

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



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA DE FARMACIA  
TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA Y  
FARMACIA**

**Tema: Valoración cuantitativa de hierro en tres especies vegetales  
*Moringa oleífera, Smilax domingensis y Smilax reguelli* durante el periodo  
enero -octubre 2011**

**INTEGRANTES:**

❖ **Br. Keiring Yessenia González González**

**TUTOR: K. Núñez**



### **Agradecimientos:**

Primero y antes que nada, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y poner en mi camino personas que me brindan su mano amiga.

Agradecer a mis padres por el esfuerzo realizado por ellos. El apoyo en mis estudios, por los sabios consejos que me dan, el amor y fortaleza necesaria que me regalan para seguir adelante.

Un agradecimiento especial a mí apreciado e inolvidable profesor Lic. Kelvin Núñez, por la colaboración, paciencia y apoyo que me brindo, para la realización de este trabajo.



### **Dedicatoria:**

Le dedico primeramente mi trabajo a Dios fue el creador de todas las cosas, el que me ha dado fortaleza y perseverancia para continuar cuando a punto de caer he estado; por ello, con toda la humildad que de mi corazón puede emanar.

De igual forma, a mis Padres, a quien le debo toda mi vida, les agradezco el cariño, amor y comprensión, quienes han sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante buscando siempre el mejor camino.

A mis maestros, gracias por su tiempo, y conocimientos que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional, en especial al Lic. Kelvin Núñez, por haber guiado el desarrollo de este trabajo y llegar a la culminación del mismo.



## Índice de contenido:

### PARTE I.

I.1 Introducción.....	4
1.2 Tema.....	5
1.3 Objetivos .....	6
1.2 Generales .....	6
1.3 Específicos .....	6

### PARTE II.

2.1 Marco Teórico.....	7
2.1.1 Información de Marango.....	7
2.1.2 Datos agrotecnológicos del marango.....	8
2.1.3 Propiedades vitamínicas del marango.....	9
2.1.4 Descripción macroscópica y microscópica moringa.....	9
2.2.1 Información botánica Smilax Domingesis .....	10
2.2.2 Datos agro tecnológicos smilax Domingesis.....	11
2.2.3. Propiedades medicinales.....	12
2.2.4. Descripción macroscópica y microscópica Smilax.....	13
2.2.5. Molienda.....	14
2.2.5. Especiación de metales.....	14
2.2.6. Determinación de Hierro.....	15
2.2.6 Funciones generales de los minerales.....	16
2.2.7. Provisiones dietéticas diarias.....	17
2.2.8. Determinación de cenizas.....	17
2.2.9. Espectrofotometría de Absorción atómica.....	18
2.2.9.1 Aplicaciones Espectrofotometría de A. A.....	19
2.2.9.2. Límites de detección.....	20



2.2.9.3. Curva de calibración.....	20
2.2.9.4. Desempeño del método .....	21
2.2.9.5 Interpretación del desempeño.....	22
<b>PARTE III</b>	
3.1 Hipótesis.....	23
<b>PARTE IV</b>	
4.1 Diseño metodológico.....	24
<b>PARTE V</b>	
5.1 Resultados y análisis de los resultados .....	27
<b>PARTE VI</b>	
6.1.1 Conclusiones.....	31
6.1.2 Recomendaciones.....	32
6.1.3 Referencias bibliográficas.....	33
6.1.4 Anexos.....	34



# INTRODUCCION



Las especies vegetales desde la década de los 80 han tenido relevancia como fuentes alternativas de origen natural por hacer referencia a todos aquellos alimentos que se proclaman como poseedores de un efecto beneficioso sobre la salud humana .(1)

Según cifras de la FAO, de 1990 a 2006 se consiguió reducir de 53 a 45 millones las personas que pasaban hambre, pero de 2006-2009 se desvanecieron los avances logrados durante más de un decenio. En América Latina y el Caribe se registraron 53 millones de personas con hambre, un aumento del 12.8 por ciento con respecto al año anterior.

En Nicaragua la mayoría de la población de escasos recursos muestran índices de deficiencia nutricional y según estadísticas que señalan que se han incrementado en los últimos años la ingesta de alimentos calóricos pero no de los alimentos ricos en minerales y vitaminas; por lo cual la verificación científica del uso de especies medicinales son un aporte al proponer de manera segura eficaz y confiable que dichas especies sean una alternativa alimenticia en contenido de minerales en nuestra dieta diaria. (2)

En un estudio realizado por la universidad Nacional agraria (UNA) determino que todas las partes de la planta de marango son comestibles, El sabor es agradable y las diversas partes se pueden consumir crudas (especialmente las hojas y flores) para el caso de las especies *Smilax dominguesis* que tradicionalmente ha sido utilizadas como depurativa de la sangre o en estados anémicos en pacientes que aquejan este tipo de enfermedad. (3)

Basado en lo anteriormente mencionado se procedió a la cuantificación de Fe, en hojas de *Moringa oleífera* y raíces de *Smilax domingesis* para lo cual los resultados obtenidos mostraron un valor significativo en la cantidad de Fe para el caso de *S.domingesis* y *S.reguelli*.



# TEMA

# TEMA



Valoración cuantitativa de hierro en tres especies vegetales *Moringa oleífera*, y *Smilax domingensis*, *Smilax reguelli* durante el periodo Enero -octubre 2011.



# OBJETIVOS



### **Generales:**

Valoración cuantitativa de hierro en tres especies vegetales *Moringa oleífera*, *Smilax reguelli* y *Smilax domingensis*.

### **Específicos:**

- ✓ Valorar el contenido de hierro por espectrofotometría de absorción atómica en tres especies vegetales *Moringa oleífera*, *Smilax domingensis*. *Smilax reguelli*.
- ✓ Evaluar las características de desempeño del método para la determinación de hierro en matrices vegetales



# MARCO TEORICO



## Información de las especies en estudio

### a) Marango:

**Nombre científico:** *Moringa oleífera*.

**Familia:** *Moringácea*

#### 1. Denominación:

*Marango*

#### 2. Sinónimos:

- ✓ *Guilandina moringa L.*
- ✓ *Moringa pterygosperma Gaertn.*
- ✓ *Moringa Millsp.*

#### 3. Nombres comunes:

- ✓ *Resedá, árbol de rábano picante.*
- ✓ *Árbol de bequeta.*
- ✓ *Árbol de los espárragos.*
- ✓ *Árbol de las perlas.*
- ✓ *Tamarindo cimarrón*
- ✓ *Árbol "ben"*
- ✓ *Marango y por varios otros nombres.*

