

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
NUEVOS TIEMPOS, NUEVAS IDEAS



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

**“EFECTO MOLUSQUICIDA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS
HOJAS DE *Luma chequen* (MOLINA) A. GRAY (ARRAYÁN) Y EXTRACTO
ACUOSO DE LA CÁSCARA DEL FRUTO *Punica granatum* L. (GRANADA) EN
Achatina (Lissachatina) fulica BOWDICH, 1822 (CARACOL AFRICANO)”**

**Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico y
Bioquímico**

TESISTA:

Bach. TORRES FERNÁNDEZ REYNA ALEJANDRINA

ASESOR:

Mg. MONTELLANOS CABRERA HENRY

2019

Dedicatoria

A Dios por cuidar, guiar mis pasos y haberme dado salud para cumplir con mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres, por darme la vida, por su amor y sus consejos, para ser de mí, una mejor persona.

A mi esposo Ignacio, con todo mi amor por confiar y creer en mí desde el inicio de mi carrera, por su sacrificio y esfuerzo aunque hemos pasado momentos difíciles, siempre ha estado brindándome su apoyo y comprensión.

A mi preciosa y amada hija Mildred por ser fuente de motivación e inspiración, estos años han sido difíciles para nuestras vidas y me enseñaste a levantarme y seguir caminando, espero compensarte algún día todo lo que tuviste que pasar por mí, a tu corta edad.

Agradecimiento

A mi casa de estudio que me ha formado y me brindó la orientación para obtener el conocimiento como profesional de salud.

Al Mg. Henry Montellanos Cabrera, por su apoyo y orientación en realizar este proyecto.

Al Dr. Pablo Bonilla Rivera, por su dirección en sus amplios conocimientos en el campo fitoquímico, por su paciencia y comprensión.

A la Ingeniera Cynthia Zúñiga, por su apoyo y su amplio conocimiento en el campo estadístico (contrastación de hipótesis).

A la Sra. Justina Huamán Torres y familia, ciudadanos del anexo Santa Ana, distrito Perené, provincia Chanchamayo, departamento Junín por su hospitalidad y facilitarme el lugar donde se llevó a cabo la segunda parte experimental del estudio y la obtención de las muestras de *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano), que corresponde al presente trabajo de investigación.

A todos los profesionales y personas que influyeron con su colaboración, orientación, apoyo y comprensión para finalizar el presente trabajo.

Al presidente y miembros del jurado calificador, designados por la Facultad de Ciencias Farmacéutica y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

ÍNDICE

Carátula	
Dedicatoria	
Agradecimiento	
Índice	
Índice de Tablas	
Índice de Figuras	
Índice de Anexos	
SUMILLA	
SUMMARY	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
1.1. Descripción de la realidad problemática.....	3
1.2. Formulación del problema.....	6
1.2.1. Problema general	6
1.2.2. Problemas específicos.....	6
1.3. Objetivos.....	7
1.3.1. Objetivo general.....	7
1.3.2. Objetivos específicos	7
1.4. Justificación e importancia del estudio	8
CAPÍTULO II.....	10
MARCO TEÓRICO	10
2.1. Antecedentes del estudio.....	10
2.1.1. Nacionales.....	10
2.1.2. Internacionales	12
2.2. Bases teóricas	15
2.2.1. <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán).....	15
2.2.1.1. Categoría taxonómica.....	15
2.2.1.2. Ubicación geográfica	15
2.2.1.3. Descripción botánica	15
2.2.1.4. Composición fitoquímica.....	16
2.2.1.5. Propiedades medicinales.....	16
2.2.2. <i>Punica granatum</i> L. (granada)	17

2.2.2.1. Categoría taxonómica.....	17
2.2.2.2. Origen y descripción geográfica	18
2.2.2.3. Descripción botánica	18
2.2.2.4. Variedades del fruto	19
2.2.2.5. Composición fitoquímica.....	19
2.2.2.6. Propiedades medicinales.....	20
2.2.3. <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano)	21
2.2.3.1. Categoría taxonómica.....	21
2.2.3.2. Origen y distribución geográfica	21
2.2.3.3. Descripción de la especie	22
2.2.3.4. Biología y ecología	22
2.2.3.5. Reproducción biológica	22
2.2.3.6. Alimentación	24
2.2.3.7. Rutas de introducción	25
2.2.3.8. Enemigos y depredadores	25
2.2.3.9. Usos	25
2.2.3.10. Evidencias de impacto de la plaga.....	26
2.2.3.11. Control y prevención de la plaga	28
2.2.3.12. Normatividad	29
2.2.4. Extractos vegetales o botánicos	31
2.2.4.1. Definición.....	31
2.2.4.2. Usos	31
2.2.4.3. Métodos de extracción.....	32
2.2.4.3.1. Maceración.....	32
2.2.4.3.2. Reflujo	33
2.2.4.5. Concentración del extracto vegetal obtenido en forma líquida	33
2.2.5. Cromatografía en capa fina	33
2.2.6. Métodos para evaluar el efecto molusquicida	34
2.2.6.1. Pautas que permiten calificar a una planta como molusquicida	34
2.2.6.2. Protocolos y consideraciones en los ensayos para evaluar el efecto molusquicida	35
2.3. Hipótesis	36
2.3.1. Hipótesis general	36
2.3.2. Hipótesis específicas	36

2.4. Variables.....	37
2.4.1. Tabla de operacionalización de variables	37
2.5. Marco Conceptual.....	37
CAPÍTULO III	45
METODOLOGÍA	45
3.1. Tipo de Estudio	45
3.1.1. Según el nivel de conocimiento	45
3.1.2. Según su ubicación temporal.....	45
3.2. Diseño del estudio	45
3.3. Población y muestra de investigación	46
3.3.1. Población.....	46
3.3.2. Muestra	46
3.3.3. Material biológico.....	46
3.3.4. Muestra	46
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	49
3.4.1. Instrumentos.....	49
3.4.1.1. Equipos	49
3.4.1.2. Materiales de laboratorio	49
3.4.1.3. Reactivos y solventes	50
3.4.2. Procedimiento experimental.....	50
3.4.2.1. Técnicas de recolección de datos 1 (primera etapa).....	50
3.4.2.2. Descripción del instrumento 1	51
3.4.2.3. Técnica de recolección de datos 2 (segunda etapa).....	55
3.4.2.4. Descripción del instrumento 2.....	55
3.4.3. Validación de instrumentos.....	60
3.5. Procesamiento de datos	60
CAPÍTULO IV.....	61
PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	61
4.1. Resultados de la primera etapa	61
4.2. Resultados de la segunda etapa	65
4.3. Contrastación de hipótesis.....	71
4.3.1. Contrastación de hipótesis general	72
4.3.2. Contrastación de hipótesis específicas	77
4.4. Discusión de resultados	79

CAPÍTULO V.....	86
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	86
5.1. Conclusiones	86
5.2. Recomendaciones	87
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXOS.....	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán)	15
Tabla 2. Fitoquímicos de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán).....	16
Tabla 3. Taxonomía de <i>Punica granatum</i> L. (granada)	17
Tabla 4. Variedades de granada cultivadas en Perú	19
Tabla 5. Fitoquímicos de <i>Punica granatum</i> L.	19
Tabla 6. Taxonomía de <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822	21
Tabla 7. Protocolos para evaluar el efecto molusquicida.....	35
Tabla 8. Clasificación de los taninos	43
Tabla 9. Distribución del material biológico	48
Tabla 10. Reactivos para identificar los metabolitos secundarios.....	50
Tabla 11. Solventes utilizados en la parte experimental.....	50
Tabla 12. Parte experimental del tamizaje fitoquímico	54
Tabla 13. Método de cromatografía en capa fina para separar alcaloides	54
Tabla 14. Método de cromatografía en capa fina para separar flavonoides	55
Tabla 15. Formulación de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán)	56
Tabla 16. Formulación de las concentraciones del extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	56
Tabla 17. Formulación de las concentraciones de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada).....	57
Tabla 18. Descripción experimental del ensayo para evaluar el efecto molusquicida	59
Tabla 19. Resultados de la prueba de solubilidad del extracto seco de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto seco de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	61
Tabla 20. Identificación de los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto de <i>Punica granatum</i> L. (Granada)	62

Tabla 21. Resultados de la cromatografía en capa fina para alcaloides del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada).....	63
Tabla 22. Resultados de la cromatografía en capa fina para flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada).....	64
Tabla 23. Porcentaje de la pérdida del fluido corporal de <i>Achatina</i> (<i>Lissachatina</i>) <i>fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano)	65
Tabla 24. Resultados de mortalidad de <i>Achatina</i> (<i>Lissachatina</i>) <i>fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano) en el grupo control negativo y grupo control positivo	66
Tabla 25. Resultados de mortalidad de <i>Achatina</i> (<i>Lissachatina</i>) <i>fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano) en el grupo experimental del Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán).....	66
Tabla 26. Resultados de mortalidad de <i>Achatina</i> (<i>Lissachatina</i>) <i>fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano) en el grupo experimental del extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	67
Tabla 27. Resultados de mortalidad de <i>Achatina</i> (<i>Lissachatina</i>) <i>fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano) en el grupo experimental de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada.).....	67
Tabla 28. Resultados de la CL ₅₀ del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) al 100, 50, 25 y 12.5% en 24, 48 y 72 horas	69
Tabla 29. Resultados de la CL ₅₀ del extracto acuoso de la cáscara el fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) al 100, 50, 25, 12.5% en 24, 48 y 72 horas	70
Tabla 30. Resultados de la CL ₅₀ de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) al 100, 50, 25, 12.5% en 24, 48 y 72 horas	70

Tabla 31. Factores inter-sujetos	72
Tabla 32. Pruebas de efectos inter-sujetos	73
Tabla 33. Pruebas de efectos inter-sujetos	74
Tabla 34. Pruebas de efectos inter-sujetos	74
Tabla 35. Número de caracoles muertos.....	75
Tabla 36. Resultados estadísticos.....	77
Tabla 37. Resultados estadísticos.....	78
Tabla 38. Resultados estadísticos.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Métodos extractivos	32
Figura 2. Fórmula para el cálculo del Rf y factores que causan variaciones	34
Figura 3. Pautas que califican a una planta con efecto molusquicida	34
Figura 4. Estructura química del metaldehído (2, 4, 6, 8 – tetrametil - 1, 3, 5, 7 - tetroxano)	41
Figura 5. Molécula de isopreno (2-metil-1,3-butadieno)	42
Figura 6. Estructura básica de los compuestos fenólicos (hidroxibenceno)	42
Figura 7. Estructura básica de los flavonoides	44
Figura 8. Fórmula para hallar la muestra de una población infinita.....	47
Figura 9. Porcentaje de pérdida del fluido corporal de <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano) en todos los grupos experimentales	65
Figura 10. Comparación del porcentaje de mortalidad de <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> (caracol africano) del grupo control positivo (metaldehído 5%) frente al grupo experimental del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) al 100, 50, 25 y 12.5 % en 24, 48 y 72 Horas	68
Figura 11. . Comparación del porcentaje de mortalidad de <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> (caracol africano) del grupo control positivo (metaldehído 5%) frente al grupo experimental del extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) al 100, 50, 25 y 12.5 % en 24, 48 y 72 Horas	68
Figura 12. Comparación del porcentaje de mortalidad de <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> (caracol africano) del grupo control positivo (metaldehído 5%) frente al grupo experimental de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) al 100, 50, 25, 12.5% en 24, 48 y 72 horas	69
Figura 13. Gráfico de medias de número de caracoles muertos en 24, 48 y 72 Horas	75

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Matriz de Consistencia	98
Anexo 2. Clasificación taxonómica de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray, “arrayán”, constancia otorgada por el Museo de Historia Natural de la UNMSM..	99
Anexo 3. Clasificación taxonómica de <i>Punica granatum</i> L. (granada), constancia otorgada por el Museo de Historia Natural de la UNMSM	100
Anexo 4. Identificación de la especie <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 “Caracol africano” otorgada por el Museo de Historia Natural de la UNMSM.....	101
Anexo 5. Certificado de calibración otorgado por Advanced Metrology de la balanza no automática (CI-21813) página 1 de 2.	102
Anexo 6. Certificado de calibración del patrón utilizado (balanza Mettler Toledo) serie 158857, otorgado por el INACAL página 1 de 4.....	104
Anexo 7. Certificado de calibración otorgado por Advanced Metrology del termohigrómetro CI-21827, página 1 de 2	108
Anexo 8. Certificado de calibración del primer patrón utilizado (termómetro digital modelo TM-917), otorgado por el INACAL página 1 de 4	110
Anexo 9. Certificado de calibración del segundo patrón utilizado (termohigrómetro digital modelo MHB-382SD), otorgado por el INACAL página 1 de 4.	114
Anexo 10. Validación de Instrumentos	115
Anexo 11. Testimonios fotográficos.	115

RESUMEN

La propuesta de investigación propone definir el efecto molusquicida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) y la combinación de ambos en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano), por otro lado se identifican metabolitos secundarios que posiblemente influyan en el efecto molusquicida. La investigación es de diseño experimental y tipo cuantitativo, longitudinal. La parte experimental consta de dos etapas; la primera etapa se realizaron ensayos de solubilidad, marcha fitoquímica y separación de alcaloides y flavonoides por cromatografía en capa fina en ambos extractos. En la segunda etapa para determinar el efecto molusquicida de los extractos fueron preparados a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 12.5%. Los resultados hallados en la identificación de los metabolitos secundarios nos indican la presencia de compuestos fenólicos, taninos condensados, alcaloides, flavonoides y aminoácidos en el extracto hidroalcohólico de las hojas de arrayán y compuestos fenólicos, taninos hidrolizables, quinonas, alcaloides y flavonoides en el extracto acuoso de la cáscara del fruto granada; asimismo, para determinar el efecto molusquicida se dividieron en cinco grupos experimentales dando como resultado que la concentración al 100% presentó mayor efecto molusquicida en todos los grupos, del mismo modo podemos señalar que en el grupo control positivo se usó metaldehído 5% y presentó mayor efecto molusquicida en relación al grupo de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de arrayán y extracto acuoso de la cáscara del fruto granada, a su vez este presentó mayor efecto molusquicida frente al grupo experimental del extracto hidroalcohólico de las hojas de arrayán, el cual evidenció mayor efecto molusquicida frente al grupo experimental del extracto acuoso de la cáscara del fruto granada, en conclusión el extracto hidroalcohólico de las hojas de arrayán y extracto acuoso de la cáscara del fruto de la granada poseen efecto molusquicida en *Achatina fulica* Bowdich, 1822.

Palabras claves: efecto molusquicida, *Luma chequen* (Molina) A. Gray, *Punica granatum* L., *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822.

