilo muestra diferencia significativa al compararlo con el control y una actividad mayor a la del fármaco de referencia después de los 30 minutos de la administración.



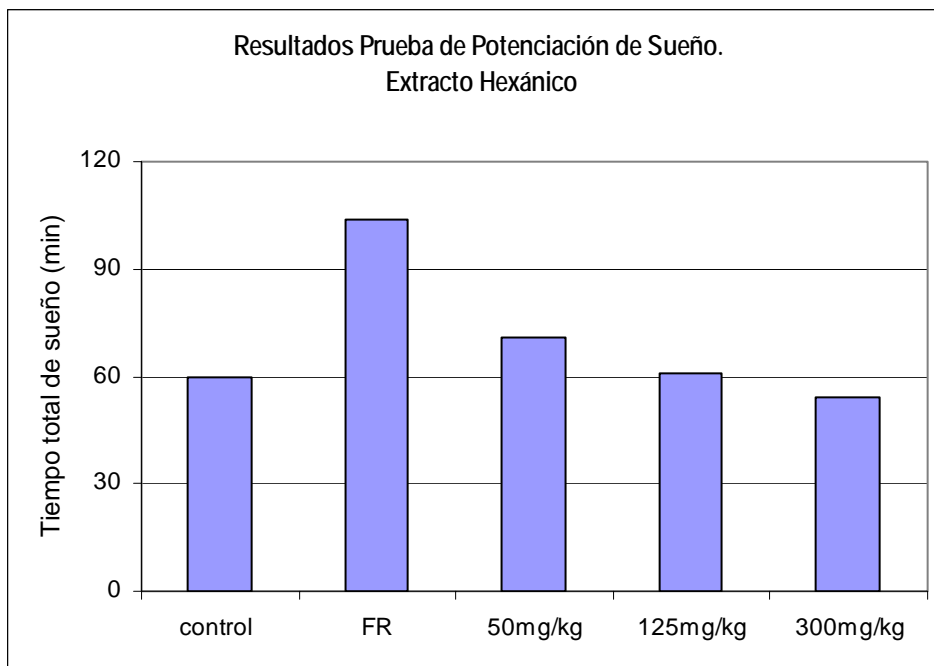
Gráfica No. 15: Se observa actividad durante la primera hora después de la administración del extracto acuoso, al hacer el análisis del área bajo la curva los valores se asemejan al grupo control.

8.5 Prueba de Potenciación del Sueño: Búsqueda de la acción sedativa:

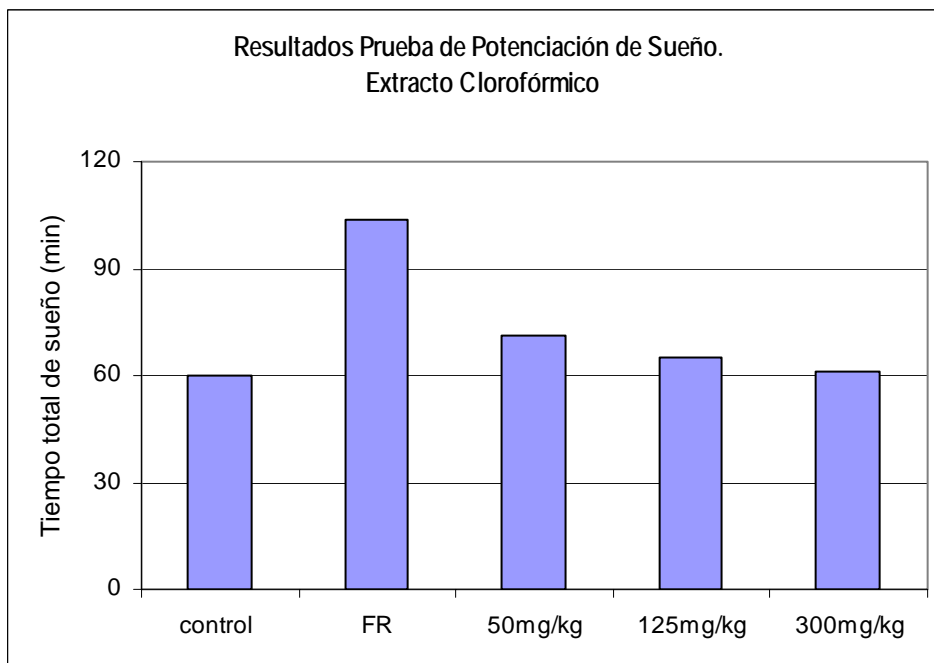
Esta prueba evalúa la influencia de los extractos sobre la duración total del sueño inducido por un hipnótico, en este caso el Pentobarbital. Esto se logra a partir del criterio de endormecimiento o pérdida del reflejo de enderezamiento, el cual marca el inicio de sueño, la recuperación del reflejo de enderezamiento marca el despertar del ratón. Para el análisis de ésta se realizó la PRUEBA DE DUNNETT que es un análisis de varianza de una vía y comparaciones pareadas con el control: Los tratamientos que dieron diferencia significativa con el control fueron el extracto etanólico a dosis de 50mg/kg y 125mg/kg y el Acetato de etilo a dosis de 300mg/kg. ($p < 0.00001$)



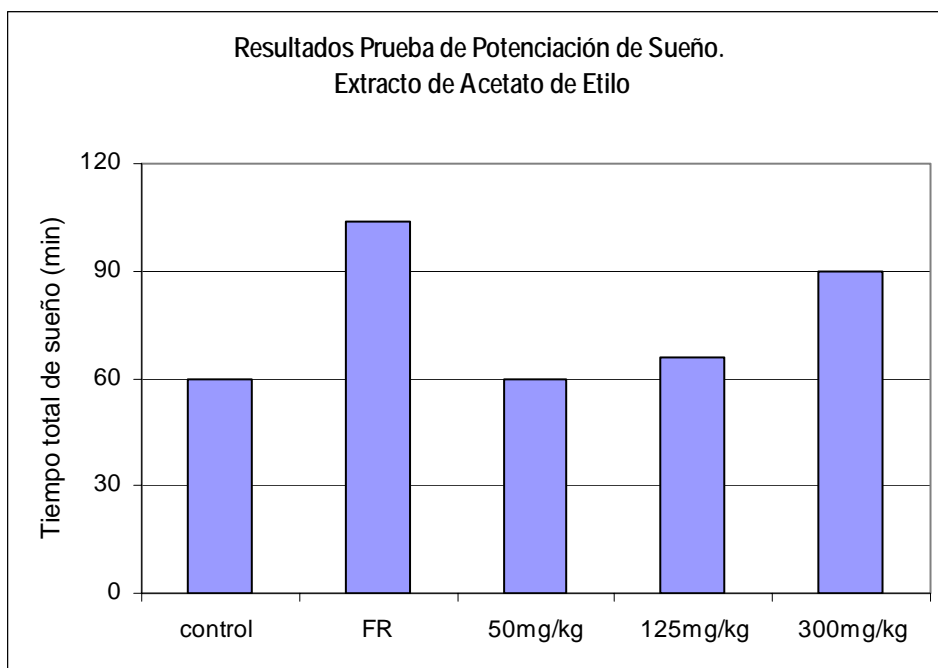
Gráfica No. 16: Se observa actividad similar al fármaco de referencia a dosis de 50 y 125 mg/kg de peso.