El marango es un árbol originario del sur del Himalaya, noreste de la India, Bangladesh, Afganistán y Pakistán. Actualmente se encuentra diseminado en gran parte del planeta. Según estudios de la universidad nacional de ingeniería (UNI), el árbol fue introducido en 1920 a Centroamérica como planta ornamental y como cerca viva. *Moringa Oleífera*, conocido en Nicaragua como Marango, el árbol que cura, purifica el agua y nutre al hambriento, reconstruye huesos frágiles, enriquece la sangre anémica, y permite a la madre mal nutrida alimentar al lactante. *Moringa* contiene más nutrientes que cualquier fruta o vegetal. (4)



Figura N°1



Figura N°2



#### **4. Descripción botánica *Moringa oleifera lam.***

Un arbusto grande o árbol pequeño y frondoso, rara vez de 7 a 12 metros de altura, la corteza blanquecina, el tronco generalmente es espeso 20 a 40cm de de diámetro. Las hojas compuestas, alternas imparipinadas; son hojuelas delgadas, oblongas u ovaladas de 1 a 2 cm de largo y de color verde claro. Las flores de color crema son muy numerosas y fragantes, mide de 1 a 1.5 cm de largo y se encuentran agrupadas, las semillas son carnosas, cubiertas por una cáscara fina de color café, endospermo blanquecino y muy oleaginoso. La raíz principal mide varios metros y es carnosa en forma de rábano.

#### **5. Datos agrotecnológicos:**

##### **✓ Hábitat y Distribución geográfica:**

Es una planta de origen tropical, se desarrolla en climas semiáridos, semi húmedos y húmedos. Puede crecer en todo tipo de suelos, desde suelos ácidos hasta alcalinos (pH 4.5-8), aunque la mejor respuesta en desarrollo y productividad se obtiene en suelos neutros o ligeramente alcalinos, bien drenados o arenosos y donde el nivel freático permanece bastante alto por todo el año, tolera suelos arcillosos, pero no encharcamientos prolongados. Crece en la india y se distribuye en países como Afganistán, Pasquitán y Centroamérica.

##### **✓ Propiedades medicinales:**

En África, Asia y el Pacífico, las flores, hojas y raíces se usan en una gran variedad de medicinas tradicionales: curan diabetes, presión alta, tumores, usan las semillas para tumores abdominales. Las raíces son amargas y sirven como tónico para el cuerpo y los pulmones, también son expectorantes, diurético suave y estimulante para paralíticos, epilépticos e histéricos. Las raíces en Nicaragua son usadas cocidas en té para la gota. Las hojas frescas molidas se aplican sobre piel y se puede restregar sobre partes irritadas con comezón. (5)

#### **PROPIEDADES VITAMÍNICAS COMPARADAS DEL MORINGA:**

7 Veces más Vitamina C que en las Naranjas

4 Veces más Vitamina A que en las Zanahorias

4 Veces más Calcio que en la Leche

3 Veces más Potasio que en los Plátanos.



✓ **Definición:**

Hojas secas y molidas de color verde claro.

✓ **Obtención:**

Se obtiene por siembra directa, colocando directamente la semilla en el suelo preparado o por propagación vegetativa las estacas de marango se cortan a finales de la época seca las que se dejan enraizar con sus propias reservas y posteriormente se transplantan al terreno definitivo, el cual debe tener un buen régimen de humedad. Las hojas jóvenes se recolectan, lavan con agua clorada y se secan en horno artificial. Para su procesamiento industrial, las hojas son molidas obteniendo un polvo fino.

**6. Descripción macroscópicas:**

- ✓ **Tallo aéreo:** Tiene un diámetro de 20-40cm, es irregular en tamaño y forma, de color blanquecino y puede alcanzar una altura de 1.5-2m antes de que empiece a ramificarse.
- ✓ **Fruto:** El fruto es una cápsula colgante color castaño, triangular, con 30 cm de largo y 1.cm de diámetro.
- ✓ **Semilla:** Las semillas son de color castaño oscuro con tres alas blancas delgadas.
- ✓ **Raíz:** gruesa con engrosamiento tuberoso y muy larga lo que hace que este árbol soporte largos periodos de sequia.

**7. Descripción microscópicas**

El fruto en corte transversal presenta una sección triangular con varias semillas dispuestas a lo largo, las semillas presentan en la zona del parénquima paredes celulares y numerosos huecos, con una apariencia reticulada, luego aparece una región de fibras que contienen cristales. El endospermo es una capa simple con gotas de aceite y asociado a este hay dos 2 o 3 capas de células aplanadas, en el tallo se observan fibras de paredes espesas (2,63 $\mu$ m) que reducen el colapso (aplastamiento de las fibras) además, son fibras anchas (76,03 $\mu$ m) y cortas (0,78 $\mu$ m) de longitud, así mismo la raíz en corte transversal produce una goma de color rojizo parduzco.



## 8. Composición química:

Estudios toxicológicos y fitoquímicos demuestran que la planta de moringa contiene como principios tóxicos benzil, ácido moringico y ácido cianhídrico, así como pequeñas trazas de alcaloides, presenta glucósido cianogénico, las hojas principalmente contienen cantidades poco significantes de taninos(1.4%),no se observan taninos condensados ,presentan un contenido de fenol total de 2.7% . A esta concentración, estos fenoles sencillos no producen efectos adversos. (6)

b) **Nombre científico:** *Smilax domingensis Willd*

**Familia:** *Smilacaceae*

1. **Denominación:** Zarzaparrilla.

2. **Sinónimos:**

- ✓ *Smilax caudata* Lundell
- ✓ *Smilax lanceolata* L.
- ✓ *Smilax microscola* ( Robinson ) Killip y Morton.

3. **Nombres comunes:**

- ✓ *Bejuco de canasta*
- ✓ *Raíz de china*
- ✓ *bejuco chino,*
- ✓ *zarzaparrilla ( Cuba, Gua.)*
- ✓ *Corona de cristo*
- ✓ *Chiquihuite, zarzaparrilla (Mex.)*
- ✓ *bejuco de membrillo.*



Figura N°3



#### 4. Descripción botánica

Tallos teretes, escasamente armados en la parte inferior con aguijones robustos recurvados, hojas de 10 cm de longitud, 1.4-6 veces más largas que anchas, avadas lanceolado-ovadas, o lanceolada, umbrelas pistiladas solitarias, pedúnculo 1-5 cm, más corto que el peciolo subyacente, subterete. Tépalos de las flores estaminadas 4-6 mm, filamentos 2- 4 mm. anteras 1-2 mm. Bayas 7-10 mm, rojas purpúreas o negras.



Figura N°4

#### 5. Datos agrotecnológicos

✓ **Hábitat y Distribución geográfica:**

Es una planta común en los terrenos pedregosos de las montañas y colinas calcáreas, bosques húmedos. Crece en el Caribe, México, Honduras, El Salvador, Costa Rica, Panamá, y en Guatemala.