ABSTRACT

The research proposal proposes to define the molluscicidal effect of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Luma chequen* (Molina) A. Gray (myrtle) and aqueous extract of the fruit peel *Punica granatum* L. (pomegranate) and the combination of both in *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (African snail), on the other hand secondary metabolites are identified that possibly influence the molluscicidal effect. The research is of experimental design and quantitative type, longitudinal. The experimental part consists of two stages; the first stages were carried out tests of solubility, phytochemical march and separation of alkaloids and flavonoids by thin layer chromatography in both extracts. In the second stage to determine the molluscicidal effect of the extracts were prepared at concentrations of 100%, 50%, 25% and 12.5%. The results found in the identification of the secondary metabolites indicate the presence of phenolic compounds, condensed tannins, alkaloids, flavonoids and amino acids in the hydroalcoholic extract of the leaves of myrtle and phenolic compounds, hydrolysable tannins, quinones, alkaloids and flavonoids in the extract aqueous from the shell of the pomegranate fruit; Likewise, to determine the molluscicidal effect, they were divided into five experimental groups, which showed that the 100% concentration had a greater molluscicidal effect in all the groups, in the same way we can indicate that 5% metaldehyde was used in the positive control group and presented higher molluscicidal effect in relation to the group of the combination of the hydroalcoholic extract of the bayberry leaves and aqueous extract of the shell of the pomegranate fruit, in turn this had a greater molluscicidal effect compared to the experimental group of the hydroalcoholic extract of the bayberry leaves, which showed a greater molluscicidal effect in front of the experimental group of the aqueous extract of the shell of the pomegranate fruit, in conclusion the hydroalcoholic extract of the leaves of myrtle and aqueous extract of the shell of the fruit of the pomegranate have molluscicidal effect in *Achatina fulica* Bowdich, 1822.

Key words: molluscicidal effect, *Luma chequen* (Molina) A. Gray, *Punica granatum* L., *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822.

INTRODUCCIÓN

Hoy nuestro mundo atraviesa una crisis ambiental debido a la pérdida de biodiversidad debido a cinco factores importantes degradación, fragmentación y pérdida de ecosistemas, sobreexplotación, contaminación, cambio climático, introducción de especies exóticas invasoras ante esta situación los seres humanos, debemos tomar conciencia y comenzar a conservar nuestra biodiversidad para mantener el equilibrio y vivir en armonía con la naturaleza y evitar que nuestro planeta sea extinguido⁶⁵.

En la actualidad nuestro país está siendo afectado por la presencia de especies exóticas invasoras siendo una de ellas la presencia de *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano) que se encuentra a nivel global, amenazando las especies nativas, poniendo en peligro el medio ambiente, a la humanidad y su actividad agrícola razón por la cual es motivo de estudios en diferentes países y hasta la actualidad no pueden ser controlados ya que se requiere de fuertes inversiones de dinero por parte del estado².

La búsqueda de métodos para la protección natural de cultivos sigue vigente a pesar de las altas variedades de productos sintéticos que ofrece el mercado. Sin embargo el tiempo ha demostrado que estos últimos no han eliminado los problemas, sino más bien lo han aumentado en ocasiones, además de resultar costosos para los agricultores⁵.

Las plantas en el transcurso de su evolución, mantienen una relación estrecha con los organismos de sus alrededor, reflejada en el equilibrio de los ecosistemas. Es así como, por medio de sus procesos metabólicos y fisiológicos producen sustancias (terpenos, alcaloides compuestos fenólicos, etc.) con características plaguicidas de diversa índole, por su naturaleza, muchos autores refieren que estos compuestos que se extraen de la flora, contribuyen en un desarrollo sostenible en la práctica agrícola que no solo es de fácil uso para el agricultor, sino económico y rentable como los plaguicidas botánicos⁴.

Asimismo cabe resaltar que la contaminación ambiental que está produciendo cambios climáticos en nuestro planeta, la Comunidad Europea aconseja no utilizar plaguicidas químicos y promueve la investigación de plaguicidas de origen botánicos y sustituir a los químicos razón por la cual estos últimos años se ha puesto mayor énfasis en estos estudios como la búsqueda de molusquicidas de origen botánico⁴.

El estudio se realiza con la finalidad de otorgar un valor agregado a nuestra flora natural que abunda en nuestro país, obteniendo un molusquicida de origen botánico para brindar un resultado óptimo que sirva para proteger los cultivos amenazados con la plaga de los caracoles africanos, del mismo modo uno de los métodos más eficaces para la prevención y propagación de meningitis eosinofílica y angiostrongylosis abdominal que a la actualidad no se ha reportado ningún caso en nuestro país. Es el control adecuado de los hospederos intermediarios (caracol africano) es por ello la importancia de utilizar extractos vegetales, además, tienen menor impacto sobre el medio ambiente ya que son biodegradables por consiguiente se conserva la biodiversidad. Es por ello, que la identificación y utilización de diferentes compuestos bioactivos que tengan un mayor impacto, se podría utilizar para eliminar al hospedero intermediario, antes de que se produzcan daños en el hombre y de esta forma podrían beneficiarse gran parte de la población afectada en nuestro país^{2, 4, 65}.

CAPÍTULO I PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Descripción de la realidad problemática

Caracol gigante africano, *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822, según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), se encuentra registrado como una de las cien especies exóticas invasoras más peligrosas del planeta, oriunda del continente africano (Kenia; Mozambique y Tanzania) iniciando su dispersión a diversos lugares con climas tropicales y subtropicales de todo el espacio terrestre. El ingreso a Sudamérica se inició por Brasil aproximadamente en 1977, expandiéndose a Ecuador, Argentina, Venezuela, Colombia, Paraguay y Bolivia. Actualmente estos países no logran controlar, ni poner solución ante esta creciente plaga y amenaza¹.

En Perú el primer reporte de esta plaga ocurrió en el año 2012 en el Departamento de Junín, provincias Chanchamayo y Satipo, las zonas que presentan mayor infestación son los distritos de San Ramón, Perené, y Mazamari; asimismo, se ha reportado focos de infestación en Tumbes (Zarumilla), Piura (Querotillo) y Cajamarca (Jaén) provenientes de Ecuador, supuestamente fue ingresado al país con fines de alimentación o ser usados como mascota debido a su alta tasa de reproductividad fueron abandonados en parques y jardines diseminándose e infestando toda la selva central, este molusco puede llegar a medir 20 cm, su dieta es polífago y produce un gran impacto en la economía, diversidad biológica, salud pública debido a su preferencia por la materia en descomposición, por esta razón es albergue de muchos parásitos sobre todo es hospedero intermediario del nemátodo del género *Angiostrongylus*, específicamente de la especie de *Angiostrongylus cantonensis* que causa en el hombre la meningitis eosinofílica y *Angiostrongylus costaricensis* causa angiostrongiliasis abdominal, son enfermedades de mayor impacto en la salud humana, se transmite al tener contacto con las manos descubiertas o al ser

consumidas directamente, cabe resaltar que estas enfermedades no tienen tratamientos específicos².

Este es el caso de meningitis eosinofílica, enfermedad emergente en América del Sur reportado en Brasil por el Dr. Caldeira y colaboradores (2007), en Ecuador por el Dr. Luigi Martini en 2008 presentando tres casos de humanos fallecidos y más de ochenta y siete pacientes diagnosticados con esta infección. El otro miembro de esta familia de helmintos, el *Angiostrongylus costaricensis*, causa enfermedad gastrointestinal, tiene máxima prevalencia en América central (Costa Rica), América del sur Brasil y los Estados Unidos³.

Ante esta situación actual el Ministerio de Agricultura a través de su organismo SENASA, elaboró un proyecto con el apoyo de los municipios y agricultores previa capacitación en la recolección manual de los caracoles africanos para ser sumergidos en agua y cloruro de sodio por 24 a 48 horas como disposición final son enterrados en un relleno sanitario recubiertos con cal, de acuerdo con los especialistas encargados manifiestan que para potenciar la erradicación del caracol gigante africano se hace uso desde enero 2018 el molusquicida químico (metaldehído) donde se esparce en una cantidad de cinco litros por hectárea².

El metaldehído, al eliminar la plaga de los caracoles africanos también trae consigo efectos nocivos sobre el medio ambiente y el hombre, según la OMS indica que “entre 5000 y 20000 ciudadanos presentan intoxicaciones por plaguicidas sintéticos anualmente, falleciendo más del 50 por ciento, siendo los más afectados la población agrícola y 220 mil muertes al año se producen por consumir alimentos contaminados con restos de plaguicidas”⁴.

Según Nava E. et al (2012) sustenta que los plaguicidas biológicos son productos que pueden ser usados con seguridad en las buenas prácticas de agricultura. Estudios realizados afirman que los vegetales de la familia Myrtaceae contiene terpenos, alcaloides, flavonoides y fenoles asimismo de la familia Punicaceae contiene flavonoides y fenoles, los cuales son ampliamente utilizados como bioinsecticidas en la agricultura orgánica, son fácilmente degradables y poseen menos efectos adversos⁴.

Analizando la problemática existente en nuestro país y las escasas investigaciones que se realizan en este campo y buscando nuevas alternativas en nuestra flora que abunda en nuestro país y que posean menos efectos nocivos me motivó a realizar una investigación para evaluar el efecto molusquicida del extracto de las hojas de arrayán y de la cáscara del fruto granada y formulo las siguientes preguntas.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) poseerá efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano)?

1.2.2. Problemas específicos

1. ¿Cuáles serán los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) que posiblemente influyen en el efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano)?
2. ¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) poseerá efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano)?
3. ¿El extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) poseerá efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano)?
4. ¿La combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) poseerá efecto sinérgico molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano)?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Determinar el efecto molusquicida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).

1.3.2. Objetivos específicos

1. Identificar metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) que influyen en el efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).
2. Evaluar el efecto molusquicida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).
3. Evaluar el efecto molusquicida del extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).
4. Evaluar el efecto sinérgico molusquicida en la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).

1.4. Justificación e importancia del estudio

El presente trabajo de investigación se justifica por el impacto ambiental de la Directiva 2009/128/EC del Parlamento Europeo donde señala que a partir del 14 de Diciembre del 2018, el uso de molusquicidas químicos a base de metaldehído y carbamatos estará prohibido por los letales efectos colaterales que tienen y los residuos tóxicos que dejan y aconseja la sustitución de todos los pesticidas químicos no respetuosos con el medio ambiente por bio-pesticidas o ecoagroquímicos, por otra parte la exigencia del mercado de obtener productos que garanticen su calidad, conlleva a los agricultores hacer uso indiscriminado de los molusquicidas químicos ya que su principal fuente de ingreso son los cultivos, los que presentan una eficacia para eliminarlos pero también presentan efectos nocivos en la salud, medio ambiente y economía por el costo elevado de los mismos⁵.

Ante esta situación es conveniente realizar un estudio experimental para demostrar el efecto molusquicida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) en *Achatina (Lissachatina) fulica* (caracol africano), de esta manera se procura brindar una solución al problema que se encuentra atravesando nuestro país por la presencia de la plaga de los caracoles africanos desde 2012. Su importancia radica en la búsqueda de plantas que tengan efectos molusquicidas, para poder controlar la plaga de los caracoles africanos que son una amenaza en la salud de esta forma evitar que se contaminen de los parásitos del género *Angiostrongylus*, por otro lado beneficiará a los agricultores reduciendo su pérdida de productos y sobre todo mejorando su calidad y volviéndose competitivos, invirtiendo menos dinero en molusquicida químicos evitando poner en riesgo su salud³.

Asimismo, contribuye al medio ambiente ya que reduce el uso de molusquicidas químicos que ponen en peligro también a otras especies como las lombrices, ratones, erizos e incluso animales de compañía⁴.

Siendo el primer trabajo realizado en Perú buscando el efecto molusquicida de las especies de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y *Punica granatum* L. (granada) en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822, sirva de base científica futura en la práctica profesional investigativa los cuales permitirán en la ayuda de métodos para la recolección y análisis de datos, asimismo sentar bases para reemplazar los molusquicidas químicos.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

2.1.1. Nacionales

Olano S. (1999)⁶, determinó la acción molusquicida de *Furcraea andina* Trel (Agavaceae) y sus componentes fitoquímicos sobre *Fossaria viatrix* hospedero intermediario de *Fasciola hepática*, en la parte experimental realizó un extracto natural de las hojas de las plantas mencionadas por extracción mecánica y se elaboró cinco concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5 0.75, y 1.0 mL/L, expuestos por un lapso de veinticuatro horas, después de las 48 horas se evidenció la mortalidad de los moluscos, dando como resultado una dosis letal con un DL₅₀ 0.24 mL/L y DL₉₀ 0.92 mL/L en 24 horas, produciendo disminución de la frecuencia cardíaca y muerte súbita del molusco, siendo las saponinas esteroidales responsables de la actividad molusquicida que fueron identificados por espectrofotometría UV-visible.

Iannacone J. et al (2013)⁷, evaluaron los efectos tóxicos de *Agave americana* y *Furcraea andina* (Asparagaceae) sobre *Culex quinquefasciatus* (Diptera) y *Heleobia cumingii* (Mollusca)", en la parte experimental se obtuvieron extractos secos y acuosos de ambas especies y fueron aplicadas en el insecto (*C. quinquefasciatus*), díptero zancudo que produce picaduras dolorosas y molusco (*H. cumingii*), caracol dulceacuícola involucrada en la transmisión de paragonimiasis, experimentalmente para el extracto seco utilizó concentraciones (2.04, 5.12, 12.8, 32 y 80 g de peso seco/L) obtenidos a partir de una solución madre del 10% por otro lado las concentraciones (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 mL/L) obtenidos a partir de la solución madre al 1% del extracto acuoso, exponiéndolos de 24 a 144 horas. Los resultados demuestran la mortalidad de ambas especies en estudio. Mostrando mayor efecto insecticida el extracto

acuoso del jugo de la corteza de *Furcraea andina* mientras que el extracto acuoso del jugo "in toto" de *Agave americana* evidenció mayor efecto tóxico en el molusco en estudio, en caso de los extractos del polvo seco diluidos de ambas plantas referidas demostraron tener mayor efecto insecticida.

Guzmán W. (2008)⁸, con el propósito de determinar el efecto de ocho plantas molusquicidas sobre *Physa venustula* (Gould, 1847) y miracidios de *Fasciola hepática* (Linnaeus, 1758) en Perú", la actividad molusquicida y miracidicida de extractos acuosos provenientes de hojas y/o frutos de ocho plantas y evaluar el grado de toxicidad de los mismos a través de bioensayos, en el proceso se obtuvo una solución madre al 2%, se realizaron diluciones de 2, 0.4, 0.08, 0.016 y 0.0032% los cuales fueron obtenidos por expresión mecánica, el periodo de exposición fue veinticuatro horas observando cada cuatro horas. Como resultado la acción molusquicida evidenció valores de CL₅₀ en el siguiente orden: *Nerium oleander* 0.1 mg/mL, *Sapindus saponaria* 0.2 mg/mL, *Actinistus arborescens* 0.8 mg/L, *Nicotiana tabacum* 1.2 mg/mL, *Jacatropas curcas* 4.1 mg/L, *Furcraea andina* 6.9 mg/L y *Euphorbia mili* 8.2 mg/L y los resultados de la acción sobre miracidios de *Fasciola hepática* mostró valores de CL₅₀ *S. saponaria* 3.9 mg/mL, *N. oleander* 4.0 mg/L, *F. andina* 4.4 mg/L, *M. azedarach* 5.1 mg/L, *E. mili* 5.8 mg/L, *J. curcas* 8.8 mg/mL y *N. tabacum* 9.5 mg/L.