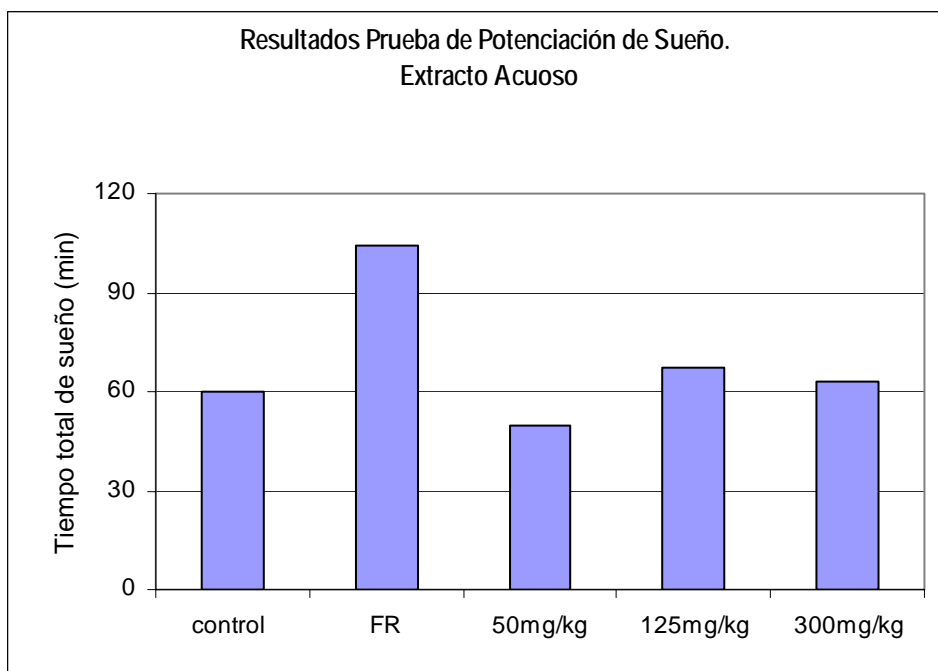
Gráfica No. 17: En el extracto hexánico no se observa diferencia significativa en el tiempo total de sueño al compararlo con el grupo control.



Gráfica No. 18: En el extracto clorofórmico no se observa diferencia significativa en el tiempo total de sueño al compararlo con el grupo control.



Gráfica No. 19: El extracto de acetato de etilo muestra actividad hipnótica al aumentar el tiempo total de sueño a dosis de 300mg/kg de peso.



Gráfica No. 20: El extracto acuoso no muestra una diferencia significativa en el tiempo total de sueño al compararlo con el control.

Los extractos que muestran una actividad constante al tener efectos tanto en la ansiedad, curiosidad, coordinación, equilibrio, tono muscular y tiempo total de sueño son el extracto etanólico y el extracto de acetato de etilo. Comprobando así la hipótesis de que al menos uno de los extractos (etanólico, hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y acuoso) de las hojas de *Daucus carota* (zanahoria) posee actividad sedante-hipnótica.

El extracto etanólico es un extracto madre, el cual posee la mayor parte de los constituyentes fitoquímicos de la planta en estudio. Por lo cual no es de extrañar que posea actividad. De los extractos obtenidos a partir del extracto etanólico, el que posee una actividad estadísticamente significativa es el de acetato de etilo, el cual a dosis baja (50mg/kg) e intermedia (125mg/kg) muestra una actividad sedante al disminuir la curiosidad, la actividad exploratoria, coordinación y equilibrio de los ratones en experimentación; y a dosis mayor (300mg/kg) mostró una actividad hipnótica al aumentar el tiempo total de sueño inducido por el Pentobarbital.

Se procedió a realizar el ensayo toxicológico y caracterización fitoquímica de dichos extractos.

8.6 Ensayo toxicológico:

Se le administró por vía oral a ratones machos albinos, los extractos etanólico y acetato de etilo en dosis de 250, 350 y 450 mg/kg de peso. No se reportó mortalidad de ningún ratón durante los 8 días de observación, con ello se demuestra que los extractos analizados carecen de efectos tóxicos a una dosis < 450mg/kg de peso de ratones albinos. (Tabla No.1)

EXTRACTO	DOSIS mg/kg	No. de muertes después de 8 días.
ACETATO DE ETILO	250	0
ACETATO DE ETILO	350	0
ACETATO DE ETILO	450	0
ETANÓLICO	250	0
ETANÓLICO	350	0
ETANÓLICO	450	0

Tabla No. 2 No se reporta ningún ratón muerto durante la observación, los extractos carecen de efectos tóxicos a dosis < 450mg/de peso del animal.

8.7 Caracterización fitoquímica:

Se realizó un tamizaje fitoquímico al extracto etanólico y al de extracto de acetato de etilo, que fueron los que presentaron mayor respuesta sedante -hipnótica, para ello se utilizaron ensayos macro y semimicro (tabla No. 2) y cromatografías en capa fina (tabla No.3)

Resultados para los ensayos macro y semimicro

Metabolito secundario	Detección	Resultado	
		Etanólico	Acetato de Etilo
Alcaloides	Formación de precipitados, turbidez o precipitación por complejo.	Negativo	Negativo
Flavonoides y Antocianinas	Coloración verde-azul o rojo-violeta	Negativo	Negativo
Cumarinas	Observar bajo luz UV a 365nm fluorescencia azul o verde: positivo.	Positivo	Positivo
Cardenólidos y Bufadienólidos	Observar cambio de color: mancha o anillo púrpura: positivo.	Negativo	Negativo
Saponinas	Capa de espuma mayor de 3 centímetros después de 30 minutos.	Negativo	Negativo
Taninos	Precipitados o flóculos evidentes. Para el cloruro férrico: coloración grisácea-negro tipo catecol.	Negativo	Negativo
Glicósidos Cianogénicos	Observar cualquier cambio de color en el papel. (de amarillo a rojo o rojo-café)	Negativo	Negativo

Tabla No. 3 Se evidencia la posible presencia de cumarinas.

Resultados para las cromatografías en capa fina.

Metabolito secundario	Identificación	Resultado	
		Etanólico	Acetato de Etilo
Alcaloides:	<p><i>Sin tratamiento</i> : UV-254nm: fluorescencia. UV-365nm: fluorescencia azul o amarilla.</p> <p><i>Con tratamiento</i>: Visible: manchas cafés o anaranjado, son inestables.</p> <p>Rf estándar: atropina 0.38, papaverina 0.68</p>	Negativo	Negativo
Flavonoides	<p><i>Sin tratamiento</i>: UV-254nm: fluorescen como zonas azules oscuras sobre amarillo. UV 365nm: fluorescen azul, amarillo o verde.</p> <p><i>Con tratamiento</i>: Intensa fluorescencia después de 15 minutos en UV-365nm</p> <p>Rf estándar: quercetina 0.88, rutina 0.45</p>	Negativo	Negativo
Antocianinas	<p><i>Sin tratamiento</i>: Rojo o azul violeta</p> <p><i>Con tratamiento</i>: Rojo-violeta en visible, azul violeta.</p> <p>Rf estándar: rojo sudán 0.94 (rojo), azul de metileno 0.47, 0.53 (azul)</p>	Negativo	Negativo
Antraquinonas	<p><i>Sin tratamiento</i>: UV-365nm color amarrillo, rojo o café fluorescente.</p> <p><i>Con tratamiento</i>: Antraquinonas: zonas rojas en visible y fluorescencia roja.</p> <p>Antronas y antranolas: zonas amarillas en visible y fluorescencia amarilla (UV-365nm)</p> <p>Rf del estándar: 0.86</p>	<p>Positivo: fluorescencia amarilla</p> <p>Rf: 0.85</p>	<p>Positivo: fluorescencia amarilla</p> <p>Rf: 0.85</p>
Cumarinas	<p>UV-254nm todas las cumarinas fluorescen, UV-365nm las cumarinas simples fluorescen azul o azul-verde. Las furanocumarinas fluorescen amarrillo, azul o café.</p>	<p>Positivo: fluorescencia azul-verde.</p>	<p>Positivo: fluorescencia azul-verde.</p>