✓ **Propiedades medicinales:**

Tiene propiedades antiblenorrágica, sudorífica, antiasmática, y antihipertensiva. El cocimiento del rizoma se usa como depurativo y sudorífico. Se usa contra la sífilis, afecciones de origen reumático y enfermedades crónicas de la piel. Se le considera un eficiente depurativo, por lo que se utiliza para tratar enfermedades de la sangre y los riñones, así como tónico para fortalecer diversas funciones del organismo, tópicamente se utiliza cuando hay picazón en inflamación de la piel. Se emplea en afecciones gastrointestinales y nerviosas.

✓ **Definición:**

Rizoma seco y molido de color marrón claro

✓ **Obtención:**

La planta se obtiene por cultivo de repoblación natural o semilla, las plántulas de 2-3 años se trasplantan al pie de un tutor arbóreo. El rizoma de 6-8 años se colecta después de las últimas lluvias, se lava profusamente y aun fresco se corta en finas rodajas que se secan al sol y se guardan en recipientes herméticos. Para su procesamiento industrial, las rodajas son molidas como un polvo grueso.



## 6. Descripción macroscópica:

- ✓ **Tallo aéreo:** terete con entrenudos de 4-6 cm de longitud y 0.5 cm de diámetro con aguijones triangulares, robustos, punzantes, recurvados. Se observan ramas vigorosas y un profuso sistema de ramas más débiles con hojas, a veces de menor tamaño, la mayoría son floríferas, de color castaño oscuro.
- ✓ **Rizoma:** algo lignificado, voluminoso con engrosamientos tuberosos, de color castaño-rojizo.
- ✓ **Raíces:** adventicias naciendo de los rizomas, rectas muy lignificadas, largas de un diámetro de 0.3-0.4 cm de color pardo grisáceo.



Figura N°5

## 7. Descripción microscópica:

- ✓ **Tallo aéreo:** en corte transversal es de contorno circular. La cutícula es gruesa, la epidermis uniestrada con estomas a la misma altura de las células epidérmicas. El parénquima con células de paredes muy gruesas y esclerosadas. Parénquima central con taninos, granos de almidón de hilio céntrico, simples o reunidos en 3 unidades. En el material disociado se observan: fibras de paredes engrosadas de aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  de largo, vasos de 10  $\mu\text{m}$  de ancho, con apéndice, placas de perforación simple más bien oblicua, células parenquimáticas de paredes muy engrosadas, células del parénquima axial del xilema no engrosadas y células del parénquima xilemático o floemático no engrosadas.
- ✓ **Rizomas:** en sección transversal es circular, la corteza está constituida por una epidermis de paredes sinuosas, engrosadas. Las células del parénquima cortical son alargadas y se disponen tangencialmente en ellas se observan idioblastos con rafidios de oxalato de calcio y mucilagos, mientras que en la zona más interna las células del parénquima, se disponen radialmente. Estas células poseen paredes no muy engrosadas y una gran vacuola repleta de almidón que está compuesto por 2,3 hasta 6 o más componentes, los granos individuales son poliédricos, con hilo céntrico. Dispersos en el parénquima se encuentran los haces colaterales cerrados cuya vaina de fibras es poco desarrollada.



## 8. Composición química:

Los trabajos de tamizaje fitoquímico mediante ensayos macro y semicro y por CCF, han evidenciado la presencia de esteroides mediante las pruebas de Salkowsky Burchard y la prueba de espuma, lo cual es indicativo de posibles saponinas esteroidales, así presencia de flavonoides, antocianos y taninos. El rango de RF de las muestras se encuentra entre 0.24-0.89. No se evidencia alcaloides. El estudio de la composición química del rizoma demostró el siguiente contenido mineral: potasio (3,375-3.751ppm), calcio ( 7.343-8.075 ppm ), manganeso ( 1.4 ppm ), hierro ( 1.6-1.8 ppm ), níquel ( 2.8-7.6 ppm ), cobre ( 28-34 ppm ), zinc ( 48-51 ppm ). (7)

### MOLIENDA:

La molienda tiene como objetivo la disminución del tamaño de las partículas de la droga vegetal para adecuarla a la etapa siguiente del proceso de extracción. La extracción de una droga entera o dividida en fragmentos gruesos sería incompleta, debido a la pobre penetración del solvente en el tejido vegetal, y sería igualmente muy lenta, una vez que las membranas celulares actúan como verdaderas barreras que dificultan el proceso de extracción. En el caso específico de la droga previamente dividida, tales membranas se encuentran particularmente destruidas, lo que facilita la disolución de los constituyentes celulares en el líquido externo.

El proceso de molienda es precedido de la selección para aislar las impurezas. En esta operación se separan manualmente los materiales extraños como pedazos de madera, de metal o materiales de otra naturaleza. La tierra, la arena y el polvo muy fino son separados por medio de tamices.

La molienda del material vegetal, independientemente de su naturaleza y del tipo de molino usado, da como resultado la producción de una cierta cantidad de partículas muy finas, deben ser separadas, por lo cual la operación de molienda debe ser seguida por el tamizaje del material obtenido. Las partículas que exceden el tamaño adecuado deben retornar al molino para ser reducidas aun más, descartándose también el polvo muy fino o cuando las condiciones lo permiten, este polvo debe ser almacenado y extraído aparte, y reunirse el material proveniente de varios lotes, en condiciones diferentes de procesamiento. (8)



## **Especiación de metales en plantas con espectrometría de masas**

Las moléculas complejantes de metales juegan un papel fundamental en la adquisición, transporte y homeostasis de metales tanto en plantas hiper acumuladoras como en plantas normales.

La espectrometría de masas es una técnica que ofrece grandes posibilidades para la especiación de metales en plantas. La combinación de técnicas de análisis atómico y molecular parece ser la mejor estrategia para abordar el tema. Primero se hace una separación cromatográfica y con técnicas de determinación atómica se localiza la fracción donde fluye el metal de interés. Posteriormente se concentra la fracción que contiene el metal y después se analiza con técnicas de determinación molecular para determinar la estructura. Normalmente los metales aparecen en la naturaleza con distintos isótopos con distintas abundancias. Por ejemplo en el caso del hierro: 54 Fe: 5.8%; 56 Fe: 91.7%; 57 Fe: 2.2; 58 Fe: 0.3%. Cuando un metal forma un complejo con pequeñas moléculas la huella isotópica del metal se ve reflejada en la del complejo.

La utilización de la espectrometría de masas para la determinación de metales permite la observación directa de los metales en solución y permite probar hipótesis que se planteaban a partir de simulaciones con programas informáticos acerca de las distintas especies metálicas que pueden aparecer en unas determinadas condiciones. (9)

## **Determinación de hierro en matrices vegetales**

### **Fe:**

El hierro es el metal más abundante en el universo, y el cuarto elemento en frecuencia en la corteza terrestre. Se lo encuentra naturalmente en el suelo, formando parte de diversos minerales, en el agua y en muchos alimentos.