Iannacone J. et al (2013)⁹, para evaluar la toxicidad aguda de las hojas de *Agave americana* y *Furcraea andina* y frutos de *Sapindus saponaria* sobre *Melanooides tuberculata* obtuvieron los extractos botánicos por técnicas de separación, se realizaron preparaciones con las siguientes concentraciones (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1,2 mL/L) repitiendo el ensayo cuatro veces, los resultados a 24 horas se observó la mortalidad de caracoles *M. tuberculata* y el ensayo tóxico reveló (CL₅₀ 1.62 mL/L de *F. andina*, CL₅₀ 1.01 mL/L de *A. americana*, CL₅₀ 1.72 mL/L de *S. saponaria*), concluyendo la toxicidad de los extractos acuosos se presentó en el siguiente orden *A. americana*>*F. andina*>*S. saponaria*.

2.1.2. Internacionales

Selvi et al (2015)¹⁰, evaluaron el efecto molusquicida de la sílice biogénica y pesticidas botánicos para el control de *Achatina fulica* (gigante caracol de tierra africano) y *Laevicaulis alte* (babosa de jardín). Experimentalmente la sílice biogénica sintetizada a partir de las cenizas de la cáscara del arroz obtenida con un diafractómetro de rayos x. La extracción acuosa y seca de las hojas de las plantas fueron preparadas en forma independiente y mezclados con sílice a una concentración de 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, y 0.25 g fueron espolvoreados y evaluados con tres repeticiones cada tratamiento en 24 horas. Finalmente informan que para *Achatina fulica* las partículas de sílice revestidas con bioplaguicidas son más efectivas cuando están cubiertos con neem, tabaco, karanj y calotropis respectivamente. Para *Laevicaulis alte* las partículas de sílice revestidas con bioplaguicidas fueron más efectivas cuando se recubrieron con tabaco, neem, karanj y calotropis respectivamente. El extracto de la planta (líquido y polvo seco) sin sílice no mostró efecto en los moluscos, que los de la sílice recubierta con molusquicidas botánicos, asimismo indicaron que a medida que aumentaba la dosis de 0.15, 0.20 y 0.25 g el tiempo requerido para la mortalidad disminuyó llegando a una conclusión que la sílice recubierta con extractos botánicos son efectivos y pueden ser utilizados para controlar la plaga sin producir deterioro ambiental.

Rao I., Singh D. (2002)¹¹, determinaron los efectos tóxicos de tratamientos individuales y binarios de molusquicidas sintéticos y derivados de plantas contra *Achatina fulica*, identificando la densidad poblacional de este caracol en diferentes partes de la flora oriental, la preferencia alimenticia y su control mediante tratamientos simples y binarios de molusquicidas sintéticos y derivados de plantas, resultando que *Achatina fulica* había emigrado a cuatro distritos de Gorakhpur, Deoria, Kushinagar y Maharajganj, las hojas de consumo de preferencia fueron *Annona squamosa*, *Caspicum annum*, *Memordica charantia*, en los tratamientos individuales sintéticos resultando ser más tóxico el caracol Kill ($CL_{50}=0.6$ por ciento en 24 h) y cipermetrina ($CL_{50}=2.38$ por ciento en 24 h), para el tratamiento individual de molusquicidas derivados de plantas se emplearon aceites de *Cedrus deodara* y *Azadirachta indica* y polvo de *Allium sativum* y *Nerium indicum* siendo más tóxico el aceite de *Cedrus deodara* ($CL_{50}=3.32$ por

ciento en 24 h), seguido de *Allium sativum* (CL₅₀=7.24 por ciento en 24 h) y *Nerium indicum* (CL₅₀=10.40 por ciento en 24 h), no tuvo ningún efecto el aceite de *Azadirachta indica* y para los tratamientos binarios de molusquicidas de origen vegetal se aplicó a combinaciones binarias de (1:1) en diferentes concentraciones siendo más tóxico la combinación de aceite de *Cedrus deodara* + polvo de *Allium sativum* (CL₅₀=4.18 por ciento en 24 h), seguido de la combinación del aceite de *Cedrus deodara* + aceite de *Azadirachta indica* (CL₅₀=7.54 por ciento en 24 h), llegando a una conclusión que diferentes molusquicidas sintéticos y derivados de plantas, tratamientos individuales y binarios son efectivos contra *A. fulica*, las combinaciones binarias de productos de plantas son seguras para animales no objetivo y cultivos agrícolas.

Rao I. et al (2003)¹², determinaron el efecto de combinaciones simples y binarias de molusquicidas derivados de plantas en diferentes actividades enzimáticas en el tejido nervioso de *Achatina fulica*, observando que el efecto del tratamiento subletal de varios molusquicidas derivados de plantas, aceites de *Azadirachta indica* y *Cedrus deodara*, polvo de *Allium sativum* y *Nerium indicum* también combinaciones binarias en diferentes enzimas del tejido nervioso de *A. fulica*. Concluyendo que la CL₅₀ en un 40 y 80 por ciento en 24 h de aceite de *A. indica* y *C. deodara*, polvo de bulbo de *A. sativum*, corteza de *Nerium indicum* en polvo y combinaciones binarias de polvo de *A. sativum* y aceite de *C. deodara* asimismo, aceites de *C. deodara* y *A. indica* alteró significativamente la actividad de estas enzimas en el tejido nervioso de *A. fulica*. El tratamiento de *A. sativum* y *C. deodara* fue más efectivo contra AChE, LDH y ALP. Sin embargo el tratamiento binario de *A. indica* y *C. deodara* fue más efectivo contra ALP.

Mahdi H. (2009)¹³, en su estudio busca demostrar la capacidad de utilizar los extractos acuosos de la cáscara del fruto *Punica granatum* y las hojas de *Myrtus communis* en el control biológico de *Lymnaea auricularia*, concluyendo que la extracción acuosa de *Punica granatum* mostró mayor efecto en los caracoles que el extracto acuoso de *Myrtus communis*. La CL₅₀ (24, 48, 72 y 96 h) fueron (1.75, 1.5, 0.5 mg/mL) para *Punica granatum* y (2.2., 1.25, 1 mg/mL) para *Myrtus communis* respectivamente.

Tripathi S. y Singh D. (2002)¹⁴, en su investigación tipo experimental cuyo objetivo es evaluar en el laboratorio la actividad molusquicida de *Punica granatum* y *Canna indica* contra *Lymnaea acuminata*, dando como resultado que la actividad molusquicida de la corteza de *Punica granatum* y la raíz de *C. indica* dependían tanto del tiempo como de la dosis. La CL₅₀ en 24 horas fue de 22.42 mg/mL para *Punica granatum* y para *Canna indica* (CL₅₀ en 24 h fue 55.64 mg/mL), siendo más tóxica y efectiva el extracto etanólico de *Punica granatum*. Ambas plantas pueden usarse como molusquicidas potentes pues no presentaron efectos tóxicos para el pez *Colisa fasciatus* que habita junto al caracol mencionado.

Romero L. et al (2016)¹⁵, el estudio va dirigido para verificar la acción de los extractos acuosos de hojas de *Bracharis dracunculifolia* DC, *Morus rubra* L, *Cyperus rotundus* L. y *Euphorbia heterophylla* L. y brote floral de *S. aromaticum*, *sigygium* (L.) Merr y Perry en *Achatina fulica* y sus huevos. Para obtener el extracto acuoso de las especies en estudio de las hojas y capullos florales obtuvo una concentración madre 1g/10mL a partir de ella fueron diluidas con agua destilada a diferentes concentraciones (10, 30, 50, 70 y 100 por ciento), los cuales fueron espolvoreados cada dos días con 5 mL (20 rociados) en 20 huevos y 10 moluscos, en todas las concentraciones del 100 y 50 por ciento se observó una significativa mortalidad, concluyendo que ninguno de los extractos presentaron actividad ovicida y la actividad molusquicida en el extracto acuoso de hojas de *E. heterophylla* y capullos de flores de *S. aromaticum* puede constituir una estrategia alternativa viable para el control de estos moluscos terrestres.

Garcés M. et al (2008)¹⁶ el estudio se dirige específicamente a valorar la eficacia de los reglamentos instaurados para monitorizar el uso de sustancias alternas de costo económico para el control de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano). Examinando la utilidad de recolección mecánica encontrando un inconveniente de no poder extraer aquellos moluscos que se esconden bajo la tierra para estivar. La técnica de aspersion con cal podría ser solamente utilizada para eliminar definitivamente al gasterópodo una vez colectado manualmente, la cual trae consigo una consecuencia nociva sobre el suelo pues afecta a las plantas y los microorganismos existentes en él. Asimismo se verificó que el

extracto vegetal de *Tabebuia rosea* posee antraquinonas y polifenoles y *J. curcas* contiene hidrotectol y compuestos naftalénico los cuales presentan actividad molusquicida con menor efecto en relación al metaldehído concluyendo que los extractos pueden ser incluidos dentro de las medidas adoptadas para controlar la plaga de *A. fulica* por su facilidad en la obtención y presentar menos efectos negativos contra el ambiente.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán)

2.2.1.1. Categoría taxonómica

Tabla 1. Taxonomía de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán)

Según el sistema de Clasificación de Cronquist (1988), determinado por el Biólogo Severo Baldeón Malpartida. En el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos ver (Anexo 2)
<p>DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA</p> <p>CLASE: MAGNOLIOPSIDA</p> <p>SUBCLASE: ROSIDAE</p> <p>ORDEN: MYRTALES</p> <p>FAMILIA: MYRTACEAE</p> <p>GÉNERO: <i>Luma</i></p> <p>ESPECIE: <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray</p>
NOMBRE VULGAR: "Arrayán"
SINONIMIA VULGAR: "Wallpuma" "rayán castilla", "Luma", "rayán"
SINONIMIA CIENTÍFICA: <i>Eugenia chequen</i> var. <i>Myrtomimeta</i> (Diels) Kausel ¹⁷

Fuente: Elaborado por el investigador

2.2.1.2. Ubicación geográfica

En su forma natural de crecimiento, en suelos profundos y húmedos formando parte de un ecosistema se encuentra a lo largo de la Cordillera de los Andes de América del Sur a una altura de 2500 a 4000 m.s.n.m., en nuestra nación podemos encontrarla en los departamentos de Áncash, Pasco, Junín, Ayacucho, Arequipa, Cuzco¹⁷.

2.2.1.3. Descripción botánica

Arbusto que mide de cinco a seis metros de altura, coposo, con follaje denso y siempre verde. Posee un **tallo** empinado ramificándose

encima de la base, presenta un color grisáceo opaco a marrón, desprende un aroma sui géneris suave. Sus **hojas** se evidencian por ser comunes y opuestas de forma elíptica de borde entero, lustroso, glabro y fragante al ser estrujadas. **Las flores** son blancas, perfumadas, se encuentran de forma solitaria, actinomorfas, bisexual formadas por un cáliz persistente de cuatro cortos sépalos y cuatro pétalos glabros, tienen numerosos estambres blancos muy largos rodeando a un único pistilo rojizo, de ovario epigina con placentación axilar. **El fruto** es una baya con escasa semillas y escaso endosperma. El tiempo de floración se presenta en el mes de marzo y junio, la producción del fruto en el mes de mayo¹⁸.

2.2.1.4. Composición fitoquímica

A continuación un detalle de los metabolitos secundario que presenta:

Tabla 2. Fitoquímicos de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán)

Flavonoides	Quercetina, rutina, mirecetina, quercentin-3-metil éter y lumaflavonoides
Ácidos fenólicos	Ácidos feruloilquinico, ácido clorogénico y ácido neoclorogénico
Antocianinas	Delfinidina, cianidina, petudina, ponidina y malvidina
Aceites esenciales	Cineol, mirtol, sabineno, eucaliptol, neralidol α - pineno, β - pineno trans verbenol, mentona, carvona D-carvona, timol y otros.
Taninos, triterpenos y esteroides	

Fuente: Torres Chati (2014)¹⁹

2.2.1.5. Propiedades medicinales

Presenta diferentes propiedades como señala en su libro Mantilla y Olazábal (2008) señala que las hojas reposadas en agua, ayudan a mitigar la gripe, las hojas en mate calman la tos, indigestión y diarreas, la infusión de las hojas se utiliza como expectorante y astringente, el enjuague o gárgaras con el agua que hirvió las hojas de arrayán mejoran el mal aliento, los baños con agua hervida de arrayán por las mañanas durante ocho días calman los dolores del reumatismo, lavarse la cabeza con agua donde las ramas tiernas hirvieron, calma la cefalea, las hojas secas y molidas con un

poco de maíz blanco se frota todo el cuerpo este procedimiento hace que el cuerpo transpire aliviando el resfriado, calenturas y fiebre, asimismo algunos pobladores lo usan para bañar a los muertos como conservante²⁰.

Asimismo las ramificaciones por su fragancia pueden utilizarse en la gastronomía y como especia aromática en la producción de embutidos²¹. El uso externo se usa para lavados vaginales. El cocimiento de las hojas con un puñado de sal se usa como aromatizante que quita el mal olor de los pies, de esta forma desinfecta completamente los pies, tonifica nervios, por lo que se recomienda de manera preferente para jóvenes deportistas²².

Carhuapoma M. (2006) demostró que la extracción del óleo esencial de las hojas de arrayán tiene actividad antioxidante²³, estudios realizados por Torres J. (2014) han demostrado que el extracto etanólico presenta actividad antimicrobiano específicamente frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Klebsiella pneumoniae*. Asimismo se le confiere actividad fungistático contra *Cándida albicans*²⁴, efecto hipoglucemiante en la cual disminuye significativamente la glucosa, posee efecto hipolipemiante disminuyendo valores de LDL y VDL y antiaterogénico²⁵.

2.2.2. *Punica granatum* L. (granada)

2.2.2.1. Categoría taxonómica

Tabla 3. Taxonomía de *Punica granatum* L. (granada)

Según el sistema de Clasificación de Cronquist (1988), determinado por la Dra. Mónica Arakaki. En el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos ver (Anexo 3)
DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA
CLASE: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE: ROSIDAE
ORDEN: MYRTALES
FAMILIA: PUNICACEAE
GÉNERO: <i>Punica</i>
ESPECIE: <i>Punica granatum</i> L.
NOMBRE VULGAR: "Granada"
El nombre científico es <i>Punica granatum</i> L., este arbusto fue introducida en zonas mediterráneas por los cartagineses durante la guerra Punicas por tal motivo los romanos la denominaron <i>Punica</i> , "granatum" referente a la densidad de granos que está lleno el fruto ²⁶

Fuente: Elaborado por el investigador

2.2.2.2. Origen y descripción geográfica

Especie originaria que se dispersa desde el Sur de Europa al continente asiático, se cultivan en todos los países de la Cuenca del Mediterráneo, Arabia, Irán, Afganistán desde hace mucho tiempo, se extendió al Oeste de África, introducido por los árabes a España donde es conocida como “milgrana”. En su fin de colonizar América, se ha dispersado.

En Perú se cultiva en Ica, Lima, la Libertad, Arequipa, Tacna, Moquegua y Lambayeque²⁷.