	Rf del estándar: 0.38 (azul), 0.56 (café)	Rf: 0.55 (café)	Rf: 0.55 (café)
Cardenólidos y Bufadienólidos	<p><i>Sin tratamiento:</i> UV-254nm: los cardenólidos producen fluorescencia, muchas zonas fluorescentes son producidas por bufadienólidos UV-365nm: los glicósidos cardenólidos no fluorescen.</p> <p><i>Con tratamiento:</i> Visible: zonas violeta o café. UV-365nm: derivados de strophantidina de color anaranjado, café o azul. Glicósidos digitálicos de color café oscuro, azul oscuro o pálido. Glicósidos olander azul claro y los bufadienólidos de color amarillo-café o verde.</p> <p>Rf del estándar: 0.84</p>	Negativo	Negativo
Saponinas	<p><i>Sin tratamiento:</i> Con excepción del ácido glicirrético, las saponinas no son detectadas por la exposición UV-254 o UV-365nm</p> <p><i>Con tratamiento:</i> Zonas azules y verdes para saponinas esteroidales; rojas y violetas para saponinas triterpenoides (UV-365nm o visible)</p> <p>Rf del estándar: 0.67 (amarillo)</p>	<p>Se observan zonas marrón.</p> <p>Rf: 0.60</p>	<p>Se observan zonas marrón.</p> <p>Rf: 0.61</p>
Principios amargos	<p><i>Sin tratamiento:</i> UV-254nm: sustancias con doble conjugación muestran fluorescencia UV-365nm: algunos muestran fluorescencia inespecífica.</p> <p><i>Con tratamiento:</i> visible: rojo-violeta, rojo-café, azul</p>	<p>Positivo: fluorescencia azul y verde a 365nm.</p>	<p>Positivo: fluorescencia azul y verde a 365nm.</p>

	verde, azul.		
Aceites volátiles	<p><i>Sin tratamiento:</i> UV-254nm: los componentes con doble conjugación aparecen como zonas oscuras y luego fluorescen a verde claro. UV-365nm: algunos fluorescen azul</p> <p><i>Con tratamiento:</i> Visible: zonas azul, verde, rojo y café. Algunos componentes fluorescen en UV-365nm.</p> <p>Rf linalol: 0.46 Rf farnesol: 0.36</p>	<p>Positivo: zonas cafés oscuras que fluorescen a verde claro.</p> <p>Zonas rojo violeta.</p> <p>Rf: 0.41</p>	<p>Positivo: zonas cafés oscuras que fluorescen a verde claro.</p> <p>Zonas rojo violeta.</p> <p>Rf: 0.41</p>

Tabla No. 4 Se evidencia la presencia de cumarinas, antraquinonas, principios amargos y aceites volátiles.

Se realizó un tamizaje fitoquímico a los extractos etanólico y acetato de etilo, que fueron los que presentaron mayor actividad. En los ensayos macro y semimicro se evidencia la posible presencia de cumarinas (Tabla No.2). Aún cuando en los ensayos macro y semimicro el resultado haya sido negativo, es necesario realizar la cromatografía en capa fina, puesto que algunos ensayos pueden dar falsos negativos por la conjugación con otros componentes de los extractos.

La cromatografía en capa fina, al tener una mezcla de solventes específicos y reveladores específicos provee un dato más confiable de los metabolitos activos de un extracto; en este caso se evidencia la presencia de cumarinas, antraquinonas, principios amargos (terpenos) y aceites volátiles. (Tabla No.4) Para el ensayo de saponinas se observan manchas similares a las del estándar, pero con valores de Rf distintos; esto puede deberse a que la muestra pudo tener interferentes que ocasionaran un retraso en la elusión de las saponinas o bien pueden ser contaminantes que den un falso positivo al reaccionar con el revelador.

9. CONCLUSIONES:

- 9.1 Los extractos etanólico y de acetato de etilo de las hojas de *Daucus carota* (zanahoria) poseen actividad sedante-hipnótica a dosis de 50, 125 y 300mg/kg de peso.
- 9.2 Los extractos etanólico y de acetato de etilo de la hojas de *Daucus carota* (zanahoria) carecen de efectos tóxicos a una dosis < 450 mg/kg de peso.
- 9.3 El tamizaje fitoquímico de los extractos etanólico y de acetato de etilo de las hojas de *Daucus carota* evidenció la presencia de cumarinas, antraquinonas, principios amargos y aceites volátiles.

10. RECOMENDACIONES:

- 10.1 Continuar con los trabajos científicos de validación de plantas de la flora guatemalteca a las cuales se les atribuyen propiedades farmacológicas.

- 10.2 Realizar estudios de fase II de las plantas medicinales que han sido validadas en infusión (estudio fase I).
- 10.3 Continuar con el estudio de fase III de los extractos etanólico y acetato de etilo de las hojas de *Daucus carota* (zanahoria) para actividad sedante-hipnótica.
- 10.4 Realizar una extracción del aceite esencial de las hojas y hacer un ensayo farmacológico del mismo.
- 10.5 Publicar los trabajos realizados sobre la validación farmacológica de plantas de uso popular en Guatemala.

11. BIBLIOGRAFÍA:

- 11.1 BARRIOS, R. BERGER, I., CÁCERES, A. Fraccionamiento bioguiado y tamizaje fitoquímico del extracto etanólico con actividad antibacteriana de *Vaccinium poasanum* Donn. Sm. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 2001.
- 11.2 BHARGAVA K.P., Chandra O.M.: Brit. Pharmacol., 1964, 22, 154.

- 11.3 BOISSIER et Simon. "La reaction d'exploration chez la souris" *Thérapie*, 1962, XVII, 1225-1232.
- 11.4 BOISSIER et Simon. *Thérapie*. 1962 XVII 1240-1245.
- 11.5 BOISSIER et Simon. *Thérapie*. 1962 XVII 1246-1249.
- 11.6 CORTEZ, E. REYES, M. Estudio Farmacológico de los extractos hexánico, clorofórmicos, cloroformo-metanol (9:1), metanólico y acuoso de la especie *Lippia alba* (salvia sija) como antiinflamatorio. (Estudio farmacológico fase II) Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 1999.74pp
- 11.7 FION, M. SARAIVIA, A. Recopilación de Plantas Medicinales validadas farmacológicamente por estudiantes asesorados en el departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 2003
- 11.8 GOODMAN. GILMAN.1996 Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10ª. Ed. México. Editorial Panamericana.
- 11.9 <http://personal.redestb.es/martin/pfito.htm>
- 11.10 KATZUNG, B. 2001. Farmacología Básica y Clínica. 8ª. Ed. El Manual Moderno. México. 1346pp.
- 11.11 KINNARD W.J., Carr C.J.: *Pharmacol. Exp. Ther.*, 1957, 121, 354.
- 11.12 MARTINEZ, J. Enciclopedia de Ciencias Naturales. Editorial Bruguera, S.A. España. 1976. 1536pp.
- 11.13 MEDINILLA, B. Manual de laboratorio de fitoquímica. Guatemala USAC. Manual, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 1993. 29pp.
- 11.14 MONTÚFAR, M.; SARAIVIA, A. Determinación de la Actividad diurética de turiones de *Asparagus officinalis* (espárrago), fruto de *Pirus communis* (pera), raíz de *Daucus carota*