En 1713, Lemery y Geoffry demostraron por primera vez que el hierro se encontraba presente en las cenizas de la sangre, relacionando directamente a este tejido con dicho metal, estableciendo de esta manera las bases científicas en la terapéutica de su deficiencia. En 1832 el médico francés Pierre Blaud inició el tratamiento de la clorosis mediante la administración de hierro por vía oral, utilizando una píldora compuesta por sulfato ferroso y carbonato de potasio, la cual fue denominada "píldora de Blaud". (10)



### **Usos importancia en la terapéutica**

- ✓ El hierro forma parte de la hemoglobina, proteína esencial que transporta oxígeno y se encuentra en los glóbulos rojos.
- ✓ También funciona como parte de la mioglobina, que ayuda a las células de los músculos a almacenar oxígeno.
- ✓ Ayuda a elaborar ATP (trifosfato de adenosina, la principal fuente de energía del cuerpo), producir ADN o llevar a cabo muchos otros procesos vitales.

### **La deficiencia de hierro provoca:**

- ✓ Anemia
- ✓ incapacidad de aprendizaje
- ✓ función inmunológica dañada
- ✓ fatiga y depresión. (11)

### **Funciones generales de los minerales:**

- Constituyentes esenciales de huesos y dientes, así como de tejidos blandos.
- Transmisión de impulsos nerviosos y contracción muscular.
- Mantenimiento de la actividad osmótica.
- Equilibrio ácido-base corporal.
- Constituyentes de enzimas, vitaminas, hormonas y pigmentos.
- Cofactores y activadores enzimáticos.

#### **Clasificación:**

##### **1. Esenciales y No Esenciales**

- ✓ La esencialidad se basa en los siguientes requisitos:
- ✓ Debe estar en los tejidos vivos
- ✓ La concentración corporal debe ser similar y constante de individuo a individuo
- ✓ Deben tener un papel bioquímico
- ✓ Su ausencia debe conllevar a anormalidad fisiológica
- ✓ Luego de una carencia la administración aliviará la anormalidad.

##### **2. No esenciales**

#### **Según su función biológica:**

##### **- Estructurales:**

- ✓ Ca, P, Mg, Mn, Cu, Si, Na



- **Electrolitos:**
    - ✓ Componentes de fluidos y tejidos corporales que intervienen en el mantenimiento de la presión osmótica (K– Na), equilibrio ácido-básico (Cl, K, Na).
  - **Catalíticos :**
    - ✓ Catalizadores enzimáticos: Citocromo (Fe)
    - ✓ También como componentes de sistemas hormonales: Tiroides (I), Vitaminas (C o B12).
    - ✓ Componentes de RNA (P, Fe, Mn, Ni, Zn, Cr, )
    - ✓ Transporte de Oxígeno: (Fe)
    - ✓ Permeabilidad de la membrana: (Ca, P, Mg, Na, K, Cl)
    - ✓ Función neuromuscular: (Ca, Mg)
- 3. De acuerdo a la concentración requerida en el alimento.**
- **Macro minerales:** Requerimiento y concentración tisular > 100 ppm
  - **Micro minerales:** Requerimiento y concentración tisular < 100 ppm (12)

**Tabla N°1 provisiones dietéticas diarias recomendadas de hierro.**

	Edad (años)	Peso (Kg)	Minerales
			Fe (mg)
Lactantes	0-0,5	6	10
	0,5-1	9	15
Niños	1-3	13	15
	4-6	20	10
	7-10	28	10
Varones	11-14	45	18
	15-18	66	18
	19-22	70	10
	23-50	70	10
	51+	70	10
Mujeres	11-14	46	18
	15-18	55	18
	19-22	55	18
	23-50	55	18
	51+	55	18
Embarazadas			+10

### Determinación de cenizas

Cenizas totales. Son las cenizas de los productos alimentarios que están constituidas por el residuo inorgánico que queda después de que la materia orgánica se ha quemado. Las cenizas obtenidas no tienen necesariamente la misma composición que la materia mineral



presente en el alimento original, ya que puede haber habido pérdidas por volatilización o alguna interacción entre los constituyentes químicos.

El valor de las cenizas puede considerarse como una medida general de la calidad, y a menudo es un criterio útil para determinar la identidad de un alimento. (13)

### ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

La espectrofotometría de absorción atómica es una técnica capaz de detectar y determinar la mayoría de los elementos de la tabla periódica, metales que están presentes en una gran variedad de muestras, este método consiste en la medición de las especies atómicas por su absorción a una longitud de onda particular, las especies atómicas se logran por la atomización de la muestra ya sea por llama que se encarga de nebulizar la muestra y diseminarla en forma de aerosol a través de una llama de aire acetileno o bien por horno de grafito que se encarga de calentar, solvatar y atomizar la muestra aumentando su sensibilidad .

La concentración del analito se determina por la cantidad de absorción. Aplicando la ley de Lambert–Beer directamente en la espectroscopía.

### Ley de Lambert- Beer

$$A = a(\epsilon \cdot b \cdot c)$$

A, es la absorbancia medida.

a ( $\epsilon$ ), es la longitud de onda que depende del coeficiente de absorción

b, es la longitud de la muestra

c, es la concentración del analito

### Instrumentación absorción atómica:

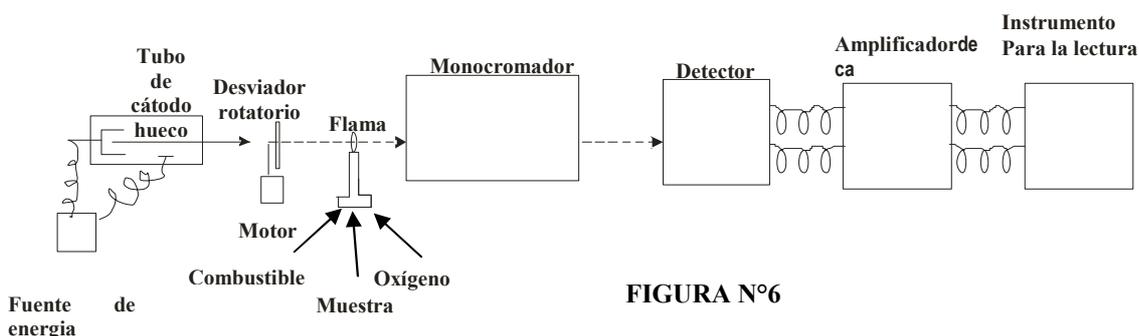


FIGURA N°6

**Fuente de Luz:** La fuente de luz utilizada es una lámpara de cátodo hueco que está limitada a detectar solo un metal, es decir de aquel que está en la superficie del cátodo o por aquel con el que está fabricado.

✓ **Flama:** Los iones ó átomos de la muestra deben de estar disueltos y vaporizados en una fuente de alta temperatura como una llama u horno de grafito.