2.2.2.3. Descripción botánica

Es un árbol pequeño que en condiciones favorables puede llegar a medir seis metros. **Sistema radicular** no tiene una raíz principal de importancia se desarrolla horizontalmente dotado de numerosas raíces muy ramificadas, son nudosos y de color castaño, tiene un alto poder de absorción en medios salinos, condición favorable para algunas zonas de la costa, ante la falta de oxígeno las raíces crecen curvándose hacia arriba²⁷. **Tallo** siendo su característica principal un tallo redondo y ramificado, sus ramas son débiles y a veces espinosos^{26, 27}. **Hojas** son de color verde brillante, nacen opuestas, enteras, lanceoladas y oblongas, relativamente pequeñas, limbo espeso, coriáceo y lustroso, nervaduras más o menos rojizas con peciolo cortos a menudo redondeado²⁸. **Flores** son variadas podemos encontrarlas en forma aisladas o agrupadas de dos a cinco flores a los extremos de las ramificaciones, los pétalos presentan un color carmesí, anaranjadas y en algunos son blancos, tiene muchos estambres, el ovario está dividido en tres a siete lóculos radiantes, cada uno de los cuales tiene muchos óvulos²⁸. **Fruto** tiene aspecto globular, su diámetro aproximado va de diez a quince centímetros, está dividido por medio de membranas carpelares por una pulpa jugosa de color rosa o roja de sabor agrídulce, ligeramente a las grosellas o blanco amarillentas, la pulpa es algo astringente y su corteza es lisa y de textura coriácea^{27, 28}.

2.2.2.4. Variedades del fruto

Tabla 4. Variedades de granada cultivadas en Perú

Variedad del fruto	Peso prom. del fruto	Periodo de madurez	Color de los arilos	Sabor del fruto
Wonderfull - California	500 g	Primera semana de abril	Rojos oscuros	Agridulce
Mollar de Elche	400 g	Segunda semana de marzo	Rojos oscuros	Dulce
Acco & Shani	300 g	Segunda semana de febrero	Rojo	Dulce
Emeq	400 g	Segunda semana de enero	Rojo	Dulce
Kamel	300 g	Segunda semana de marzo	Rojo intenso	Dulce
Purple	300 g	segunda semana de mayo	Rojo purpura	Dulce

Fuente: Escobar F. y Quispe Q. (2017)²⁷

2.2.2.5. Composición fitoquímica

Punica granatum L. presenta metabolitos secundarios de acuerdo a cada parte de la planta como se presenta a continuación.

Tabla 5. Fitoquímicos de *Punica granatum* L.

Partes de la granada	Metabolitos secundarios
Raíz	Alcaloide (peletierina o punicina)
Tallo	Numerosas piperidinas alcaloides , tanino elágico (punicalino y punicalagino)
Hojas de la granada	Taninos, flavonas glucosídicas (luteolina y apigenina)
Flores de la granada	Sitosterol, ácido ursólico, triterpenoides, ácido gálico.
Fruto de la granada	Vitamina C, antocianinas, tiamina y riboflavina.
Cáscara del fruto	Ácido elágico y ácido gálico, catequina, quercetina, rutina, flavonoles, flavonas, flavononas y antocianinas
Aceite de semilla de la granada	Ácidos púnicos, esteroles y ácidos grasos, ácido elágico.

Fuente: Garachh et al (2012)²⁹

2.2.2.6. Propiedades medicinales

Morton (1981), manifiesta la utilidad terapéutica en forma natural en sus diversos preparados como hervor, pulverización de la cáscara seca del fruto granada, es aprovechada para los casos de disentería, diarreas y favorece en la cicatrización de heridas. La cocción de treinta gamos en diez minutos de la corteza del tallo, raíces, hojas es muy práctica para eliminar helmintos. Los colutorios preparados a base de las flores mejoran casos de estomatitis, amigdalitis y periodontitis, en forma de infusión, controla la glucosa en pacientes diagnosticados con diabetes mellitus³⁰.

Recientes investigaciones científicas realizadas en diversos extractos afirman la presencia de polifenoles, antocianinas y taninos los cuales demuestran que tiene actividad antimicrobiana²⁹. Gracias a la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides se le confiere actividad antiinflamatoria³¹. Propiedades anticancerígenas y antitumorales, estudios han demostrado que los polifenoles de la corteza, de la membrana, del jugo fermentado y el aceite de la granada todos por separado presentan efecto antiproliferativo, induce apoptosis, inhibe invasión tumoral y formación de nuevos vasos sanguíneos. Favorece en la prevención de enfermedades cardiovasculares, asimismo se le atribuye actividad antioxidante por poseer compuestos fenólicos. Numerosos estudios hablan de las bondades de la granada y es una base para la elaboración de nuevos fármacos.²⁹.

2.2.3. *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano)

2.2.3.1. Categoría taxonómica

Tabla 6. Taxonomía de *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822

La identificación de la especie del molusco fue realizado por Dra. Rina Ramírez Mesías, Jefe del Departamento de Malacología del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos ver (Anexo 4)
REINO: METAZOA
PHYLUM: MOLLUSCA
CLASE: GASTROPODA
INFRAORDEN: STYLOMMATOPHORA
SUPERFAMILIA : ACHATINOIDEA
FAMILIA: ACHATINIDAE
GÉNERO: <i>Achatina (Lissachatina)</i>
ESPECIE: <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822
NOMBRE COMUN: Caracol africano
OTROS NOMBRES: Caracol gigante africano, caracol gigante de la tierra.

Fuente: Cuasapaz J. (2017)³²

2.2.3.2. Origen y distribución geográfica

Natural del continente Africano (Kenia, Mozambique y Tanzania), infestando las zonas costeras del este de África, actualmente se encuentra en todos los países del continente referido, fuera de su zona de procedencia, se registró por primera vez en 1847 al sur de Asia (India) invadiendo todos los países asiáticos (Taiwán, Malasia, Japón, Sumatra y Filipinas) donde existe vegetaciones, llegando a Oceanía (Hawái), en 1939 fue introducido como mascota al norte de América provocando un aumento en su reproducción en el Estado de Florida a orígenes de 1970, con el objeto de comercializar al molusco fue ingresado al Sur de América en 1980 (República Federativa de Brasil), compuesta por veintiséis estados de los cuales veintitrés últimamente se encuentran plagados, expandiéndose a los países vecinos (Venezuela, Colombia, Ecuador, Argentina, Paraguay y Bolivia)³². Acto seguido llegó a Perú y siendo notificado en el 2012 en el Departamento de Junín multiplicándose por todas las áreas de la selva central, del mismo modo se reportó en Tumbes, Piura y Cajamarca (2015)³³.

2.2.3.3. Descripción de la especie

Molusco en estudio, está compuesto por cuerpo y coraza. Se identifica fácilmente por su tamaño, su concha cónica relativamente larga y angosta tiene un rango de tamaño de 5-10 cm y en los adultos puede llegar a medir hasta 30 cm de longitud y 12 cm de diámetro, el color es variable, comúnmente es marrón claro y crema de los ejemplares más grandes, la coloración se vuelve más clara hacia la punta del caparazón llegando a hacer casi blanca, tiene de siete a nueve espirales. La abertura de la concha es ovalada semilunar redondeada con un labio exterior afilado y sin reflejos. El cuerpo es de color marrón oscuro gomoso está constituido por tres partes: cabeza, pie y masa visceral. En la cabeza tiene dos pares de tentáculos, un par inferior que es corto que son los sensores olfatorios y un par superior grande con ojos redondos situados en la punta, los cuales no enfocan muy bien pero son sensibles a la luz. La boca está situada bajo su cuerpo, tiene una mandíbula con cuernos y una rádula que contiene aproximadamente 80000 dientes los cuales tiene aspecto de lengua. El pie es la parte del cuerpo que los ayuda a moverse liberando una mucosidad, mientras se mueven para reducir la fricción y evitar dañar sus tejidos, el saco visceral está dentro de la concha y contiene todos los órganos del caracol^{33, 34}.

2.2.3.4. Biología y ecología

Se establece en países que tienen climas tropicales con temperaturas cálidas y alta humedad todo el año, esta especie permanece activa en un intervalo de temperaturas de 9 a 29°C y pueden sobrevivir en temperaturas de 2°C debido a la hibernación que realiza al organismo y a 30°C por estivación³⁵. Se encuentran escondidos entre pequeñas rocas, desechos de basura, plantaciones vegetativas entre otros, esta especie puede adaptarse en cualquier ambiente y es competitiva por el medio siendo una amenaza para el entorno donde se encuentra³⁵.

2.2.3.5. Reproducción biológica

Caracol africano es hermafrodita, tiene un rango de existencia (tres a seis años), algunos pueden llegar a vivir hasta nueve años con la ayuda

del proceso de estivación, su capacidad de reproducción se inicia al año después de la eclosión, estudios realizados por Tomiyama (1993), afirma que la madurez del sistema reproductivo está relacionado con el crecimiento de la concha, después del año el crecimiento de la concha continúa algunos meses más, las glándulas reproductivas se forman al final del año, significa que mientras continúa el crecimiento de la concha del caracol, solo hay producción de espermatozoides y cuando la concha deja de crecer hay producción de espermatozoides y óvulos lo que significa que el caracol es completamente hermafrodita³⁶, asimismo para la madurez reproductiva depende de cuatro factores como son: humedad, temperatura, luminosidad ambiental y época de nacimiento. El ciclo biológico está comprendido por cinco fases: cópula, fecundación, oviposición, incubación y eclosión.

Primera fase llamado cópula, es recíproco cuando los caracoles son del mismo tamaño, pero cuando hay diferencia de tamaño el más grande recibe los gametos del caracol pequeño, según Tomiyama (1994), clasificó la edad del caracol en dos fases: adulto joven y adulto viejo en los adultos jóvenes la cópula se da a media noche y dura entre 1.5 a 7.5 horas con un promedio de 4.6 horas³⁷, la cópula en los adultos viejos dura entre 5 a 10 horas. El acoplamiento normalmente se da una vez cada 21 días pero puede producir hasta seis acoplamientos en dos meses.

Segunda fase, para que pueda llevar a cabo el proceso de **fecundación** los óvulos deben de llegar a la cámara de fecundación, allí se efectuará la unión con el espermatozoide, los óvulos fecundados se almacenan en el canal festoneano rodeándose por una capa de albumina y por una envoltura compuesta de CaCO_3 que son elaboradas por glándulas multífidas, estas se endurecen cuando entran en contacto con el aire³⁷.

Tercera fase, oviposición oscila entre los 8 a 21 días, depositan huevos (4.5 mm de largo y 5.5 mm de diámetro) en multitud (100 a 500) un solo molusco y al año un máximo de 1200, en nidos que han sido escavados con poca profundidad bajo tierra, rocas y cubiertas con ramas, deshechos y tierra. El tiempo de deposición de los huevos varía de cinco a veinte minutos³⁷.

Cuarta fase, incubación se da de 7 a 12 días teniendo en cuenta los siguientes parámetros, temperatura 23 a 26 °C, pH 6 a 7 con un 73 a 78 por ciento de humedad relativa al final de la incubación, los huevos toman un color parduzco.

Quinta fase, eclosión al finalizar el ocaso, rompen el cascarón y se liberan los caracoles bebés, hospedándose por cinco a diez días en el nido y se alimentan de huevos sin eclosionar o detritos de huevo.³⁵

2.2.3.6. Alimentación

Achatina (Lissachatina) fulica Bowdich, 1822 (caracol africano), es una especie polífaga, la ubicación de su alimento es potenciada por su sentido del olfato, según Raut y Barker (2002)³⁸ “generalmente son herbívoros se alimentan de materia vegetal vascular viva y en descomposición”, asimismo señala Van Weell (1948)³⁹ se alimentan de líquenes, algas y hongos y como fuente de calcio consumen animales en descomposición, restos óseos, muros y techos de las casa hasta piedras como señala Prasad et al 2004⁴⁰ y depredador de otros moluscos, siendo una amenaza para los caracoles nativos como informa Meyer et al 2008⁴¹, consumen también materia fecal.

Se ha registrado un número de plantas incluyendo la mayoría de las ornamentales vegetales y leguminosas. Se ha evidenciado en diferentes lugares del mundo, específicamente hay ataques reportados a cultivos de cebolla (*Allium cepa*), cebollina china (*Allium tuberosum*), piña (*Ananas comosus*), chirimoya (*Annona cherimola*), maní (*Arachis hypogaea*) ajo (*Allium sativa*), limón (*Citrus limon*), rabanito (*Raphanus sativus*), ñame (*Discorea trifida*), melón (*Cucumis melo*), mandarina (*Citrus reticulata*), sandía (*Citrullus lanatus*), flores suaves (*Amaranthus tricolor*), coliflor (*Brassica oleracea*), guanábana (*Annona muricata*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), espinacas (*Spinacia oleracea*), tomate (*Solanum lycopersicum*), arvejas (*Pisum sativum*), carambola (*Averrhoa bilimbi*), entre otros³⁸.

2.2.3.7. Rutas de introducción

Gasterópodo referido, se encuentra en todos los continentes en forma accidental y por la intervención de la mano del hombre ya que en algunos países como Europa y Brasil fueron introducidos para usar en las técnicas culinarias, también como carnada en la pesca, en Colombia fue llevado para el uso en la industria cosmética y algunas personas aprecian el atractivo del animal y los mantienen como mascota. En forma accidental podrían trasladar en los medios de transporte de cosecha, en los camiones de basura, desmonte, a los moluscos en forma adulta, recién nacidos y huevos³⁸. Una vez escapado ha logrado establecerse y reproducirse en lugares tropicales y templados como resultado es una amenaza a nivel mundial.

2.2.3.8. Enemigos y depredadores

Dentro de sus enemigos naturales de *Achatina fulica* Bowdich, 1822, es *Euglandina rosea* caracol carnívoro natural de Estados Unidos y el gusano plano *Platydemus manokwari* natural de Japón.

En Isla de Navidad (Kiritimati) existe el cangrejo rojo endémico, *Gecarcoidea natalis*, quién restringe la distribución de *A. fulica* especialmente en zonas tropicales.

En Isla Coral los cangrejos ermitaños principalmente *Coenibitus perlatus* y cangrejos ladrones *Birgus latro* .

En Isla del Indo – Pacífico depredan al caracol africano las ratas, los ciempiés, los milpiés y las hormigas de fuego (*Solenopsis geminata*), conocida en Perú como hormiga brava roja³⁸.

En la India (Rjasthan) puede ser devorado por el coucal (*Centropus sinensis*) pájaro pequeño⁴².

2.2.3.9. Usos

Alimentación para humanos, en su nativa África Oriental es fuente de proteínas para algunas personas locales este proceso se da, si el caracol es criado en cautiverio (helicicultura), en grandes cantidades de carne, en forma enlatada se exporta a Europa provenientes de Taiwán, China y otros países asiáticos⁴³.

Alimentos para animales, la carne de caracol africano es utilizado para procesar alimentos para pollos y como fuente alternativa en la alimentación en la piscicultura⁴⁴.

Investigación médica y farmacéutica, es una especie que ha demostrado tener propiedades antibacterianas y anticancerígenas específicamente el cáncer de mama, estudios realizados por Zhong et al 2013⁴⁵, identificaron un nuevo péptido antimicrobiano rico en cisteína (mytimacin-AF) se obtuvo a partir del moco del caracol africano quien mostró una potente actividad antimicrobiana contra bacterias gramnegativas y grampositivas y el hongo *Candida albicans* con poco efecto hemolítico en los glóbulos rojos del ser humano. En otra investigación realizada por Kobon et al 2016⁴⁶ identificaron péptidos anticancerosos del moco de *A. fulica* que mostraron citotoxicidad in vitro contra la línea celular de cáncer de mama (MCG-7), se identificaron 404 y 424 péptidos de los cuales serían moléculas prometedoras para el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer de mama.