- (zanahoria) y bulbo de *Allium porrum* (puerro). Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 1994
- 11.15 PAHLOW, M. El Gran Libro de las Plantas Medicinales. Salud a través de las fuerzas curativas de la naturaleza. Editorial Everest, S. A. España. 1985. 465pp
- 11.16 REYES, M. SARAIVIA, A. Contribución al estudio farmacológico de hojas de *Daucus carota* (zanahoria), *Anethum graveolens* (eneldo) y *Achillea millefolium* (milenrama) de uso popular en Guatemala como sedantes e hipnóticos. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 1995. 75pp
- 11.17 SARAIVIA, A. Contribution a l'étude de dérivés Aroyl Piruvates et Aroyl buténolides. Tesis de Doctorado. Universidad de Clermont-Ferrand. Francia. 1978.
- 11.18 SANTA CRUZ, L. Manual de Laboratorio de fitoquímica. Guatemala. USAC. Manual, Facultades de Ciencias Químicas y Farmacia. 1986. 53pp
- 11.19 SHARAPIN, N. et. al. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Publicación del Convenio Andrés Bello, CAB, y el Programa Iberoamericano de Ciencia y tecnología para el Desarrollo, CYTED. Colombia. 2000. 247pp.
- 11.20 VOLAK, J. Plantas Medicinales. 2ª. Ed. Susaeta. España. 1989. 319pp.
- 11.21 www.botanical-online.com/cactusadaptacionesl.htm
- 11.22 www.botanical-onlin.com/spanishglossary.htm
- 11.23 www.fitoterapia.net/vademecum/index
- 11.24 www.iespana.es/natureduca/med_fitoterapia2_indiceespec3.htm
- 11.25 www.herfruit.es/nutricion.html
- 11.26 www.lafacu.com/apuntes/medicina/farma_ansio
- 11.27 www.n/m.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002376.htm

- 11.28 www.paginamedica.com/balcon/ver.asp?fitoterapia_7
- 11.29 www.podernatural.com/index.html
- 11.30 WAGNER, H. et. al. 1984. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- 11.31 CRUZ, S., BERGER, I., CÁCERES, A. Fraccionamiento bioguiado y tamizaje fitoquímico del extracto etanólico con actividad antiartemia de *Ocimum micranthum* Willd. (Albahaca de monte). Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 2001.
- 11.32 BALBACHAS, A., ROGRIGUEZ, H. Las Plantas Curan. 5ª. Ed. Reformation Heral Publishing Association. EUA. 523pp.
- 11.33 DOMINGUEZ, X. 1985. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México 281pp.
- 11.34 REMINGTON FARMACIA. 19ª. Ed. 1998. Tomo 2 Editorial Médica Panamericana. Argentina. 3020pp.
- 11.35 TREASE, G., EVANS, W. 1976. Farmacognosia. Editorial Continental, S.A. de C.V. México. 910pp.
- 11.36 Vademecum de Prescripción. 1998. FITOTERAPIA. Editorial Masson, S.A. España. 1148pp.
- 11.37 MUÑOZ, C. 1974. Métodos de separación. Parte II. Editorial Limusa. México. 91pp.
- 11.38 WILLARD, H. et. al. 1991. Métodos Instrumentales de Análisis. Grupo Editorial Iberoamérica. México. 879pp.
- 11.39 SKOGG, D. 1992. Principios de análisis instrumental. 5ª. Ed. McGraw-Hill. España. 1028pp.
- 11.40 EDWARDS, DI. 1975. Cromatografía. Principios y Técnicas. El Manual Moderno, S.A. México. 93pp.

11.41 www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/Thin.htm

ANEXOS

ANEXO 1

Daucus carota:



Identificación botánica:

Reino:	Vegetal
Subreino:	Embryobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Apiales
Familia:	Apiaceae
Género:	Daucus
Especie:	<i>Daucus carota</i>
Nombre común:	zanahoria

Descripción de la planta:

Zanahoria, nombre común de una planta originaria de Eurasia y el norte de África y ampliamente distribuida por todas las regiones templadas del hemisferio norte; el nombre se aplica también a la raíz de la planta. La variedad silvestre forma una raíz dura y leñosa no apta para el consumo. La cultivada es, por el contrario, una hortaliza muy apreciada. Es bianual; durante el primer año forma una roseta de hojas finamente divididas y almacena nutrientes en la raíz, que se vuelve grande y carnosa; estas zanahorias de primer año son las que se recolectan para comer.

Si se dejan las plantas un segundo año, se alarga la yema terminal a expensas de los nutrientes almacenados en la raíz y se forma un tallo ramificado cubierto de pelos espinosos de hasta 1,5 m. de altura. El tallo lleva una umbela de flores blancas o rosadas parecida a un nido; la flor central de cada una de las umbelas secundarias que forman la principal suele ser de color púrpura. Cada umbela está compuesta de dieciséis a cuarenta radios con involucro de seis a doce hojas profundamente divididas y ribeteadas en la cara inferior con un a membranita blanca. El fruto, de forma elipsoide, aparece comprimido por el dorso, con cinco costillas primarias, dos marginales y tres dorsales todas erizadas de cerditas divergentes, más cuatro secundarias, con sendas a las longitudinales que se resuelven en numerosos aguijoncitos. Las hileras de espinas radiales le sirven a la semilla madura para engancharse a la piel de los animales y asegurar así la propagación de la planta. Las hojas están divididas y subdivididas en segmentos, los de último orden de figura estrechamente laceolada o entrelaceolada y linear; las del talo, relativamente escasas, muestran en la base una vaina poco desarrollada.

Las cortas son apropiadas para cultivos precoces, pero tienen peor rendimiento. Las de raíz larga y gruesa, más bastas, son las de mayor rendimiento; algunas de ellas se usan como forrajeras. El color anaranjado de la raíz se debe al colorante llamado caroteno, que constituye la provitamina A.

(11.11; 11.15; 11.16; 11.12)

PRINCIPIOS ACTIVOS: la zanahoria posee una raíz carnosa, rica en multitud de nutrientes, entre los que cabría destacar las vitaminas B, C y en mayor cantidad, lo que se denomina pro-vitamina A, una sustancia que estimula la producción de vitamina A. Posee también carotina, un compuesto que le da su característico color anaranjado.

Análisis nutricional de 100 gramos de zanahoria cruda
(fuente USDA)

CALORÍAS	43
Grasa	0
Carbohidratos (g)	10
Fibra (g)	3
Proteína (g)	1
Sodio (mg)	35
Potasio (mg)	323
Calcio (mg)	27
Hierro (mg)	0.5
Zinc (mg)	0.2
Vitamina A (mcg)	2813
Vitamina C (mg)	9
Vitamina E (mg)	0.5

(11.11; 11.15; 11.16; 11.12; 11.21; 11.22; 11.25)

PROPIEDADES MEDICINALES: Es diurética, antidiarreico, repone la falta de vitaminas y estimula el apetito

RECOLECCIÓN: Hay que esperar hasta el segundo año, a finales del verano, cuando la raíz alcanza su máximo desarrollo. En climas templados se obtienen cosechas a lo largo de todo el año.

USOS Y APLICACIONES: El caldo resultante de hervir zanahorias y arroz es el remedio que utilizaban nuestras abuelas contra la diarrea, y sigue siendo un muy buen método para contenerlas. Las infusiones de raíz o de frutos (las umbelas maduras) son prácticas como diuréticas. Para aprovechar las vitaminas, y como estimulante del apetito debe comerse cruda, en ensalada, aderezadas con aceite y sal o limón en rebanaditas o ralladas.

(11.11; 11.15; 11.16; 11.12)

Formas Galénicas / Posología**Usos populares:**

- ◆ Infusión (semillas): Una cucharadita de café por taza. Infundir 10 minutos. Tres tazas al día.
- ◆ Jugo de zanahorias: 50 a 500 cc. al día. Para los niños se puede diluir en un poco de agua o leche.
- ◆ Decocción (gastroenteritis): 500 g de zanahorias en 1 litro de agua. Hervir 20 a 30 minutos, triturar y añadir agua hasta completar el litro y una cucharadita de las de café de sal. Tomar como único alimento durante dos o tres días, mientras dure la diarrea.