✓ **Ventajas de llama:**

- La llama puede analizar solamente disoluciones.
- Utiliza un quemador tipo slot para incrementar la longitud de paso y por lo tanto para incrementar la absorbancia total.
- Con la atomización de flama es posible la operación manual del espectrofotómetro.

✓ **Ventajas de horno de grafito:**

- El horno de grafito puede analizar disoluciones, muestras sólidas y semisólidas.
- Utiliza un atomizador el que es más eficiente que una llama y puede aceptar cantidades muy pequeñas de muestra.
- Suministra un ambiente reductor para elementos fácilmente oxidables.

Se han desarrollado hornos especiales para reemplazar la llama en la espectro fotometría de absorción atómica debido a los serios problemas cinéticos que se presentan con la atomización en la llama y porque su sensibilidad disminuye en forma considerable por la dilución de la población de átomos de analito que ocurre con los gases en la llama.

**Monocromador:** El propósito más importante del monocromador es aislar la línea de absorción de la luz de fondo debida a las interferencias.

**Detector:** Se encarga de captar la señal óptica proveniente del monocromador y la transforma en señal electrónica capaz de convertirse en un valor legible.

**Amplificador sintonizado:** Se combina con la modulación del haz, liberando las mediciones de absorción atómica de la interferencia de la luz que proviene de fuentes indeseables, como la de la llama o el quemador o incluso un poco de luz que se puede filtrar desde el laboratorio.

**Instrumento para la lectura:** puede ser un galvanómetro sencillo, un voltímetro ó un potenciómetro registrador con pluma y tinta

**Aplicaciones de la absorción atómica**

Esta técnica se ha aplicado a cerca de 60 elementos y es una herramienta primordial para los estudios en donde se determinan vestigios de metales en muestras biológicas o del medio ambiente. Con frecuencia, también es útil en los casos en donde la muestra contiene un nivel elevado del metal pero solo se cuenta con una muestra pequeña para el análisis, como es el caso algunas veces con las metaloproteínas.



**Tabla N°2 Algunos límites de detección aproximados en absorción atómica**

Elemento	Flama acetileno-aire	Horno de grafito
Ca	0.002 <sup>†</sup>	0.0003 <sup>†</sup>
Cd	0.005	0.0001
Cr	0.005	0.0005
Cu	0.004	0.0001
Fe	0.004	0.003
K	0.004	0.001
Mg	0.003	0.00005
Ni	0.005	0.001

Existen algunas interferencias en la absorción atómica como son: los efectos de matriz que tienen influencia sobre el proceso de atomización. El grado en el que se disocian los átomos a cierta temperatura, también es común la formación de aniones que producen compuestos de baja volatilidad con el analito, disminuyendo la velocidad de atomización lo que origina resultados menores a los esperados. (14)

#### **Curva de calibrado:**

La curva de calibrado es un método de química analítica empleado para medir la concentración de una sustancia en una muestra por comparación con una serie de elementos de concentración conocida. Se basa en la existencia de una relación en principio lineal entre un carácter medible (por ejemplo la absorbancia en los enfoques de espectrofotometría) y la variable a determinar (la concentración).

Para ello, se efectúan diluciones de unas muestras de contenido conocido y se produce su lectura y el consiguiente establecimiento de una función matemática que relacione ambas; después, se lee el mismo carácter en la muestra problema y, mediante la sustitución de la variable independiente de esa función, se obtiene la concentración de esta. Se dice pues que la respuesta de la muestra puede cuantificarse y, empleando la curva de calibración, se puede interpolar el dato de la muestra problema hasta encontrar la concentración del analito. (15)



## Desempeño de Métodos Analíticos

El desempeño de un método es considerado aceptable cuando la magnitud de los errores obtenidos en el estudio de validación es menor a los errores máximos tolerables según los requerimientos de calidad establecidos.

Error (TE) < TE<sub>a</sub>            Aceptable

Error (TE) > TE<sub>a</sub>            Rechazado

**TE: Error total**

**TE<sub>a</sub>: Requerimiento de calidad**

**Los errores calculados son:**

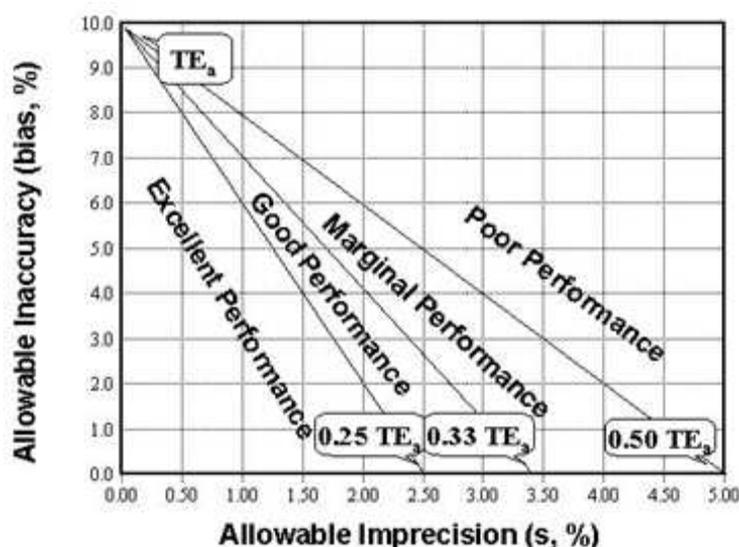
- Error Aleatorio: A partir de los protocolos de Precisión *SD* y *CV*
- Error Sistemático: A partir del protocolo de Comparación de Métodos.

$$Y = \text{Pendiente} \cdot X + \text{Intersección}$$

- ✓ De la combinación de conceptos y errores surge la decisión acerca de la aceptabilidad del método en estudio.
- ✓ Existen varios modelos para esta combinación. Los más apropiados son:

-*Method Decisión Chart*

-*Six Sigma*



El gráfico supone un TE<sub>a</sub> de 10%.

**Desempeño de Métodos Analíticos:** Está dirigida al mejoramiento de procesos. El nombre de Six Sigma deriva de un “gold standard” de calidad que apunta a lograr que entre los límites de tolerancia de un proceso dado se puedan alojar seis unidades de desvío estándar



### **Six Sigma**

- Si reemplazamos en la definición anterior el término “*tolerancia del proceso*” por el de “*requerimientos de calidad*” hemos logrado trasladar el concepto Six Sigma a la evaluación de desempeño de los métodos analíticos.

$$\text{Six Sigma} = (\text{TEa-Bias})/\text{CV}$$

$$\text{Six Sigma} = (\text{TEa-Bias})/\text{SD}$$

### **Interpretación (del desempeño):**

Por debajo de  $2\sigma$ : Inaceptable

Entre  $2\sigma$  y  $3\sigma$ : Marginal no válido para procesos de rutina

Entre  $3\sigma$  y  $4\sigma$ : Pobre

Entre  $4\sigma$  y  $5\sigma$ : Bueno

Entre  $5\sigma$  y  $6\sigma$ : Muy Bueno

Por encima de  $6\sigma$ : Gold Estándar. (16)



# HIPOTESIS



Las concentraciones de hierro en las especies *Moringa oleífera* (Marango) , *Smilax Domingesis*(Zarzaparilla) y *Smilax reguelli* (Cuculmecca)son suficientes para dar respuestas a estados anémicos



# DISEÑO METODOLÓGICO



**TIPO DE ESTUDIO:**

Experimental y descriptivo.