Ornato: por su tamaño algunas personas los usan como mascota⁴⁴.

Religión en Nepal, la especie se utiliza en ceremonias religiosas por su tamaño y su belleza, piensan que es un regalo de los dioses e incluso las conchas son comunes en los altares de sus viviendas y en los altares para ceremonia religiosas⁴⁴.

2.2.3.10. Evidencias de impacto de la plaga

Impacto en la salud, en muchas sociedades asiáticas y americanas, es hospedero intermediario de los nemátodos de *Angiostrongylus cantonensis* y *costaricensis*, en el hombre transmite meningitis eosinofílica y angiostrongyliasis abdominal respectivamente, estos parásitos se encuentran en la baba del caracol, los cuales pueden ser transmitidos de forma directa al hombre. Cuando es manipulado sin guantes o al ser consumidos en carne cruda o mal cocida, de forma

indirecta al ingerir cualquier producto contaminado y la ausencia de las buenas prácticas de limpieza⁴⁷.

Estudios parasitológicos realizados a la muestra de las heces del caracol africano encontraron en un 70.6 por ciento géneros de parásitos como: *Entamoeba*, *Giardia*, *Endolimax*, *Toxacara*, *Trichuris* e *Hymenolepis* así como la larva del orden Strongylida, también encontraron fases evolutivos de *Blastocystis sp*, *Schistosoma mansoni*⁴⁷.

Impacto ambiental: Caracol africano causa daños al medio ambiente, es una plaga que le gusta competir por el medio donde se encuentra, debido a esto desplaza poblaciones de moluscos nativos, asimismo causa pérdida de cultivos por ser herbivoria y propaga enfermedades a través de patógenos a los cultivos y plantas. En sus heces se han encontrado esporas de *Phytophthora palmivora*, *P.colocasiae* y *P. parasítica*⁴⁴ responsables de producir enfermedades en los cultivos, asimismo existen efectos indirectos que han ocasionado un problema en a la diversidad biológica por la introducción del caracol lobo (*Euglandina rosea*) en Hawái como medida de control para el caracol africano. Ocasionó la extinción de otros caracoles nativos, por otro lado el uso de químicos a base de cobre y otros evitan el desarrollo de microorganismos que son favorables para el ecosistema³⁹.

Impacto económico: La erradicación de estos organismos es costosa por ejemplo en Florida tomó cerca de diez años y tuvo un costo de once millones de dólares. Tiene un impacto negativo en la infraestructura, agricultura ya que el molusco consume grandes cantidades de plantas y cultivos de alto interés comercial, en cuanto a la industria farmacéutica representa un beneficio socio económico ya que ha demostrado tener propiedades antimicrobianas⁴⁵ y anticancerígenas específicamente en el cáncer de mama a partir de estos pueden elaborarse nuevos medicamentos⁴⁶.

Impacto social: Debido a su alta capacidad reproductiva *A. fulica* se acumulan en grandes cantidades, se ven antiestéticos y cuando mueren desprenden un olor fétido y ensucian especialmente cuando son atropellados en las ciudades.

2.2.3.11. Control y prevención de la plaga

Control mecánico, puede ser recolectado manualmente por el hombre en zonas donde son habitadas, es un proceso donde la población se organiza previa capacitación con las autoridades competentes, tomando las medidas de protecciones necesarias, haciendo uso de guantes, mascarilla, como pueden utilizar también, palas, pinzas u otro objetos con la finalidad de no tocar directamente al caracol, se recolectan en grandes cantidades y se colocan en una bolsa plástica con la finalidad de producir ahogamiento, procediendo a su disposición final, transportar los moluscos muertos con las medidas de bioseguridad necesaria para depositarlos en rellenos sanitarios, cubrir con cal, en caso de encontrarse en zonas rurales se recomienda realizar el entierro en el mismo lugar, buscar un área desértica y libres de instalaciones eléctricas subterráneas, cavar una fosa que tenga aproximadamente un abismo de cuatro metros, en el cual se cubre con una capa de cal finalmente, se tapa con la misma tierra y alrededor de dos metros del perímetro, se esparce la cal para evitar que ingresen animales⁴⁴.

En otros países como en Colombia tienen elaborados hornos especiales bajo criterios ambientales establecidos donde se depositan los moluscos muertos para ser incinerados⁴⁸.

Control químico, se hace uso de pesticidas, el más usado es el metaldehído cuyo efecto tóxico produce en las glándulas mucosas del molusco, causa un adelgazamiento excesivo provocando la muerte por deshidratación, para percibir este efecto necesita estar en contacto directo ya sea por ingestión o por medio de absorción de la piel del molusco. Otra opción utilizada por algunos agricultores es sumergir los caracoles en agua con cloruro de sodio (sal) en proporciones de (3:1) respectivamente y es relativamente barata, pero puede generar un efecto negativo al medio

ambiente ya que el agua con sal al ser desechadas pueden alterar las propiedades físico-químicas del suelo⁴⁹.

Control biológico, existen predadores (*Euglandina rosea*, *Platydemus manokwari*, *Gonaxis kibweziensis*) en general estos programas no han controlado al molusco por el contrario han perjudicado la existencia de moluscos nativos por lo tanto no es recomendable⁵⁰.

2.2.3.12. Normatividad

Las especies exóticas invasoras pueden ser animales o vegetales que se encuentran fuera de su rango geográfico natural, que no pertenecen al lugar donde se encuentran han sido transportadas por la humanidad en forma accidental o intencional se adaptan fácilmente logrando mantenerse vivos, reproduciéndose fácilmente y logrando expandirse exitosamente alterando el equilibrio armónico del ecosistema, generando impactos en la salud, económicos, ambientales, considerado como segunda causa de la pérdida de biodiversidad, poniendo en peligro al planeta¹.

Considerando esta situación la Naciones Unidas en coordinación con los países que conforman se firmó un acuerdo. **Convenio sobre la Diversidad Biológica de las Naciones Unidas 1992**. Siendo el primer acuerdo mundial integral que aborda todos los aspectos de la biodiversidad, recursos genéticos, especies y ecosistemas donde hace mención sobre las especies exóticas invasoras⁵¹. Perú considerado como país megadiverso también forma parte de este convenio y lo ratificó con Resolución Legislativa N° 26181 de 30 de abril de 1993. Otro avance importante con **DECRETO SUPREMO N° 102-2001-PCM se aprobó la Estrategia Nacional sobre Diversidad Biológica del Perú**, el estado está comprometido a generar nuevos protocolos para mantener íntegro nuestra biodiversidad en las áreas naturales protegidas, es necesario resaltar la importancia que presenta uno de sus objetivos estratégicos siendo más preciso el N° 3.2 donde hace mención que se tiene que supervisar los organismos invasores y las consecuencias negativas que repercuten en la flora y fauna. Los cuales podrían generar un desequilibrio irreversible en nuestro medio ambiente. Para poder desempeñar sus roles adecuadamente, ante este objetivo se plantean las acciones a realizar,

estas acciones permite identificar a las especies invasoras, promover su erradicación, fortalecer planes de acción, tomar medidas cautelares contra estos organismos nocivos que podrían ingresar mediante las vías aéreas, terrestres y marítimas. Estas medidas deben contar con el apoyo de las instituciones gubernamentales, las cuales deben capacitar a profesionales competentes que ejecuten un método epistemológico en el correcto tratamiento de los organismos invasores⁵².

Bajo este sistema de riesgo, el ministerio de ambiente promulga el **DECRETO SUPREMO N° 009-2014-MINAM** dando luz verde a la **Estrategia de Diversidad Biológica al 2021 y su Plan de acción 2014-2021**. Este programa procurará fortalecer la dinámica y planificación a la hora de hacer frente a las amenazas del medio ambiente priorizando el bienestar de la diversidad biológica⁵³. Otro avance importante se relaciona con los recientemente publicados **Ley Forestal y de Fauna Silvestre N° 29763 y sus reglamentos** donde detalla en la primera sección, Título V. Zonificación y Ordenamiento Forestal donde especifica en los artículos 40 y 41 que ninguna especie exótica de flora y fauna no podrá ingresar al país, sin un previo estudio biológico que dé cuenta su estructura genealógica, lo cual podría generar comportamientos negativos en nuestro ecosistema. Por ende son necesarios los estudios científicos que aprueba SERFOR, tengan el carácter de un juicio objetivo, Con finalidad de evitar la propagación de estos organismos nocivos, SERFOR (Servicio Nacional Forestal y de Fauna silvestre) desarrollan protocolos conjuntamente con las autoridades de los lugares afectados protegiendo el desarrollo de la flora y fauna a nivel nacional⁵⁴.

En Perú la forma de control y prevención de *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822, está a cargo de SENASA, actualmente están tomando medidas de control mecánico y químico (metaldehído) con una mochila de 12 litros se aplica esta sustancia química en 2 a 2 hectáreas y media para eliminar la infestación del caracol africano, del mismo modo en coordinación con las autoridades municipales, se auspician programas de recolección manual, debidamente capacitados, que evitan contraer enfermedades. Estas acciones se desarrollan en las regiones afectadas.

2.2.4. Extractos vegetales o botánicos

2.2.4.1. Definición

Los extractos botánicos contienen uno o más sustancias activas con funciones bioquímicas específicas, que se extraen de las flores, raíces, semillas, hojas, corteza o tallos de plantas a través de métodos fisicoquímicos que sirven para propósitos específicos.⁴

2.2.4.2. Usos

Los extractos botánicos se usan en la industria farmacéutica, numerosas investigaciones a nivel científico demuestran las actividades terapéuticas de los metabolitos secundarios presentes en los extractos, los cuales garantizan la producción de fitofármacos.

En la industria cosmética se hace uso como materia prima de jabones, desodorantes, cremas, maquillajes, limpiadores, etc., asimismo son utilizados para la elaboración de colorantes aromatizantes, saborizantes, condimentos entre otros.

También se usan en la agricultura sustentable, una dificultad a nivel global importante, es proteger los sembradíos de múltiples plagas. En estos últimos tiempos se vienen utilizando plaguicidas sintéticos como una excelente alternativa, para evitar los efectos tóxicos que ponen en peligro al medio ambiente, la salud de los operadores agrícolas, animales y consumidores de alimentos, se presenta como una alternativa los plaguicidas de origen vegetal que son elaborados de las hojas, frutos, semillas que contienen sustancias activas (aceites esenciales, flavonoides, fenoles, alcaloides, taninos, saponinas, glucósidos, ésteres y ácidos grasos) y presentan acción biológica como son insecticida, molusquicida, fungicida, acaricida, nematocida, antialimentario. Las ventajas que nos ofrecen, son específicos, no destruyen organismos naturales beneficiosos y promueven un ambiente seguro por su fácil descomposición y equilibrio en el ecosistema, recientemente se encuentra en el mercado Azatina 3EC y Triact 70 son los nombres comerciales de los bioplaguicidas preparados a base de extractos de *Azadirachta indica* quien ha demostrado tener una buena acogida, siendo reconocidos y recomendados por los productores de cultivos orgánicos en los países industrializados⁵⁵.

2.2.4.3. Métodos de extracción

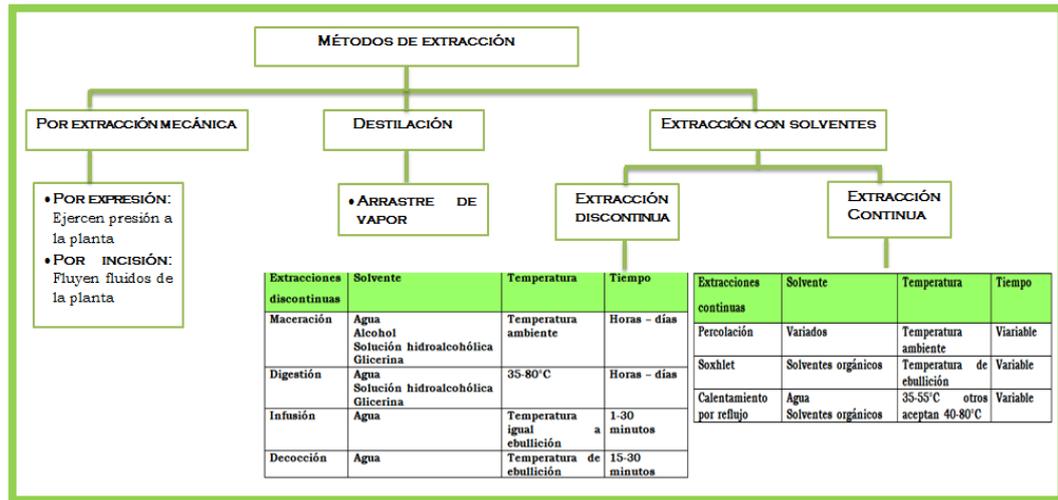


Figura 1. Métodos extractivos

Fuente: Carrión A.y García C. (2010)⁵⁶

2.2.4.3.1. Maceración

Práctica extractiva que consiste en empapar los materiales vegetales en un disolvente (agua, alcohol, mezcla de los anteriores, aceites) dentro de un envase de vidrio tapado herméticamente, dejando reposar a temperatura ambiente, protegidos de la luz, realizando movimientos constantes por un lapso de tiempo variable, esto dependerá del disolvente y de la planta utilizada, el líquido extractivo finalmente se consigue filtrando o por decantación. Las piezas del material vegetal deben de cortarse en trozos pequeños teniendo en cuenta que no deben ser demasiado grandes pues el disolvente no podrá penetrar en las células más internas, tampoco deben ser reducidas a polvo podría perderse ingredientes activos volátiles como son los aceites esenciales del mismo modo presentaría dificultades en el momento de la filtración, una vez culminada el proceso de maceración. Antes de ser procesada la planta debe efectuarse una limpieza adecuada y garantizar que se encuentren libres de materiales extraños. Para la elección del disolvente se debe reconocer la solubilidad de la planta en investigación y el uso deseado de la extracción. El más usado es el alcohol porque extrae mayor cantidad de moléculas activos presentes en la droga. La finalidad de este principio suaviza y rompe la pared celular de la planta para liberar los fitoquímicos solubles que deseamos obtener para diversos fines⁵⁷.

2.2.4.3.2. Reflujo

Método extractivo continuo que favorece conservar la reacción de la temperatura constante (punto de ebullición del disolvente) el tiempo fundamental, evitando la pérdida del menstruo manteniendo el volumen constante en la reacción.

El proceso inicia introduciendo el sólido en líquido también puede ser líquido en líquido en un balón de fondo plano, el cual se une a un condensador y se sujeta en forma vertical (posición de reflujo), donde el agua ingresa por la parte inferior y sale por la parte superior, esta circulación permite que los vapores se condensen y se recupera el disolvente, para mantener la calefacción de la reacción se usa una manta de calentamiento⁵⁸.

2.2.4.5. Concentración del extracto vegetal obtenido en forma líquida

Una vez culminada el proceso extractivo, se procede a separar el disolvente en su totalidad o parcialmente. Un sistema muy práctico en áreas especializadas en experimentación es el uso del rotavapor a una escala inferior de 40°C de temperatura, útil para evaporar soluciones orgánicas e hidroalcohólicas⁵⁸.