(11.9; 11.16; 11.22; 11.28; 11.36)

ANEXO 2

Toxicidades y precauciones a tomar con los reactivos utilizados

Reactivo	DL50 Oral en rata	Propiedades químicas	Precauciones
Etanol	7060mg/kg	PM = 46.07 g/mol; Soluble en agua pH neutro; P _{fus} -117°C; P _{eb} . 78°C Tem. de ignición 425°C; Pt. de inflamación 17°C..	Producto fácilmente inflamable, exento de clasificación de tóxicos. Debe mantenerse lejos de llamas abiertas, chispas y fuentes de calor. Guardar en recipiente bien cerrado
Hexano	28710mg/kg	PM = 86.18g/mol; casi insoluble en agua; Pt. de inflamación -22°C; P _{fus} . -114°C; p _{eb} . 68; Tem. de ignición 240°C.	Clasificado como producto no inocuo, fácilmente inflamable y nocivo para la salud. Riesgo de efectos graves en caso de exposición prolongada por inhalación. La ingestión o absorción cutánea pueden provocar daños para la salud agudos o crónicos. Se debe evitar el contacto con el cuerpo humano. Conservar en lugar bien ventilado y alejado de fuentes de ignición. Evitar el contacto con los ojos y la piel. No tirar los residuos por el desagüe y usar únicamente en lugares bien ventilados.

Cloroformo <i>Triclorometano</i>	1108mg/kg	PM = 111.38g/mol; sol. En agua 8g/L; Pt. Fus -63°C; Pt. Ebull.61°C	Nocivo e irritante. Tóxico muy fuerte, mutagénico, carcinógeno y teratógeno. La inhalación, ingestión o absorción por la piel pueden causar daños para la salud agudos o crónicos. Evitar el contacto con el cuerpo. Usar guantes e indumentaria de protección.
Acetato de etilo	5620mg/kg	PM = 88.10mg/mol; Solub en agua 711g/L; Pt. Fus -83°C; Pt. Ebull. 77°C; Pt infamación -4°C.	Sustancia con peligrosidad mínima. Fácilmente inflamable, mantener lejos de las llamas abiertas, chispas y fuentes de calor. No respirar los vapores. No fumar. NO tirar los residuos por el desagüe.

Fuente: Reactivos. Productos Merck. 1999-2000

ANEXO 3

EXTRACCIÓN DE MATERIAS PRIMAS VEGETALES: consideraciones generales

El primer paso para la extracción de materias primas vegetales es la selección del solvente dependiendo del propósito al que se destine. Se puede obtener un extracto que contenga la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta para lo cual se usa un solvente de naturaleza general, de alta polaridad como el etanol o el metanol. Por otra parte se pueden extraer los constituyentes químicos con determinadas características utilizando un solvente más selectivo, de menor polaridad como por ejemplo el hexano que extrae sólo compuestos apolares.

Los solventes más usados en las industrias de productos fitoterápicos son el agua, el etanol, la glicerina, propilenglicol y mezclas de estos líquidos. En la industria de aislamiento de productos naturales puros, se utilizan hidrocarburos clorados, alcoholes, ésteres, éteres, cetonas y aceites.

En el proceso de escogencia de un solvente determinado deben considerarse aspectos como la selectividad, facilidad de manipulación, precio, seguridad ambiental y sobre todo la toxicidad del solvente. En el caso del aislamiento de productos naturales puros, pueden usarse solventes orgánicos o mezclas azeotrópicas.

Las variables que interfieren en el proceso de extracción, independientemente de la escala de producción o del tipo de producto final son: estado de división de la droga, agitación, temperatura, pH, naturaleza del solvente y el tiempo de extracción.

- ❖ Estado de división de la droga: Cuanto menor sea el tamaño de partícula mayor será la eficiencia del proceso debido a que existe mayor área de contacto entre la planta y el solvente. Sin embargo, partículas muy finas dificultan el proceso de percolación, pues se presentan procesos de compactación y formación de falsas vías.
- ❖ Agitación: hace que nuevas cantidades de solvente, pobre en sustancias extraíbles, entren en contacto con el sólido y alcancen un nuevo punto de equilibrio de saturación.

- ❖ Temperatura: el aumento de la temperatura hace más fácil la disolución de sustancias extraíbles al contribuir al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación. El inconveniente está en que el aumento de la temperatura también causa la pérdida de sustancias volátiles, como los aceites esenciales.
- ❖ pH: este influye en la solubilidad de distintos compuestos debido a la posibilidad de formación de sales.
- ❖ Naturaleza del solvente: entre los solventes generales se utilizan alcoholes de hasta 3 carbonos o mezclas de éstos con agua. Estos solventes logran extraer la mayoría de sustancias naturales de interés como alcaloides, flavonoides, glicósidos cardiotónicos y terpenos. Debido a su poder extractivo, estos solventes son los indicados para los casos en que los constituyentes activos de la planta no son bien conocidos, siendo necesario agotar completamente la droga. Cuando no existen estudios específicos, se recomienda utilizar una mezcla de alcohol: agua 7:3 ó 8:2 para partes leñosas, raíces y semillas; y una proporción 1:1 para las partes verdes, ya que esto evita la extracción de clorofila, sustancias polimerizadas y resinoides, que generalmente, no presentan actividad terapéutica.
- ❖ Tiempo de extracción: este debe ser suficiente para que permita la extracción de los compuestos de interés; pero no excesivo para evitar gastos en consumo de energía y de mano de obra no necesaria.

(11.11; 11.13;11.19)

Extracción por percolación:

Este proceso consiste en hacer pasar el solvente a través de la droga, hasta su extracción exhaustiva completa. La percolación simple comprende una extracción exhaustiva con el solvente siempre renovado. En pequeña escala se utilizan aparatos

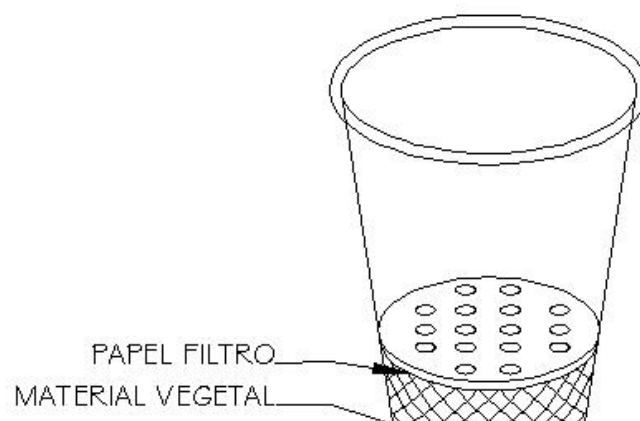
denominados percoladores, de cuerpo cilíndrico o cónico, provistos de un grifo en la parte inferior para regular el flujo de solvente. La percolación comprende una etapa inicial de humedecimiento de la droga, fuera del percolador, para facilitar el paso del solvente y evitar la formación de falsas vías.

La percolación simple presenta la desventaja del alto consumo de solvente. Por esto, en condiciones industriales, es preferible usar la técnica de repercolación. En ésta, se hace recircular el mismo solvente a través de la droga por intermedio de bombas. Este procedimiento aumenta el tiempo de contacto de la droga con el solvente y aumenta la eficiencia del proceso. El solvente se recupera en rotavapor a baja temperatura y presión reducida.