**UNIVERSO:**

Especies vegetales con alto contenido de hierro *Ortiga mayor*, *Rosmarinus medicinales*, *Cassia grandis*, *Cassia angustifolia*, *Equisetum arvense*, *Salvia officinalis*, *Moringa oleífera*. *Smilax dominguensis*.

**MUESTRA:**

Especie vegetal de *Moringa oleífera*. *Smilax dominguensis*, *Smilax reguelli*

**ÁREA DE ESTUDIO:**

Departamento de Farmacia Industrial área de Laboratorio de Farmacognosia de la Carrera de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de suelos de escuela de Agroveterinaria.

**UNIDAD DE ANÁLISIS:**

Hojas de la especie *Moringa oleífera*, Raíces de *Smilax domingensis* y Cálices de *Hibiscus rosasinensis*.

**Criterios de inclusión de las especies:**

- Para la especie *Moringa oleífera* Hojas sanas recolectadas durante el periodo previo a la floración de la especie.
- Para la especie *Smilax domingensis* raíces no menores de 15 cm de longitud

**Criterios de exclusión de las especies:**

- Para la especie hojas *Moringa Oleífera* ennegrecidas recolectadas durante el periodo previo a la floración de la especie:
- Para la especie *Smilax domingensis* raíces jóvenes menores de 15 cm de longitud
- Para la especie *Hibiscus rosasinensis* cálices desecados con más del 5 % de humedad

**PROCEDIMIENTO:**

Inicialmente para el trabajo experimental se procedió a la revisión bibliográfica de las especies para justificar como antecedentes nuestro estudio, posteriormente se recolectaron y procesaron las muestras y se ensayaron las muestras espectrofotométricamente según se detalla a continuación:



### 1. Recolección del Material vegetal

#### - Hojas de marango (*Moringa oleífera*) BPM pos- cosecha.

- a. las hojas principalmente se recolectan al comienzo de la floración, preferiblemente se recolectaron por la mañana ,considerando que es el momento en que se encuentran presente la mayor cantidad de principios activos ; eligiendo siempre las suculentas y jóvenes, ausentes de manchas, enteras, sin daños y carentes de insectos.
- b. finalmente se lavan con agua clorada (5 gotas de cloro por cada litro de agua).

#### - Raíces de *Smilax dominguensis* y *Smilax Reguelli* :

- a. Para la selección del material vegetal se procede a recolectar las raíces del material vegetal eligiendo las más suculentas no menores de 10 cm de longitud.
- b. La hora de recolección se realizara en las primeras horas de la mañana
- c. Proceder a eliminar tierra y demás contenido de las muestra
- d. Posteriormente lavar el materia vegetal con abundante agua previo al secado

### 2. Secado del material vegetal:

- a. Para el secado de material vegetal de marango se procederá a realizar secado artificial en el herbario UNAN-León a 37 °C, por 24-72 horas hasta un porcentaje de humedad de no mayor al 3 %.
- b. En las especies *Smilax dominguensis* y *Smilax Reguelli* ,se procedió a realizar secado solar por 24-72 horas hasta un porcentaje de humedad de no mayor al 3 %.

### 3. Trituración:

- a. Realizar la molienda de las hojas y raíces, con el objetivo de obtener la más grande porción de elementos nutritivos de la fibra no digestibles, lo cual se procedió a realizar en molino de martillo (Thomas Wiley, Model 4) hasta polvo homogéneo.

### 4. Procedimiento para la determinación de cenizas:

- a. Se procedió a la determinación de cenizas en las especies *Moringa oleífera* y *Smilax dominguensis*, y *Smilax reguelli* para su posterior tratamiento y determinación de hierro.



Figura N° 7



- b. el método general para determinar las cenizas totales consiste en pesar una muestra de 5 g en una cápsula de sílice previamente calcinada y enfriada antes de ser pesada.
- c. Posteriormente la cápsula y su contenido se calcinan previamente a la obtención de cenizas lo cual se llevara a cabo colocando la muestra y adicionando una pequeña cantidad de ácido sulfúrico.
- d. Posteriormente se adiciona la muestra calcinada en un horno de mufla a 500-550 °C. por 3-4 horas hasta la obtención de las cenizas.
- e. Posterior se retiran las muestras y se adicionan en un desecador hasta lograr peso constante .Se debe tener cuidado al mover las cápsulas por el residuo esponjoso

#### 5. Ensayo de cuantificación

- a. Se utilizo un equipo: Perkin Elmer con detector de llama y grafito , Acetileno para la combustión con una P<sup>o</sup> externa de 60 PSI y una P<sup>o</sup> interna de 20 PSI , longitud de onda de lectura de calibración del equipo 324.8 nm , longitud de onda curva de calibración 248.9 nm.
- b. Calibración del equipo se utilizo solución madre de cobre hasta la obtención de una solución final obteniendo concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, ppm respectivamente para la elaboración de la curva de calibración.
- c. Preparación de las muestras, la especies previamente calcinadas son re disueltas en solución de ácido sulfúrico concentrado posteriormente se preparan diluciones de la muestra hasta la quinta dilución para su posterior lectura.



Figura N°8

#### 6. Curva de calibración de estándares

- a. Estándares de hierro preparados a partir de solución madre de 1000 mg/L.
- b. Estándar de 5 mg/L: tomar 0,5 mL del estándar concentrado de 1000 mg/L
- c. y adicionar 5 mL de HCL concentrado y aforar a 100 mL con agua desionizada.
- d. Estándar de 2 mg/L: tomar 0,2 mL del estándar concentrado de 1000 mg/L y adicionar 5 mL de HCL concentrado y aforar a 100 mL con agua desionizada.
- e. Estándar de 1 mg/L: tomar 0,1 mL del estándar concentrado de 1000 mg/L y adicionar 5 mL de HCL concentrado y aforar a 100 mL con agua desionizada.