2.2.5. Cromatografía en capa fina

Prueba analítica útil para aislar sustancias fitoquímicas no volátiles al ser expuestos en dos fases (fase móvil y estacionaria). La fase estacionaria está constituida por una placa extendida cubierta por una lámina delgada de sílica gel cuya propiedad permite separar mezclas polares, mientras que la alúmina gel permite aislar mezclas apolares, la principal característica de esta fase es la inercia pues no debe provocar ninguna reacción con el analito existente en la muestra. Este medio contiene la muestra aplicada por capilaridad.

El móvil puede estar formado por un solo disolvente o la combinación de dos con distinta polaridad debe de presentar bajo punto de ebullición y viscosidad. Esta propiedad, permite movilizar en forma ascendente el analito sobre la placa cromatográfica permitiendo evidenciar la mancha del compuesto, algunas veces siendo visible a los ojos, en ocasiones son invisibles, en este

caso se exponen a proyecciones de luz ultravioleta en otros casos haciendo uso de un revelador, nos permite observar manchas colorimétricas.

Para cuantificar el recorrido se determina el factor de retención (Rf). Se divide la distancia recorrida de una mancha (muestra o estándar) entre la distancia recorrida del frente del eluyente como se detalla a continuación⁵⁹.

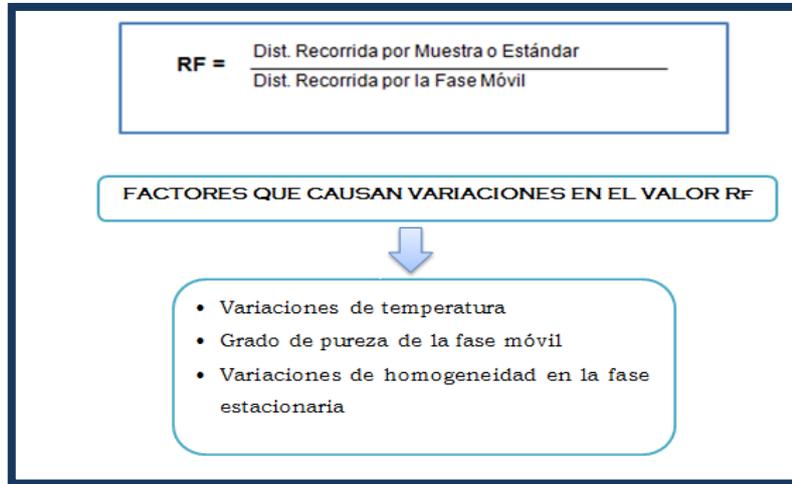


Figura 2. Fórmula para el cálculo del Rf y factores que causan variaciones

Fuente: Sharapin N. (2000)⁵⁹

2.2.6. Métodos para evaluar el efecto molusquicida

2.2.6.1. Pautas que permiten calificar a una planta como molusquicida

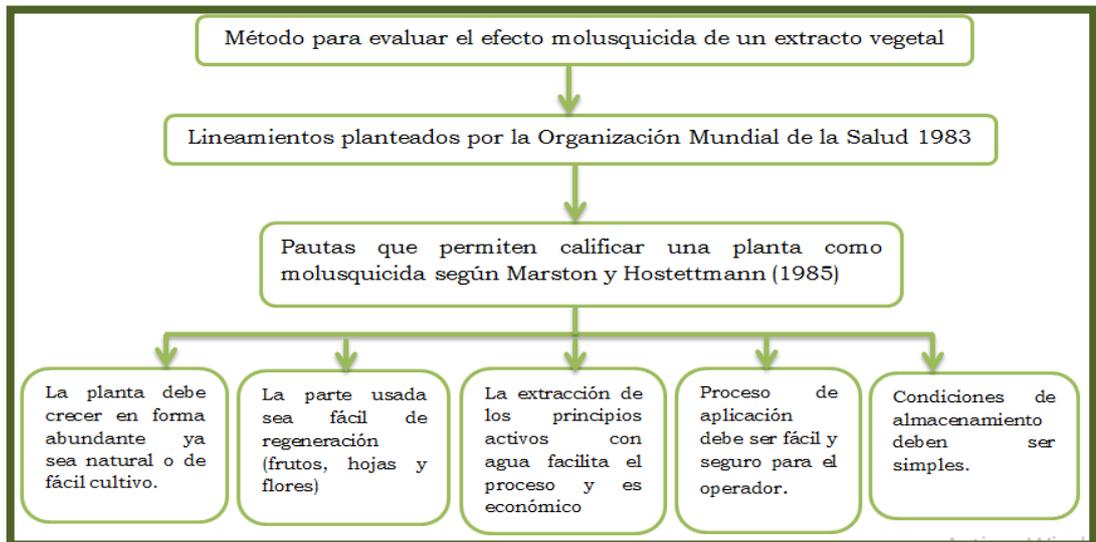


Figura 3. Pautas que califican a una planta con efecto molusquicida

Fuente: Fernández J. y Rojas J. (2014)⁶⁰

2.2.6.2. Protocolos y consideraciones en los ensayos para evaluar el efecto molusquicida

Tabla 7. Protocolos para evaluar el efecto molusquicida

Variedad de moluscos	Se usan caracoles adultos, algunos autores evalúan la actividad en caracoles juveniles.
Origen de los moluscos	Se pueden tomar del campo (lagos, drenajes, etc) o también usar ejemplares de colonias obtenidas en el laboratorio
Permanencia en el laboratorio	Deben ser aclimatados en el laboratorio dos o cuatro días antes de la experimentación
Número de moluscos	Es variable por cada concentración puede ser grupos de dos a diez
El extracto botánico	Para el ensayo se utilizan diferentes rangos de concentración sean extractos o compuestos puros
Molusquicida de referencia	Para el ensayo se usan molusquicidas de origen sintético y algunos protocolos no lo creen conveniente
Alimentación de los caracoles	No se alimentan durante el tiempo de exposición, algunos protocolos suministran alimento
Tiempo de exposición	Es variable, el tiempo de exposición va de 24 horas a un máximo de 96 horas sin embargo existen protocolos donde los moluscos pueden estar en contacto con el extracto hasta cuatro semanas de exposición continua.
Criterios para declarar la muerte de los moluscos	El cese de la actividad cardíaca observado bajo un microscopio, existen protocolos que toman en cuenta la ausencia de la concha, falta de contracción del cuerpo a la concha, falta de sensibilidad al tocarlos con una aguja gruesa, no responden a la presencia de comida, desprenden un olor desagradable.

Fuente: Fernández (2014)⁶⁰

2.3. Hipótesis

2.3.1. Hipótesis general

El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) poseen efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).

2.3.2. Hipótesis específicas

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) tiene metabolitos secundarios que influyen en el efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).
2. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) posee efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).
3. El extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) posee efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).
4. La combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto de *Punica granatum* L. (granada) tiene efecto sinérgico molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).

2.4. Variables

2.4.1. Tabla de operacionalización de variables

TÍTULO	VARIABLE	CATEGORÍA	DIMENSIONES	INDICADOR
EFECTO MOLUSQUICIDA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) Y EXTRACTO ACUOSO DE LA CÁSCARA DEL FRUTO <i>Punica granatum</i> L. (granada) EN <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano)	Variable independiente Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	Cualitativo	Fitoquímica	Compuestos fenólicos Alcaloides Taninos Flavonoides Aminoácidos Compuestos fenólicos Taninos Quinonas Alcaloides Flavonoides
	Variable dependiente Efecto molusquicida	Cuantitativo	Biología	Porcentaje de mortalidad del molusco

2.5. Marco Conceptual

Efecto: Es la manifestación de una acción que se percibe (causa-efecto)⁶¹.

Efecto sinérgico: Cualquier efecto de los productos químicos que actúan juntos administradas de manera simultánea es mayor que la suma de los efectos de cada agente administrado por sí solo, resultando ser beneficioso o perjudicial⁶¹.

Moluscos: Animales invertebrados, de simetría bilateral, con una envoltura blanda llamada manto, que recubre las vísceras y con un exoesqueleto de consistencia calcárea y forma diversa. Comprende los caracoles, las ostras, los mejillones, los pulpos, etc⁶².

Gasterópodo terrestre: Clase de moluscos, caracterizada por la presencia de un pie carnoso y una concha arrollada en espiral. Comprende los caracoles y babosas⁶².

Plaga: Manifestación masiva e inesperada de organismos vivos de una misma especie que causa perjuicio grave a poblaciones humanas, vegetales o animales⁶³.

Plaguicida sintético: Compuestos de cimiento química producidos por inteligencia humana destinados a exterminar cualquier plaga. Engloba estos términos herbicida, insecticida, nematocida, molusquicida, piscicida, avicida, raticida, bactericida, repelente de insectos⁶³.

Molusquicida: Plaguicida utilizados para extinguir moluscos (babosas y caracoles)⁶².

Biocida: Hecho de seres vivos (microorganismos, plantas y minerales) presentes en la naturaleza siendo característicos contra plagas objetivos y presentan menos riesgos que los químicos convencionales⁴.

Parásito: Dícese del organismo que se alimenta de las sustancias elaboradas por otro llamado huésped, con el que está estrechamente asociado y al que puede ocasionar graves daños de carácter toxico, mecánico o traumatismo⁶².

Nemátodos: Comprende gusanos de forma cilíndrica, no segmentado por lo general aguzados en ambos extremos y desprovistos de cilios, la boca situada en la extremidad anterior, puede estar provista de papilas, dientes, ganchos, estiletes perforantes, laminas cortantes, etc. según sea el tipo de alimentación, carecen de aparato circulatorio y respiratorio. Son animales comúnmente unisexuales, provistos de una o dos gónadas en comunicación con los conductos reproductores. Numerosas especies son parásitos de tejidos o líquidos orgánicos de plantas y animales y algunas ocasionan graves enfermedades humanas⁶².

Angiostrongylus cantonensis: Gusano nematelminto, se halla en las arterias pulmonares de la rata. En forma larval es neurotrópica provocando

meningoencefalitis eosinofílica en el ser humano al consumir moluscos terrestres y acuáticos en forma cruda⁶².

Meningitis eosinofílica: Inflamación de las meninges por invasión del gusano pulmonar de la rata, *Angiostrongylus. cantonensis* al sistema nervioso central. El criterio clave para definir esta enfermedad es la presencia de diez o más eosinófilos por microlitro en líquido cefalorraquídeo, los síntomas que se manifiestan son dolor abdominal, náuseas, vómito, fiebre, debilidad del sistema nervioso central, rigidez del cuello, dolor de cabeza intenso, parestesias provocado en muchos casos la gravedad del caso presentando insuficiencia respiratoria, atrofia muscular conduciendo a la muerte, si la persona afectada logra la mejoría puede quedar con secuelas irreversibles, el daño ocasionado es variable pues depende de la ubicación de la infección⁶⁴.

***Angiostrongylus costaricensis*:** Nematodo, se encuentra en las arterias y arteriolas del área ileocecal de la rata algodonera (huésped definitivo), depositan sus huevos y son transportados por la sangre a la pared intestinal donde eclosionan la primera etapa larval y son eliminados por las heces, los cuales son consumidos por los caracoles o babosas (huésped intermediario). En el molusco se producen dos mudas encontrándose en la tercera etapa (larva infectante). El roedor se infecta al consumir los moluscos infectados, la contaminación es por ingerir moluscos contaminados en los humanos (hospedero incidental) por consiguiente no logran completar su ciclo de vida y no pueden ser expulsados en las heces los estadios inmaduros, los huevecillos se alojan en las arterias y arteriolas alrededor del ileoceco, provocan un respuesta inflamatoria, que resulta en vasos ocluidos una vasculitis acompañante y una masa eosinofílica granulomatosa edematosa⁶².

Angiostrongiliasis abdominal: Parasitosis originada por la inserción y desarrollo de *Angiostrongylus. costaricensis* en el ciego y el colon adyacente que determina la patología abdominal, intestinal con posible afectación al apéndice, hígado, ganglios linfáticos regionales de las arterias mesentéricas manifestándose con dolor abdominal severo, anorexia, náuseas, vómitos y

fiebre, a la palpación presenta rigidez abdominal, intensificación del dolor y una masa semejante a un tumor⁶⁴.

Especie Exótica Invasora: Espécimen transportado por la raza humana en forma voluntaria con fines de satisfacción y lucro por otro lado de forma involuntaria llevados en medios de transporte y ubicados en territorios fuera de su naturaleza con las mismas condiciones climáticas de su hábitat se establecen y expanden satisfactoriamente y la ausencia de un depredador, se convierten en una amenaza y rompen el equilibrio del ecosistema, producen graves consecuencias en la economía, ambiente y trae consigo nuevas enfermedades que afecta al hombre¹.

Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza: Fue fundada en 1948, considerada la organización medioambiental global más grande, antigua y diversa del mundo. Es una unión de miembros, compuestas por estados soberanos, agencias gubernamentales pequeñas y grandes organizaciones de la sociedad civil, agencias de desarrollo económico, instituciones académicas y científicas, así como asociaciones empresariales. Su fin es preservar la estabilidad del ecosistema y un desarrollo sustentable⁶⁵.

MINAGRI: Ministerio de Agricultura y Riego, entidad nacional a través de protocolos y normas es responsable de monitorizar y potenciar el desarrollo de la comunidad agraria⁶⁶.

SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria): Institución pública dependiente del MINAGRI ubicadas en diferentes localidades agropecuarias tienen el compromiso de vigilar y controlar el ingreso de nuevas plagas y enfermedades que no son propias del país en plantaciones y animales, del mismo modo está encargado de calificar y emitir certificación sanitaria de productos vegetales y animales para luego ser comercializadas⁶⁶.

Ecosistema: Viene del griego iokos, que significa casa o lugar donde se vive y sistema que se refiere a un grupo organizado de diversos componentes que interactúan unos con otros por ello cuando hablamos de ecosistema nos

estamos refiriendo a la red de interacciones que se establecen entre los seres vivos o bióticos y los factores ambientales abióticos (agua, aire y suelo), interacciones que hacen posible la vida en un lugar⁶⁷.

Diversidad biológica: Cantidad total y abundante de diferentes grupos de organismos de flora, fauna, otras formas de vida existentes, en todo espacio geográfico e incluso cada individuo con sus características únicas, así como su herencia, legado genético y su ecosistema interactúan entre sí con el medio que los rodea permitiendo la existencia de vida próspera en el planeta⁶⁷.

Huésped intermediario: Aquel que aloja a las formas inmaduras o asexuales del parásito⁶⁴.

Metaldehído: Es un compuesto químico tetrámero cíclico de acetaldehído que puede encontrarse en forma de polvo o cristal blanco o incoloro. Forma parte de los molusquicidas, está destinado al control de caracoles y babosas, se presenta en forma líquida, polvo, gránulos o cebos en una concentración de 4 a 10 por ciento. Se cree que la acción tóxica del metaldehído en caracoles y babosas se debe a que provoca deshidratación y parálisis⁶⁸.