(11.19; 11.34)

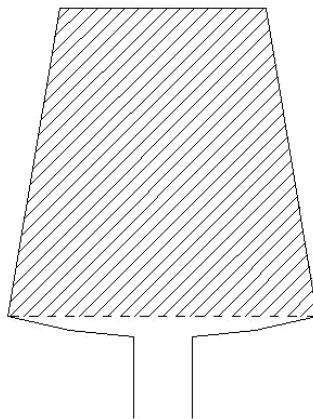
MODELO DE PERCOLADOR

(11.19)



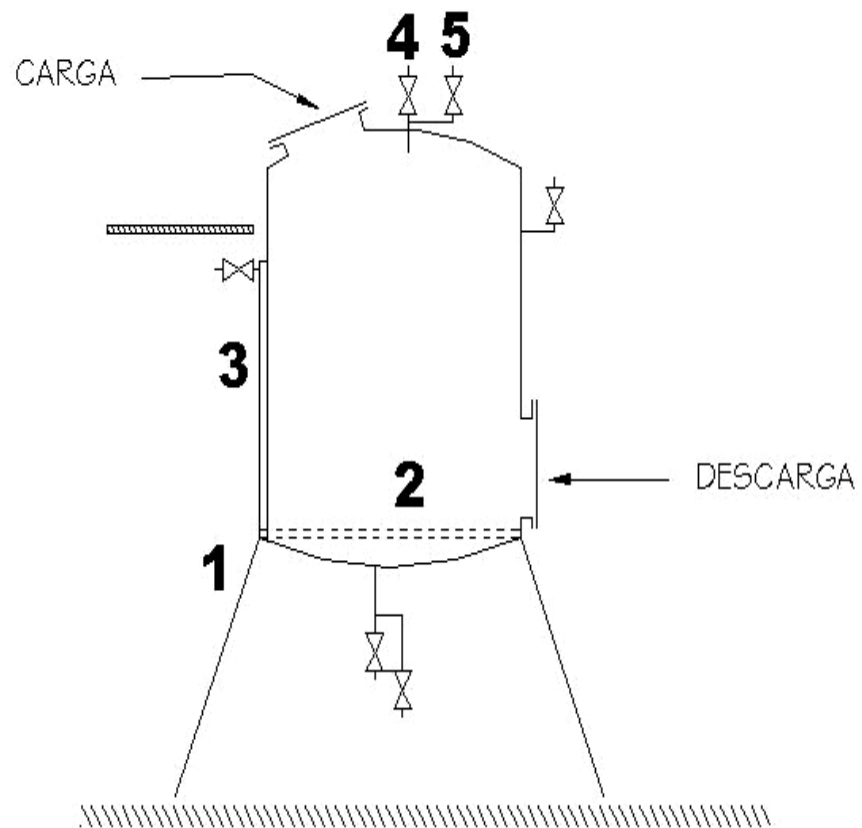
PERCOLADOR INDUSTRIAL CONICO

(11.19)



EQUIPO PARA PRECOLACIÓN INDUSTRIAL

(11.19)



ANEXO 4

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Historia

El botánico ruso Mikhail Tswett estableció las ventajas de la cromatografía y fue el primero en utilizar este término. Es recordado como el Padre de la Cromatografía.

Ismailov y Scraiber utilizaron láminas de vidrio para colocar capas muy delgadas de alúmina y luego aplicaron extractos vegetales, dando así la primera forma de Cromatografía de Capa Fina. Egon Stahl (1956) dio el nombre de Cromatografía de Capa Fina. Estandarizó los procedimientos, equipos y adsorbentes dando un auge a la técnica simple, a bajo costo y eficiente.

Proceso de Adsorción

La muestra aplicada en la capa es adsorbida en la superficie del material por la acción de fuerzas electrostáticas (fuerzas de Van der Waals, puentes de Hidrógeno, efectos inductivos, etc). Luego, cuando la capa es expuesta a un flujo por acción capilar, se inicia una competencia de enlaces entre los sitios activos del adsorbente y la sustancia con el solvente.

Adsorbentes

Los adsorbentes (sorbentes) más utilizados en la Cromatografía de Capa Fina son:

- Sílica gel (se utiliza en el 80% de las separaciones)
- Óxido de Aluminio ó Alúmina (ácida, neutra ó básica)
- Tierra Silíceo ó Kieselguhr
- Celulosa (Nativa o micro-cristalina)

Estos adsorbentes deber tener las siguientes características:

- Tamaño de Partícula
 - *Volumen de Poro*
 - *Diámetro de Poro*
 - *Área Superficial*
- Homogeneidad
- Pureza

Preparación de la Placa Cromatográfica

Se usan como soporte del adsorbente láminas de: Vidrio, Plástico ó Metálicos (ej: Aluminio).

Los tamaños de la placa para CCF convencional son : 20 cm x 20 cm; 10 cm x 20 cm y 5 cm x 2 cm.

Hay placas que contienen un indicador de Fluorescencia : F₂₅₄ ó F₃₆₆. El número que aparece como subíndice nos indica la longitud de onda de excitación del indicador utilizado.

Aplicación de la muestra

La muestra se aplica en la placa según el objetivo: Analítico ó Preparativa en:

- Banda
- Punto ó Mancha

Elección del Solvente

La fase móvil influye decisivamente en la separación, eluyente disuelve del sorbente las sustancias a separara, haciéndolas avanzar. Cuanto más eluyente se adsorbe sobre el sorbente, mayor es el poder de elusión de éste (mayor poder de desplazamiento). Es importante que la cámara esté saturada con la fase móvil antes de introducir la placa de capa fina. En una cubeta no está saturada, durante la separación se evapora eluyente de

la placa, principalmente de la zona del frente; se requiere más eluyente para un mismo recorrido de frente y el R_f aumenta. Las cubetas cargadas de eluyente no deben reutilizarse demasiadas veces.

Desarrollo de la Placa

Es un proceso mediante el cual la muestra es transportada a través de la fase estacionaria por la fase móvil.

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SEPARACIÓN:

- Fase estacionaria.
- Fase móvil
- Tipo de cubeta (cámara)
- Adsorción previa de una mezcla de disolventes
- Humedad relativa
- Actividad de la fase estacionaria
- Saturación de la cámara
- Tamaño de grano de las partículas de la fase estacionaria
- Tamaño de las manchas aplicadas
- Distancia entre la posición inicial de la sustancia y el nivel del eluyente en la cubeta de separación
- Gradiente de eluyente
- Alteraciones en la calidad de la fase estacionaria
- Velocidad de flujo de la fase móvil
- Magnitud del R_f
- Temperatura
- Volumen de muestra
- Aglomerante de la fase estacionaria
- Espesor irregular de capa en la fase estacionaria
- Fabricación de la fase estacionaria
- Espesor de capa de la fase estacionaria
- Convecciones en la fase gaseosa de la cubeta de separación
- Tipo de desarrollo
- Impurezas del eluyente
- Recorrido
- pH

Cámaras para Desarrollo

Existen varios tipos de cámaras:

- Normal
- Doble Compartimiento
- Sandwich
- Horizontal
- Vario KS
- U

Detección ó Visualización

Si la muestra (mancha) no es coloreada se requiere de métodos que nos permitan visualizar el(los) componente(s) presentes. También se conoce este procedimiento como Revelado.

Estos métodos son:

- Químicos (por inmersión o rociado). Se obtienen derivados coloreados o fluorescentes
- Físicos (ópticos). Generalmente se utiliza radiación UV

Evaluación de un Cromatograma de Capa Fina

ANÁLISIS CUALITATIVO

- Medida de Rf :

$$R_f = \frac{\text{Distancia entre el punto de partida y la mancha de la sustancia}}{\text{Distancia entre el punto de partida y el frente del eluyente}}$$

- Comparación Visual de Color/Intensidad
- Propiedades UV/IR/MS/NMR

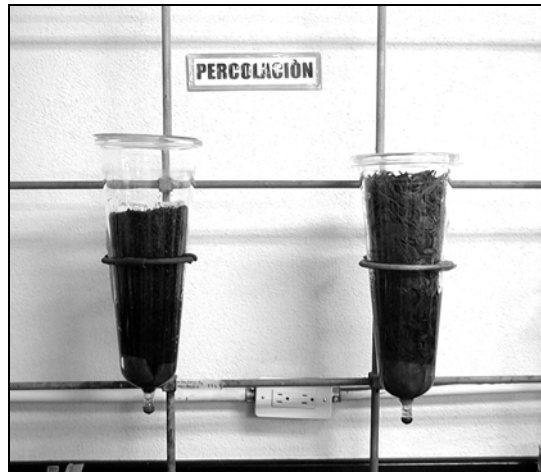
ANÁLISIS CUANTITATIVO

- Semi-cuantitativo
 - *Comparación visual del diámetro y la intensidad del color de la mancha contra una serie de manchas patrones de concentración conocida*
- Cuantitativo
 - *Indirecta*
 - *Directa*
 - Densitometría
 - *Medida de Transmisión. Medida de luz transmitida a través de la sustancia.*
 - *Medida de Emisión. Medida de luz reflejada desde la sustancia*
 - Espectrofotometría
 - *Fluorescencia*

(11.37; 11.38; 11.39; 11.40; 11.41)

ANEXO 5

Fotografía del percolador utilizado para la extracción.