## 7. Cuantificación de las muestras para el ensayo

- a. Inicialmente para la cuantificación de las muestras se procede a tomar 5 gramos de ceniza de *Moringa oleífera* previamente calcinada y disuelta en ácido sulfúrico concentrado 100 ml , posteriormente se realizan 2 diluciones posteriores de la muestra 1/100 la cual finalmente será valorada en la lectura del espectrofotómetro
- b. Se repite el procedimiento anterior para las especies *Smilax dominguensis* y *Smilax reguelli* la cuales finalmente serán valoradas en la lectura del espectrofotómetro.
- c. Ingresar al equipo de Absorción Atómica en método Hierro en harinas que contiene la curva de calibración obtenida de concentración (C) en ug/mL, calcular el coeficiente de correlación lineal e intercepto e interpolar la muestra para cuantificar el resultado de la absorbancia vs concentración. Valor C (ug/mL).
- d. Leer en triplicado cada muestra y cada punto de los estándares y promediar las lecturas.



Figura N°9

## 8. Cálculo e informe de resultados

$$\text{Hierro mg/Kg} = \frac{c \times v}{a}$$

Donde: c = concentración en ug/mL obtenidos por la interpolación en la curva de calibración de la muestra.

v = volumen de la muestra final

a = masa de la muestra en gramos

Limite de detección: 0,11 ug/mL

Limite de cuantificación: 0,38 ug/mL

Informar mg/Kg de Hierro sin decimal



# RESULTADOS Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS

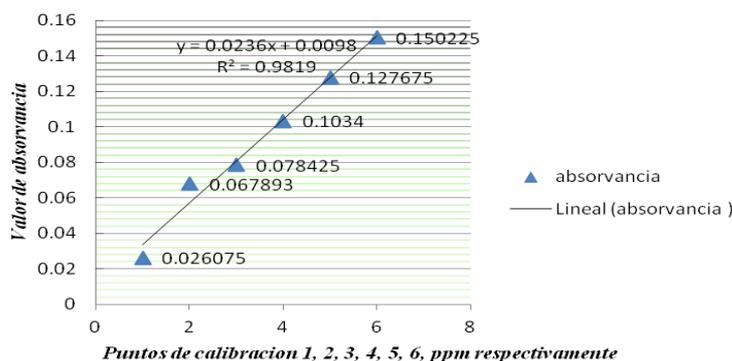


Las tablas 3 muestra el valor obtenido en la valoración de la curva de calibración respectivamente.

**Tabla N°3 Estimación de la curva de calibración**

$\lambda$ Analito	Concentración Puntos de Calibración ppm)	X STD1 Corr. Absorbancia	STD Dev	%RSD
Fe $\lambda$ 248.9	1	0.026075	0.0004 mg/L	1.3972
Fe $\lambda$ 248.9	2	0.067893	0.0002 mg/L	0.3637
Fe $\lambda$ 248.9	3	0.078425	0.0004 mg/L	0.5476
Fe $\lambda$ 248.9	4	0.1034	0.0005 mg/L	0.5179
Fe $\lambda$ 248.9	5	0.127675	0.0006 mg/L	0.4611
Fe $\lambda$ 248.9	6	0.150225	0.0012 mg/L	0.8040

**Grafico N°1 Curva de Calibración:**



La recta de calibración es del tipo:

$$y = bx + a$$

✓ Donde:

- ✓ x = corresponde a la concentración
- ✓ y = corresponde a la respuesta
- ✓ b = el valor de la pendiente o variación de respuesta por unidad de concentración.
- ✓ a = el termino independiente o intercepto sobre el eje Y.

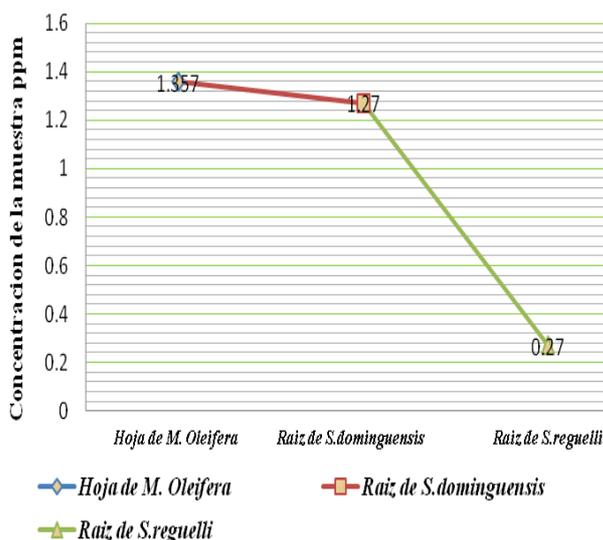
El gráfico muestra que el modelo ajustado corresponde a un modelo lineal que describe la relación entre lo esperado y lo obtenido y que responde a una línea recta y que permite hacer predicciones sobre otros valores corregidos. Como el P-valor en la tabla ANOVA es menor que 0.01, existe una relación estadísticamente significativa entre la concentración del material de referencia y el resultado obtenido sobre las soluciones, a un nivel de confianza del 95%.



**Tabla N° 4 Cuantificación de muestras**

Condiciones	Analito	Concentración (Calibración)	X STD1 Corr. Absorbancia	Concentración de la muestra	STD Dev	%RSD
Fe λ 248.9	Hoja de <i>M. Oleífera</i>	-0.372	-0.0076	1.357 mg /L	0.0134mg/L	3.5920
Fe λ 248.9	Raiz de <i>S.dominguensis</i>	-0.365	-0.0074	1.27 mg/L	0.024mg/L	6.7650
Fe λ 248.9	Raiz de <i>S.reguelli</i>	-0.377	-0.0077	0.27 mg/ L	0.0154mg/L	4.0789

**Grafico N°2 Cuantificación de muestras**



La tabla y gráfico anterior muestran el resultado para la cuantificación del contenido de hierro de las matrices vegetales de las especies *M. oleífera*, *S. reguelli* y *S.dominguensis* respectivamente para lo cual se muestra que la especie *M.oleífera* presenta la mayor concentración de hierro en comparación con las especies *S. reguelli* y *S.dominguensis* , no obstante para la especie *S.dominguensis* muestra el mayor valor de STD dev y % RSD lo cual indica que existe menor afinidad entre la variable estudiada y la respuesta , lo cual pudiera atribuirse a sustancia interferentes en el analito concluyendo la ausencia de repetibilidad para los valores obtenidos de la concentración de hierro en dicha especie.



### Desempeño del método

Para el desempeño del método se considero la precisión intermedia de las mediciones analíticas para lo cual se prepararon soluciones estadar de solución de hierro a concentración 10 ppm , se midieron las concentraciones por 3 días los resultados se muestran en la tabla siguiente:

**Tabla N° 5 Absorbancias del estándar de Hierro**

Concentración ppm	Día 1	Día 2	Día 3
10.36	0.25504	0.24355	0.24658
10.23	0.24678	0.25342	0.24589
10.32	0.24378	0.25342	0.25567
10.33	0.25345	0.24378	0.24556
10.12	0.24563	0.25673	0.24557
10.23	0.24562	0.25633	0.25114
10.41	0.24770	0.24663	0.25335
10.09	0.25669	0.25447	0.25080
10.21	0.25802	0.25733	0.25622

El desempeño fue establecido en base a las varianzas según el test de Hartley para el estudio de homogeneidad de las varianzas de 0.2348 siendo el de la tabla al 95 % de 6.83 por lo que las varianzas entre los días son homogéneas y por lo tanto existe repetibilidad entre las mediciones.