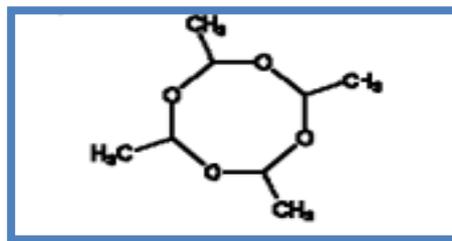


Figura 4. Estructura química del metaldehído (2, 4, 6, 8 – tetrametil - 1, 3, 5, 7 - tetroxano)

Fuente: Nina Den Holder (2016)⁶⁸

Metabolitos Secundarios: Compuestos almacenados en las vacuolas de las células vegetales, creados por reacción química natural y bioenzimática a partir de los metabolitos primarios y no son indispensables para el funcionamiento de las plantas pero intervienen en la relación con el medio que los rodea⁶⁹.

Terpenos: Son polímeros de isopreno (2-metil-1,3-butadieno), su estructura química puede estar formada por cadenas cerradas o abiertas, se metabolizan a partir del precursor isopentil pirofosfato por dos rutas (ruta del ácido mevalónico y ruta del fosfato de metileritriol) pertenecen al grupo de los lípidos insaponificables, son hidrófobos. Esencia vegetal volátil que desprende un olor fuerte característico y propio que le permite proteger a las plantas de su entorno (insectos, animales herbívoros)⁴.

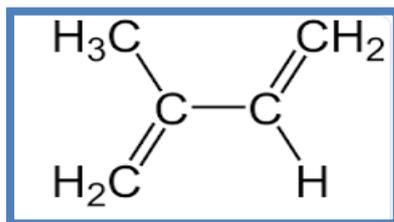


Figura 5. Molécula de isopreno (2-metil-1,3-butadieno)

Fuente: Nava et al (2014)⁴

Compuestos fenólicos: Son metabolitos secundarios, químicamente está formado por un hidrobenceno unidas a uno o varios anillos aromáticos o cadenas de carbonos e hidrógenos. biológicamente son sintetizados a partir de dos rutas, la vía del ácido shikímico (fenoles simples, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas y lignanos), por la vía del acetato (quinonas y xantonas), distinguido por la presencia de uno o más grupos hidroxilos en el anillo fenólico, esta situación confiere actividad tóxica lo que significa a mayor número de hidroxilos presentes produce mayor inhibición enzimática o reacción de oxidación, dilatada abundantemente en la naturaleza (frutos y verduras)⁷⁰.

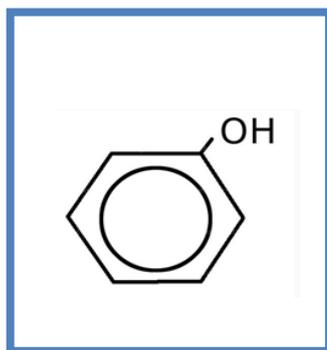
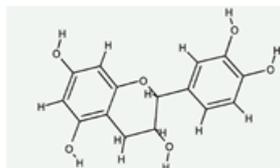
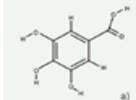
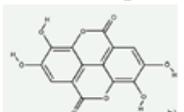


Figura 6. Estructura básica de los compuestos fenólicos (hidroxibenceno)

Fuente: Gimeno E. (2004)⁷⁰

Taninos: Son compuestos polifenólicos que poseen propiedades astringentes (capacidad para secar las mucosas y/o precipitar las proteínas) y antiinflamatorias, por su sabor áspero y amargo actúan como barrera de protección, presentes en los extractos vegetales son capaces de unirse a la piel (proteínas de la piel) reaccionan con las glicoproteínas de la saliva de manera que pierden sus propiedades lubricantes (mucinas) y su actividad enzimática (entre ellas enzima como α -amilasa) ⁷¹.

Tabla 8. Clasificación de los taninos

CLASIFICACIÓN DE TANINOS	PROPIEDADES QUÍMICAS	ESTRUCTURA QUÍMICA	FUNCIONES
TANINOS HIDROLIZABLES	<ul style="list-style-type: none"> Derivadas de unidades de flavan-3-ol unidas conocidas como proantocianidinas Unidas entre sí por enlaces C-C en la posición 4-8 y 4-6 Entre estos se encuentra el ácido tánico y la procianidina B1 Dan coloración verde con FeCl_3 Precipitan con soluciones de bromo 	 <p>Flavan-3-ol. Monómero estructural del que derivan los taninos hidrolizables</p>	<ul style="list-style-type: none"> Son toxinas inhiben significativamente el crecimiento de los herbívoros. Forman complejos al unirse con las proteínas inactivando las enzimas digestivas de los herbívoros. Imprescindibles en la formación de sustancias vegetales como aceites esenciales, resinas, lignina, etc. Contribuyen a la formación de súber.
TANINOS CONDENSADOS	<ul style="list-style-type: none"> Constan de poliésteres de un azúcar unido a un número variable de ácidos fenólicos, de los cuales se dividen en taninos gálicos y elágicos Los núcleos bencénicos están unidos por medio de átomos de oxígeno Dan coloración azul con FeCl_3 No precipitan con el bromo 	 <p>Ácido gálico</p>  <p>Acido egálico</p>	

Fuente: Álvarez C. y Lock O. (1992)⁷¹

Flavonoides: Son moléculas orgánicas pequeñas obtenidos por la ruta metabólica de los flavonoides a partir de las moléculas de fenilalanina y malonil-CoA por acción de una enzima isomerasa se forma su estructura base, un esqueleto (C6-C3-C6) comprende dos anillos aromáticos polihidroxilados (A y B), unidos por tres átomos de carbono algunas forman un anillo pirano (C). El grado de insaturación del anillo (C) determina las distintas familias de compuestos englobados dentro de este grupo distinguiéndose los flavonoles y antocianina y en menor proporción los dihidroflavonoles y flavonas. En la planta actúa como barrera de defensa ante el herbivorismo produciendo sabor amargo y desagradable⁷⁰.

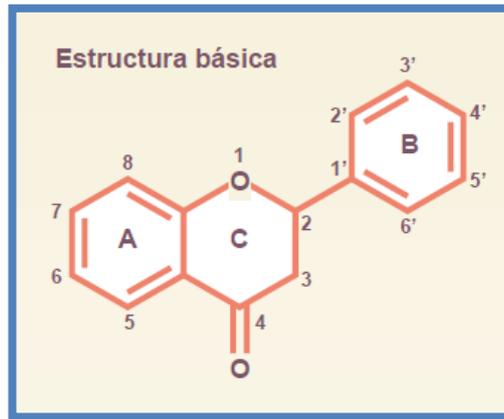


Figura 7. Estructura básica de los flavonoides

Fuente: Gimeno E. (2004)⁷⁰

Alcaloides: compuestos heterocíclicos y nitrogenados de naturaleza alcalina formados de aminoácidos solos o combinado con terpenoide, biosintetizados por dos rutas (ácido shikímico y policétidos), de gusto amargo con actividad incluso a dosis muy bajas. Actúan como metabolitos secundarios de plantas que han sido sintetizados, tienen una gran variedad de efectos tóxicos, se ha considerado que tienen la propiedad de defensa contra parásitos e insectos, bloqueando neuroreceptores de vertebrados e insectos⁴.

Concentración Letal Media CL₅₀: Es la concentración, obtenida por estadística, de un sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia. El valor de CL₅₀ se expresa en (mg/L, ppm, %)⁶¹.

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1. Tipo de Estudio

3.1.1. Según el nivel de conocimiento

La investigación realizada es de tipo experimental porque hubo manipulación de variables independientes (extractos hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. “granada”) posteriormente para observar el efecto molusquicida y comparar los efectos producidos con el grupo control positivo y grupo control negativo.

3.1.3. Según su ubicación temporal

Es longitudinal debido a que la recolección de los datos se realizó de acuerdo a la ocurrencia de los hechos, en diferentes tiempos, después de aplicar el extracto para observar en las muestras correspondientes (caracoles africanos juveniles).

El estudio de enfoque cuantitativo permite cuantificar el porcentaje de mortalidad de los caracoles africanos para evaluar el efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano), el cual brindará mayor validez y confiabilidad para poder aceptar o rechazar la hipótesis.

3.2. Diseño del estudio

El diseño epistemológico que aborda esta investigación es experimental en la cual el objetivo es determinar el efecto molusquicida en caracoles africanos por acción de los extractos en estudio, para lo cual se ha desarrollado una metodología a seguir y nos permitirá la recolección de datos.

3.3. Población y muestra de investigación

3.3.1. Población

Especie de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) ubicadas en el distrito de Tapo (latitud: S11°25'46.42", longitud: O75°31'42.31"), provincia Tarma y Departamento Junín, a una altura de 3140 msnm, su recolección se realizó en horas de la tarde y fueron transportadas en bolsas de papel.

Especie de *Punica granatum* L. (granada) ubicadas en provincia de Cañete (latitud: S13°04'42", longitud: O76°23'02"), departamento Lima, ubicada a una altura de 40 msnm, su recolección se realizó en horas de la tarde y fueron transportadas en bolsas de papel.

3.3.2. Muestra

Para la elaboración del extracto hidroalcohólico se utilizó 1700 g de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) siendo seleccionadas por sus características en buenas condiciones.

Para la elaboración del extracto acuoso se utilizó 3452 g de cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) siendo seleccionadas por sus características en buenas condiciones.

Ambas muestras de las especies fueron llevadas al Herbario del Museo de Historia Natural (UNMSM) para su identificación y clasificación taxonómica.

3.3.3. Material biológico

Población de *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracoles africanos juveniles) del anexo Pampa Silva, distrito Perené, Departamento Junín.

3.3.4. Muestra

Como la población de caracoles africanos juveniles en Pampa Silva es infinita, se desconoce el número de la población, se utiliza la siguiente fórmula.

$$n = \frac{z^2 x p x q}{d^2}$$

Dónde:
 Z= nivel de confianza
 p= probabilidad de éxito o proporción esperada
 q= probabilidad de fracaso
 d = decisión (error máximo admisible en términos de proporción) ⁷²

Figura 8. Fórmula para hallar la muestra de una población infinita

Fuente: Aguilar S. (2005)⁷²

Reemplazando los valores

$$Z = 1.96$$

$$p = 0.897$$

$$q = 0.103$$

$$d = 0.05$$

Calculamos:

$$n = \frac{1.96^2 x 0.897 x 0.103}{0.05^2}$$

$$n = 141.9 \cong 142$$

El número de muestra de caracoles africanos juveniles, *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 para la presente investigación fue 142 especímenes de los cuales 140 se utilizaron para la parte experimental y dos caracoles africanos para comprobar su identificación.

Tabla 9. Distribución del material biológico

Ítem	Grupos Experimentales	Concentración	N° de Caracoles
1	Grupo del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán)	100%	10
		50%	10
		25%	10
		12.5%	10
2	Grupo del extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	100%	10
		50%	10
		25%	10
		12.5%	10
3	Grupo de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	100%	10
		50%	10
		25%	10
		12.5%	10
4	Grupo control positivo (metaldehído)	5%	10
5	Grupo control negativo (agua destilada)		10
		TOTAL	140

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Para la recolección de datos se elaboró fichas Ad Hoc por el investigador y validado por el docente especializado de la Universidad Inca Garcilaso.

3.4.1. Instrumentos

3.4.1.1. Equipos

- Balanza analítica para el pesado de las muestra vegetales
- Estufa para el secado de las muestras respectivas
- Rotavapor para la destilación del alcohol del extracto hidroalcohólico de arrayán.
- Plancha de calentamiento para el proceso de extracción continua.
- Luz Uv 254-365 nm para visualizar las manchas de la CCF
- Balanza digital electrónica (CI-21813) con capacidad máxima de 2000 g calibrada en ADVANCED METROLOGY S.A.C. (ver anexo 5), para tomar el peso de los caracoles africanos juveniles.
- Termohigrómetro (CI-21827) calibrada en ADVANCE METROLOGY S.A.C. (ver anexo 7), para medir la temperatura y la humedad relativa del ambiente donde se desarrolló la prueba del efecto molusquicida en los caracoles africanos.

3.4.1.2. Materiales de Laboratorio

Frascos de vidrio 3 L, matraz erlenmeyer, matraz de kitazato, embudo de vidrio, balón de fondo plano, refrigerante, embudo de buchner, adaptador de goma o de caucho, varilla de vidrio, vaso de precipitación, tubos de ensayo, soporte universal, pera de bromo 250 mL, gradilla, frascos de vidrio, jeringa μ l, propipeta, probeta graduada, placa petri grande, pinza metálica, papel filtro circular, papel whatman N° 40, papel kraft, guantes, mascarilla, lentes de seguridad, estándar de cafeína y quercetina.

3.4.1.3. Reactivos y solventes

Tabla 10. Reactivos para identificar los metabolitos secundarios

Mayer	Alcaloides
Wagner	
Dragendorff	
Scheibler	
Sonneschein	
Reineckato	
Shinoda	Flavonoides
Cloruro férrico 5%	Compuestos fenólicos
Gelatina 1%	Taninos
Reacción de Bortranger	Quinonas
Ninhidrina	Aminoácidos

Tabla 11. Solventes utilizados en la parte experimental

SOLVENTES PARA LA MARCHA DE SOLUBILIDAD	Agua destilada
	Alcohol 96 °
	Metanol
	Etanol
	Cloroformo
FASE MÓVIL PARA LA PRUEBA DE CCF - FLAVONOIDES	Isopropanol
	Metanol y agua (25:75)
FASE MÓVIL PARA LA PRUEBA CCF -DE ALCALOIDES	BAW (Butanol-Agua-Ácido acético glacial) 20:15:5

3.4.2. Procedimiento experimental

Parte experimental del presente trabajo se desarrolló en dos etapas la primera etapa se desarrolló en el laboratorio de control de calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

La segunda etapa se realizó en el departamento de Junín, provincia Chanchamayo, distrito Perené, anexo Santa Ana – Carretera Marginal Km 9 – Vista Alegre.

3.4.2.1. Técnicas de recolección de datos 1 (primera etapa)

- Elaboración de los extractos botánicos
- Identificación de los metabolitos secundarios
- Análisis cromatografía en capa fina

3.4.2.2. Descripción del instrumento 1

A. Elaboración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada).

Para llevar a cabo esta parte experimental se tuvieron en cuenta la metodología de Olga Lock (Bases de la Fitoquímica).

- **Recolección**

La recolección de las hojas de arrayán fueron llevadas a cabo en el distrito de Tapo, provincia Tarma, departamento Junín a una altura de 3140 msnm, el 25 de febrero del 2018.

La recolección del fruto granada tuvo lugar en Cañete, departamento de Lima a una altura de 40 msnm, el 3 de marzo del 2018.

- **Selección de la parte vegetal**

Se seleccionaron aquellas hojas que se encuentran en buen estado, color, forma, se retiraron cuerpos extraños no aptos para el estudio asegurándose que las hojas se encuentren en óptimas condiciones para ser empacadas en las bolsas de papel kraft.

Para seleccionar el fruto se toma en cuenta la madurez fisiológica. En este estado se encuentra mayor cantidad de principios activos en la cáscara del fruto asegurándose del buen estado, color y forma.

- **Identificación y clasificación sistemática**

Se colectaron muestras completas de la planta (tallos, hojas, flores y fruto) de ambas plantas y fueron llevadas al Museo de Historia Natural de la Universidad Decana de América para ser identificadas y clasificadas de acuerdo a su taxonomía respectivamente. (Ver Anexo 2 y 3).

- **Disecación y estabilización**

Las hojas de arrayán una vez seleccionadas y limpiadas fueron empaquetadas en bolsas de papel kraft y se expusieron al proceso de secado, de forma natural en el ambiente por tres días, acto seguido fue llevado a 40°C.