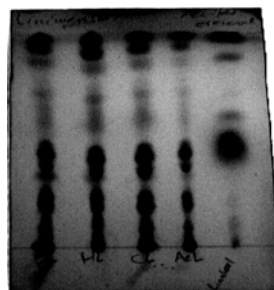
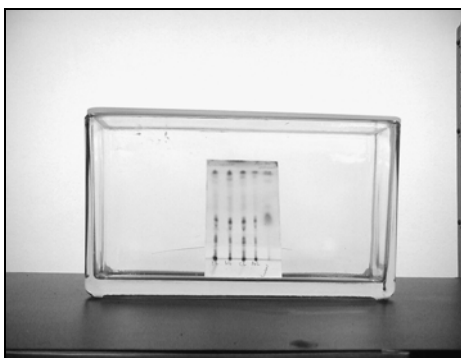
Fotografía de la partición líquido-líquido en ampolla de decantación



Fotografía del rotavapor utilizado para la recuperación del solvente.



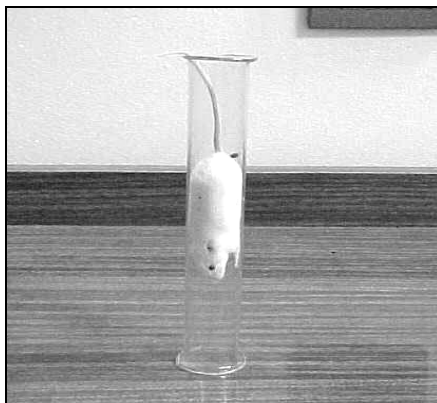
Fotografía de la cámara cromatográfica y placas cromatográficas.



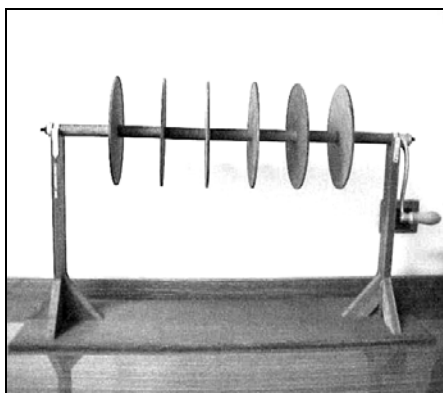
Fotografías de los instrumentos utilizados para los test de curiosidad, tono muscular, equilibrio y coordinación.