# CONCLUSIONES



- ✓ En la Valoración cuantitativa de hierro de tres especies vegetales *Moringa oleífera*, mostro ser la especie con mayor contenido de hierro , lo cual valida su utilización etomedica en pacientes con anemia ferropenica.
- ✓ La Valoración del contenido de hierro por espectrofotometría de absorción atómica en matrices vegetales muestra ser una técnica efectiva y eficiente considerando el valor P-valué en la tabla ANOVA el cual es menor que 0.01, por lo cual se evidencia existe una relación estadísticamente significativa entre la concentración del material de referencia y el resultado obtenido sobre las soluciones, a un nivel de confianza del 99%.
- ✓ El desempeño del método descrito según el test de Hartley para el estudio de homogeneidad de las varianzas muestra un valor del 95% por lo cual la varianzas entre las mediciones por día son homogéneas y por lo tanto existe repetibilidad.



# RECOMENDACIONES



- ✓ Continuar validando el uso de especies medicinales en base al contenido de minerales contenidos para ser utilizados como alternativa medicinal por personas de escasos recursos para resolver los problemas que los aquejan
- ✓ Elaborar propuesta de diseño de productos fitomedicinales con las especies analizadas como alternativa de productos que permitan dosificar posológicamente la ingesta de minerales contenidas en especies medicinales
- ✓ Continuar con las investigaciones de cuantificación y estandarización de extractos a las especies estudiadas, para establecer bases científicamente validadas para un uso adecuado y racional en la terapéutica tradicional.
- ✓ Realizar estudios fitoquímicos más exhaustivos en otras partes de las plantas estudiadas tales como: tallo, raíz, flor, fruto y corteza, para un mejor aprovechamiento de estas especies.
- ✓ Seguir con estudios de estas especies para valorar la actividad biológica que estas presentan, monitorear y detectar la mayor cantidad de compuestos con posible actividad fitomedicinal .



# BIBLIOGRAFIA



1. Hernández, S. J (2001, 11 de Marzo) .Extracto foliar, un alimento antipobreza. La prensa. Recuperado de. <http://archivo.laprensa.com.ni/archivo/2001/marzo/11/revista/>
2. Lara, R. (2009, 9 de Noviembre). Desnutrición marca futuro y condena a niñez nicaragüense. El Nuevo Diario. Recuperado de: <http://impreso.elnuevodiario.com.ni/imprimir/2009-11-09/113244>.
3. Reyes, N. (2004). Marango: Cultivo y utilización en la alimentación animal. Guía técnica N° 5. 24 (4), 5-8. Recuperado de: [http:// www.una.edu.ni/~rlarios/GUIA-TECNICA%20N%205.pdf](http://www.una.edu.ni/~rlarios/GUIA-TECNICA%20N%205.pdf)
4. Alfaro, N.(2008). Rendimiento y uso potencial de Paraíso Blanco, Moringa oleífera Lam en la producción de alimentos de alto valor nutritivo para su utilización en comunidades de alta vulnerabilidad alimentario- nutricional. Proyecto Fodecyt. 150(3), 32-34. Recuperado de: <http://archivo.laprensa.com.ni/Archivo/2005/julio/23/nacionales/nacionales-20050723-15.html+ExTRACT+FOLIAR+SOY+NICA>.
5. García, M. (2009). Moringa, el árbol de la vida –multivitaminas. El blog verde. 2(1), 1. Recuperado de: <http://moringavitaminas.blogspot.com/>
6. Guerrero, B. (2007) .Hierbas y suplementos .1(1),1 .Recuperado de : <http://healthlibrary.epnet.com/GetContent.aspx?token=0d429707-b7e1-4147-9947-abca6797a602&chunkiid=124898>
7. Pérez, T. (2009). plantas medicinales. Colombia: Grupo de Desarrollo y Biotecnología Industrial. Recuperado de: C:\Users\Personal\Desktop\ARCHIVOS\Anemia y plantas medicinales « Blog de Herbielatino.htm.
8. Sharapin Nikolai ,(Marzo 2000) extraccion de materias primas vegetales. Pinzon Roberto (ed).Fundamento de tecnología de productos fitoterapicos .(28-34) .Colombia :Quebecor –Impreandes.
9. Álvarez, R.R. (2006). La espectrometría de masas en el estudio de metales pesados en plantas.Hierro en matriz vegetal. 7(2) ,1-2. Recuperado de. [www.stressphysiology.com/labo/Congresos/2006/06Alcala\\_Eiades/06\\_Ruben\\_EIADES.pdf](http://www.stressphysiology.com/labo/Congresos/2006/06Alcala_Eiades/06_Ruben_EIADES.pdf)



10. Boccio,J., Salgueiro ,J., Lysioneck,A & Caro, R. (2003). Metabolismo del hierro: conceptos actuales sobre un micronutriente esencial. Archivo latinoamericano de nutrición .3 (1),1. Recuperado de :[http:// www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0004-06222003000200002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0004-06222003000200002&script=sci_arttext)
11. Camacho,L(2004).Diccionario de especialidades farmacéuticas; información para prescribir .Recuperado de : <http://www.libreriamedica8a.com/productos/1236.htm>
12. Godman Gilman, A (1988).Provisiones dietéticas diarias recomendadas .A,Goodman, L.Goodman, T.Rall, & F.Murad. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Buenos Aires. Editorial medica panamericana.
13. Peña, M. (2010). Determinación de Cenizas totales o residuos minerales. Blog Avibert foro. 2(1), 1. Recuperado de: <http://avibert.blogspot.com/2010/12/determinacion-de-cenizas-totales-o.html>
14. Ortiz, C & Castillo, M. (2001). Espectroscopia de absorción atómica. Curso de entrenamiento en absorción atómica, llama y generación de vapor. 19(13),1-13.Recuperado de : <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r23189.DOC>
15. J.Walsh (2002).Curva de calibración. Operaciones básicas en el análisis químico1(1),Recuperado de : [http://es.wikipedia.org/wiki/Curva\\_de\\_calibrado](http://es.wikipedia.org/wiki/Curva_de_calibrado)[http://es.wikipedia.org/wiki/Curva\\_de\\_calibrado](http://es.wikipedia.org/wiki/Curva_de_calibrado)
16. Saavedra, M(2002).Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico.Validación de métodos analíticos. Recuperado de: [www.who.int/medicines/publications/pharmprep/](http://www.who.int/medicines/publications/pharmprep/).



# ANEXOS



**Figura N°9**



**Figura N°10**



**Figura N°10**



**Figura N°11**