Placa agujereada



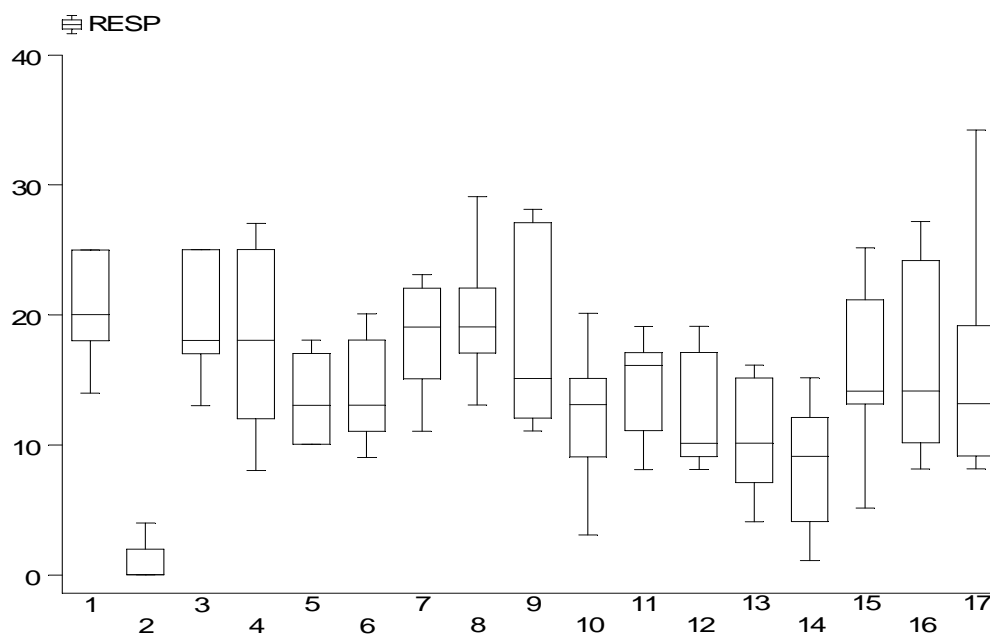
Chimenea



Rotarod

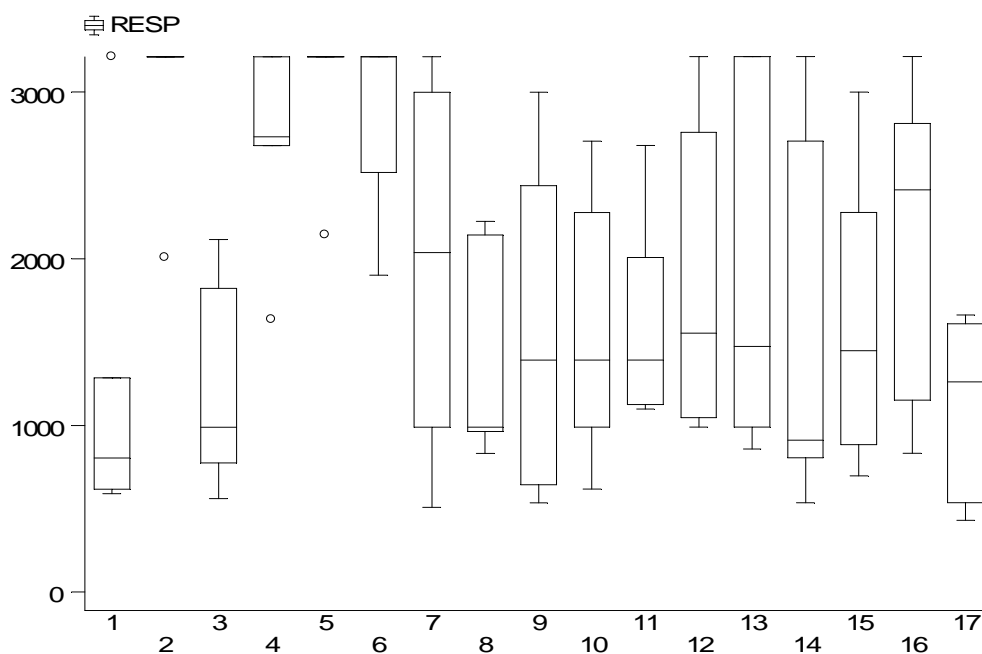
ANEXO 6

Gráfica de Cajas de Tuckey para la Prueba de la Tabla Agujereada



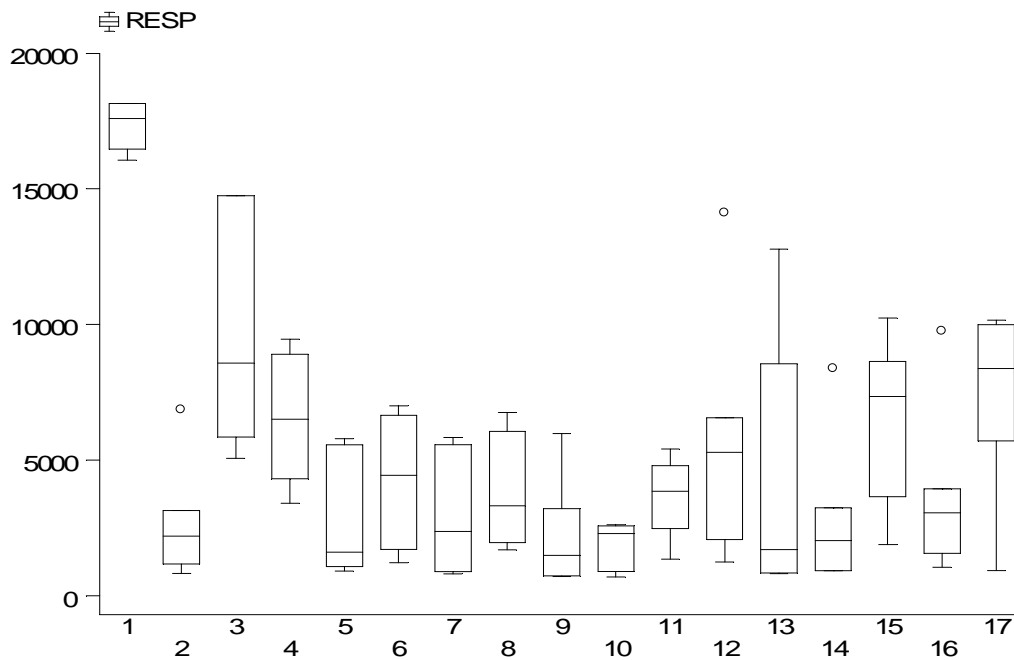
1	Grupo Control	10	Ext. Clorofórmico a 125mg/kg
2	Grupo con Fármaco de Referencia	11	Ext. Clorofórmico a 300 mg/ kg
3	Ext. Etanólico a 50 mg/kg	12	Ext. Acetato de etilo a 50 mg/kg
4	Ext. Etanólico a 125mg/kg	13	Ext. Acetato de etilo a 125mg/kg
5	Ext. Etanólico a 300mg/kg	14	Ext. Acetato de etilo a 300mg/kg
6	Ext. Hexánico a 50mg/kg	15	Ext. Acuoso a 50mg/kg
7	Ext. Hexánico a 125mg/kg	16	Ext. Acuoso a 125mg/kg
8	Ext. Hexánico a 300mg/kg	17	Ext. Acuoso a 300mg/kg
9	Ext. Clorofórmico a 50 mg/kg		

Gráfica de Cajas de Tuckey para la Prueba de la Chimenea



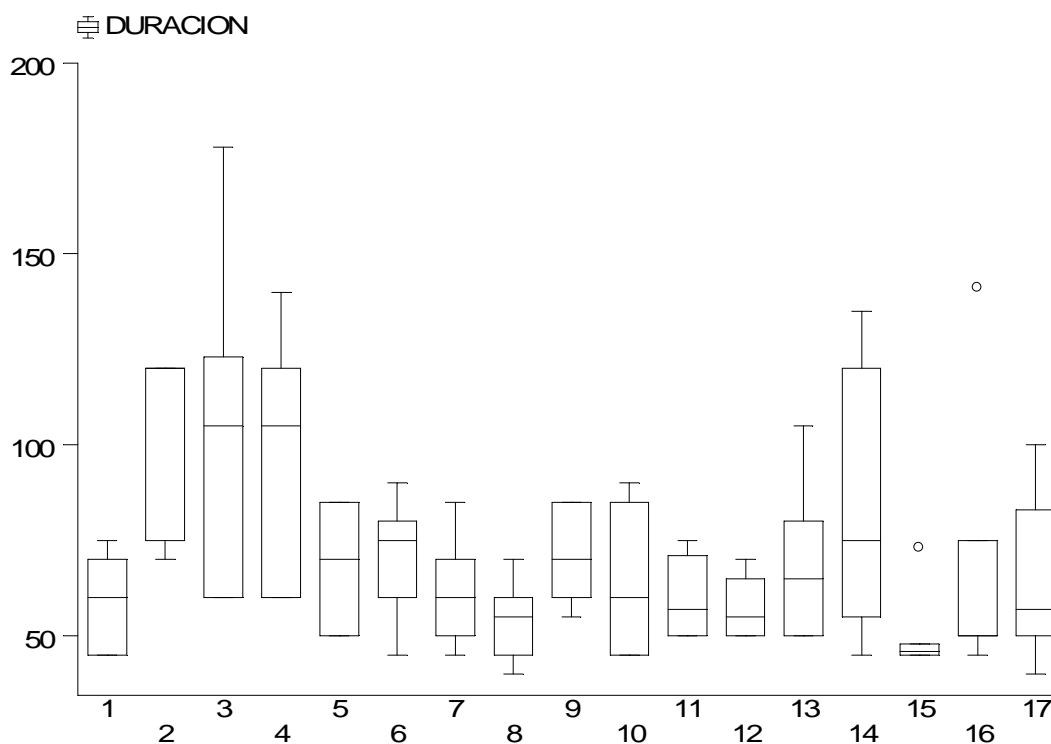
1	Grupo Control	10	Ext. Clorofórmico a 125mg/kg
2	Grupo con Fármaco de Referencia	11	Ext. Clorofórmico a 300 mg/ kg
3	Ext. Etanólico a 50 mg/kg	12	Ext. Acetato de etilo a 50 mg/kg
4	Ext. Etanólico a 125mg/kg	13	Ext. Acetato de etilo a 125mg/kg
5	Ext. Etanólico a 300mg/kg	14	Ext. Acetato de etilo a 300mg/kg
6	Ext. Hexánico a 50mg/kg	15	Ext. Acuoso a 50mg/kg
7	Ext. Hexánico a 125mg/kg	16	Ext. Acuoso a 125mg/kg
8	Ext. Hexánico a 300mg/kg	17	Ext. Acuoso a 300mg/kg
9	Ext. Clorofórmico a 50 mg/kg		

Gráfica de Cajas de Tuckey para la Prueba de Rotarod



1	Grupo Control	10	Ext. Clorofórmico a 125mg/kg
2	Grupo con Fármaco de Referencia	11	Ext. Clorofórmico a 300 mg/ kg
3	Ext. Etanólico a 50 mg/kg	12	Ext. Acetato de etilo a 50 mg/kg
4	Ext. Etanólico a 125mg/kg	13	Ext. Acetato de etilo a 125mg/kg
5	Ext. Etanólico a 300mg/kg	14	Ext. Acetato de etilo a 300mg/kg
6	Ext. Hexánico a 50mg/kg	15	Ext. Acuoso a 50mg/kg
7	Ext. Hexánico a 125mg/kg	16	Ext. Acuoso a 125mg/kg
8	Ext. Hexánico a 300mg/kg	17	Ext. Acuoso a 300mg/kg
9	Ext. Clorofórmico a 50 mg/kg		

Gráfica de Cajas de Tuckey para la Prueba de Potenciación del Sueño: duración total del sueño



1	Grupo Control	10	Ext. Clorofórmico a 125mg/kg
2	Grupo con Fármaco de Referencia	11	Ext. Clorofórmico a 300 mg/ kg
3	Ext. Etanólico a 50 mg/kg	12	Ext. Acetato de etilo a 50 mg/kg
4	Ext. Etanólico a 125mg/kg	13	Ext. Acetato de etilo a 125mg/kg
5	Ext. Etanólico a 300mg/kg	14	Ext. Acetato de etilo a 300mg/kg
6	Ext. Hexánico a 50mg/kg	15	Ext. Acuoso a 50mg/kg
7	Ext. Hexánico a 125mg/kg	16	Ext. Acuoso a 125mg/kg
8	Ext. Hexánico a 300mg/kg	17	Ext. Acuoso a 300mg/kg
9	Ext. Clorofórmico a 50 mg/kg		