Los frutos de granada una vez seleccionadas y limpiadas, las cáscaras fueron retiradas manualmente con la ayuda de un objeto punzo cortante, fueron fraccionadas en pequeños trozos, para quitar la humedad naturalmente por nueve días en el ambiente, posteriormente sometido a una temperatura de 40°C.

- **Maceración de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán)**

Una vez realizado el proceso de secado, se pesaron las hojas secas, obteniendo 592.1 g. las cuales se distribuyeron en tres frascos de vidrio respectivamente y se agregó una mezcla de alcohol-agua (70:30). Se dejó macerar por una semana a temperatura ambiente con agitación constante y protegido de la luz para no alterar los metabolitos. Después del tiempo transcurrido el extracto hidroalcohólico de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) se filtró con papel whatman N° 40 y se obtuvo un extracto purificado de muestra líquida, para eliminar el solvente (alcohol) se usó un rotavapor y se obtuvo 2700 mL del extracto, se guardó a temperatura de 2 a 8 °C hasta el momento de su utilización.

- **Extracción acuosa por reflujo de la cáscara del fruto de *Punica granatum* L. (granada)**

Concluido el proceso de secado se obtuvo un peso total de 1219 g de cáscara del fruto granada, se colocó en un balón de fondo plano para ser llevado a una plancha de calentamiento a una temperatura de 40°C, por 24 horas utilizando la técnica extracción por reflujo, se filtró utilizando la técnica de filtración al vacío, para obtener un extracto purificado, se obtuvo 2200 mL de extracto acuoso, se guardó a temperatura de 2 a 8 °C hasta el momento de su utilización

- **Prueba de solubilidad**

Para este procedimiento se hace uso una fracción de melcocha de arrayán y granada con la ayuda de un bagueta y se agregó 3 mL de los solventes tal como se indica a continuación

- Tubo con muestra + metanol
- Tubo con muestra + etanol
- Tubo con muestra + agua
- Tubo con muestra + alcohol
- Tubo con muestra + isopropanol

B. Identificación de los metabolitos secundarios

- **Tamizaje fitoquímico**

Para la identificación cualitativa de los analitos presentes en los extractos de arrayán y granada, se usó la técnica o prueba de coloración y/o precipitación utilizando reactivos como se detalla en la tabla.

Tabla 12. Parte experimental del tamizaje fitoquímico

METABOLITO SECUNDARIO	EXTRACTO DE ARRAYÁN Y GRANADA	REACTIVOS
Alcaloides	3 mL Solución acidulada del extracto	Mayer (3 gotas)
	3 mL Solución acidulada del extracto	Wagner (3 gotas)
	3 mL Solución acidulada del extracto	Drangendorff (3 gotas)
	3 mL Solución acidulada del extracto	Scheibler (3 gotas)
	3 mL Solución acidulada del extracto	Sonneschein (3 gotas)
	3 mL Solución acidulada del extracto	Reineckato (3 gotas)
Flavonoides	3 mL Solución del extracto	Shinoda (limaduras de magnesio + HCl concentrado)
Compuestos fenólicos	3 mL Solución del extracto	FeCl ₃ 3 (gotas)
Taninos	3 mL Solución del extracto	Gelatina 1% (gelatina + cloruro de sodio) 3 gotas
Quinonas	3 mL Solución del extracto	Hidróxido de sodio 5% (3 gotas)
Aminoácidos	3 mL Solución del extracto	Ninhidrina (3 gotas)+ calor

C. Análisis cromatografía en capa fina

Tabla 13. Método de cromatografía en capa fina para separar alcaloides

MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	REVELADOR
5 µL de extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán)	Placa cromatográfica de la marca Merck (TLC silica gel F ₂₅₄)	Butanol/ agua/Ácido acético glacial (20:15:5)	<ul style="list-style-type: none"> Luz UV 254 nm Ácido sulfúrico 2% después Dragendorff
5 µL de extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	Placa cromatográfica de la marca Merck (TLC silica gel F ₂₅₄)	Butanol/ agua/Ácido acético glacial (20:15:5)	<ul style="list-style-type: none"> Luz UV 254 nm Ácido sulfúrico 2% después Dragendorff
Estándar: Cafeína 10 mg/mL			
RF: Distancia recorrida por M/P o Estándar/Distancia recorrida por la fase móvil			

Tabla 14. Método de cromatografía en capa fina para separar flavonoides

MUESTRA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	REVELADOR
5 µL de extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán)	Placa cromatográfica de la marca Merck (TLC silica gel _{F254})	Metanol/ agua (25:75)	<ul style="list-style-type: none"> • Luz UV 254 nm • Tricloruro de Aluminio
5 µL de extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	Placa cromatográfica de la marca Merck (TLC silica gel _{F254})	Metanol/ agua (25:75)	<ul style="list-style-type: none"> • Luz UV 254 nm • Tricloruro de Aluminio
Estándar: Quercetina 10 mg/mL			
RF: Distancia recorrida por M/P o Estándar/ Distancia recorrida por la fase móvil			

3.4.2.3. Técnica de recolección de datos 2 (segunda etapa)

Para determinar el efecto molusquicida de los extractos en estudio se tomó en cuenta los protocolos formulados por la OMS (Organización Mundial de la Salud) 1965 y 1983 adaptadas a nuestra realidad. La metodología experimental se desarrolla y explica con detalle a continuación.

- Preparación de los extractos en diferentes concentraciones.
- Recolección e Identificación del caracol africano.
- Ensayo para evaluar el efecto molusquicida

3.5.2.4. Descripción del instrumento 2

A. Preparación de los extractos en diferentes concentraciones

Para determinar el efecto molusquicida, los extractos fueron preparados a diferentes concentraciones (100, 50, 25 y 12.5 %), la solución resultante de cada concentración respectiva se guardó bajo refrigeración a una temperatura de 4 a 8 °C en frascos de vidrio herméticamente cerrado hasta su respectiva utilización, estos procedimientos se detallan en las tabla a continuación.

Para hallar las concentraciones de la formulación de los extractos se utilizó la fórmula siguiente:

$$\frac{C1. V1 + C2. V2}{V1 + V2}$$

Tabla 15. Formulación de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán)

Volumen del extracto del arrayán	Volumen del agua destilada	Volumen final	Concentración
600 mL	0 mL	600 mL	100%
300 mL	300 mL	600 mL	50%
150 mL	450 mL	600 mL	25%
75 mL	525 mL	600 mL	12.5%

Tabla 16. Formulación de las concentraciones del extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada)

Volumen del extracto de la granada	Volumen del agua destilada	Volumen final	Concentración
600 mL	0 mL	600 mL	100%
300 mL	300 mL	600 mL	50%
150 mL	450 mL	600 mL	25%
75 mL	525 mL	600 mL	12.5%

Tabla 17. Formulación de las concentraciones de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada)

Volumen del extracto del arrayán	Volumen del extracto de la granada	Volumen del agua destilada	Volumen final	Concentración
300 mL	300 mL	0 mL	600 mL	100%
150 mL	150 mL	150 mL	600 mL	50%
75 mL	75 mL	450 mL	600 mL	25%
37.5 mL	37.5 mL	525 mL	600 mL	12.5%

B. Recolección e identificación de *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano)

Se recolectaron en una zona de plantaciones de plátanos cerca a las orillas del río Perené, llamado la Primera Meseta del Remolino del anexo de Pampa Silva. La captura de los especímenes se efectuó por medio de pinzas largas de metal y se colocaron en un envase de plástico de boca ancha, posteriormente se realizó una limpieza con agua destilada para eliminar restos del cuerpo del caracol para facilitar la absorción de los extractos y se trasladaron a un acuario en condiciones de hábitat del espécimen.

Para su identificación se seleccionó dos muestras de caracoles y fueron llevados al Laboratorio Malacología y Fauna Dulceacuícola del Museo de Historia Natural UNMS. (Ver anexo 4).

C. Ensayo para Evaluar el Efecto Molusquicida

Mantenimiento de caracoles en el lugar de experimentación. El procedimiento se realizó en un ambiente de 30 m² a temperatura de 27 °C y humedad relativa de 71%, los especímenes usados (caracoles africanos juveniles), un total de 140, se dividieron en cinco grupos experimentales de los cuales tres grupos experimentales se subdividieron en cuatro

grupos, cada grupo conformado de 10 caracoles africanos y distribuidos en 14 acuarios de 40 cm x 40 cm x 40 cm, con una buena iluminación y ventilación, en la parte superior del acuario se colocaron mosqueteros y al fondo se llenó con tierra de la localidad del mismo hábitat de los especímenes, con una altura de 5 cm aproximadamente, fueron observados por 2 días posteriores a la colecta como medida de cuarentena y para ser aclimatados al área de experimentación. Durante el proceso experimental los especímenes no fueron alimentados.

Para evaluar el efecto molusquicida se aplicó por aspersion 1 mL de cada solución con sus concentraciones respectivamente, con intervalos de aplicación de tres horas por 24, 48, y 72 H. Registrando el peso inicial de los caracoles africanos antes de iniciar la experimentación y el peso final después de las 72 horas concluido el procedimiento para calcular la pérdida del fluido corporal del caracol africano.

Para determinar la mortalidad de los caracoles africanos se consideró la ausencia del movimiento del cuerpo dentro de la concha, pérdida de la secreción propia del molusco, falta de sensibilidad al tocarlos con una pinza, una vez ya identificados como muertos los moluscos fueron retirados inmediatamente del acuario para evitar una posible contaminación con el resto de los moluscos.

Para una mejor comprensión, una explicación en detalle presentada en la siguiente página.

Tabla 18. Descripción experimental del ensayo para evaluar el efecto molusquicida

GRUPO EXPERIMENTAL	MOLUSCOS	[%].	P.P.I.	CANTIDAD	HORARIO DE ASPERSIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	P.P.F
Control negativo (agua destilada)	10		39.54 g	1 mL	7:00 a.m., 10:00 a.m., 1:00 p.m., 4:00 p.m., 7:00 p.m., 10:00 p.m.	24 H, 48 H, 72 H	39.54 g
Control positivo (metaldehído)	10	5%	36.52 g	1 mL	7:15 a.m., 10:15 a.m., 1:15 a.m., 4:15 p.m., 7:15 p.m., 10:15 p.m.	24 H, 48 H, 72 H	24.33 g
Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán)	10	100%	30.49 g	1 mL	7:33 a.m., 10:32 a.m., 1:33 p.m., 4:33 p.m., 7:33 p.m., 10:34 p.m.	24 H, 48 H, 72 H	24.79 g
	10	50%	27.79 g	1 mL	7:48 a.m., 10:48 a.m., 1:48 p.m., 4:48 p.m., 7: 48 p.m., 10:48 p.m.	24 H, 48 H, 72 H	23.35 g
	10	25%	28.68 g	1 mL	8:03 a.m., 11:03 a.m., 2:03 p.m., 5:03 p.m., 8:03 p.m., 11:03 p.m.	24 H, 48 H, 72 H	24.20 g
	10	12.5%	23.97 g	1 mL	8:15 a.m., 11:15 a.m., 2:15 p.m., 5:15 p.m., 8:15 p.m., 11:15 p.m.	24 H, 48H, 72 H	20.26 g
Extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	10	100%	22.71 g	1 mL	8:33 a.m., 11:32 a.m., 2:33 p.m., 5:33 p.m., 8:33 p.m., 11:33 p.m.	24 H, 48H, 72 H	14.51 g
	10	50%	29.97 g	1 mL	8:48 a.m., 11:48 a.m., 2:48 p.m., 5:48 p.m., 8:48 p.m., 11:48 p.m.	24 H, 48H, 72 H	26.17 g
	10	25%	36.69 g	1 mL	9:03 a.m., 12:03 p.m., 3:03 p.m., 6:03 p.m., 9:03 p.m., 12:03 a.m.	24 H, 48H, 72 H	32.10 g
	10	12.5%	42.20 g	1 mL	9:18 a.m., 12:18 p.m., 3:18 p.m., 6:18 p.m., 9:18 p.m., 12: 18 a.m.	24 H, 48H, 72 H	37.36 g
Combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	10	100%	36.52 g	1 mL	9:28 a.m., 12:28 p.m., 3:28 p.m., 6:28 p.m., 9:28 p.m., 12:28 a.m.	24 H, 48H, 72 H	25.61 g
	10	50%	27.70 g	1 mL	9:35 a.m., 12:36 p.m., 3:36 p.m., 6:35 p.m., 9:35 p.m., 12:35 a.m.	24 H, 48H, 72 H	20.55 g
	10	25%	37.56 g	1 mL	9:45 a.m., 12:45 p.m., 3:45 p.m., 6:45 p.m., 9:45 p.m., 12:45 a.m.	24 H, 48H, 72 H	30.12 g
	10	12.5%	31.21 g	1 mL	9:55 a.m., 12:55 p.m., 3:55 p.m., 6:55 p.m., 9:55 p.m., 12:55 a.m.	24 H, 48H, 72 H	25.12 g

Leyenda:

[%]: Concentración del extracto en %, **P.P.I.:** promedio del peso inicial de los moluscos, **P.P.F.:** promedio del peso final de los moluscos

3.4.3. Validación de instrumentos

La validación de instrumentos fue realizada por el asesor designado por esta institución, capacitado en el área de investigación. (Ver anexo 10).

3.5. Procesamiento de datos

El procesamiento y análisis de datos se efectuó en el programa de Microsoft Excel, asimismo se procedió a codificar y generar una base de datos haciendo uso del Software Estadístico SPSS versión 24 para Windows 10 con el fin que tenga consistencia la información.

Para contrastar la hipótesis se usó Análisis de Varianza (ANOVA) un factor que permite comprobar la variación que existe entre los grupos y dentro de los grupos.

CAPÍTULO IV PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Resultados de la primera etapa

A. De la prueba de solubilidad

Tabla 19. Resultados de la prueba de solubilidad del extracto seco de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto seco de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada)

Muestra del extracto seco	Cloroformo	Isopropanol	Alcohol 96°	Etanol	Metanol	Agua destilada
<i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán)	(-)	(+++)	(++)	(+++)	(++)	(+)
<i>Punica granatum</i> L. (granada)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+++)

Leyenda

- (-) No soluble
- (+) Poco Soluble
- (++) Soluble
- (+++) Muy soluble

En la prueba de solubilidad, la muestra uno, resultó ser muy soluble en isopropanol y etanol.

En la prueba de solubilidad, de la muestra dos, resultó ser muy soluble en agua destilada.

B. Del tamizaje fitoquímico

Tabla 20. Identificación de los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto de *Punica granatum* L. (Granada)

Metabolitos secundarios	Reactivo de identificación	Resultado para "Arrayán"	Resultado para "Granada"
Alcaloides	Mayer	Precipitado blanco (+)	Precipitado blanco (+)
	Wagner	Precipitado marrón (+++)	Precipitado marrón(+++)
	Dragendorff	Precipitado rojo (+++)	Precipitado naranja(+++)
	Scheibler	No se evidencia el precipitado(-)	No se evidencia (-)
	Sonneschein	No se evidencia el precipitado (-)	Precipitado anaranjado (+++)
	Reineckato	Precipitado rosa (+++)	Precipitado rosa (++)
Flavonoides	Shinoda	Precipitado rojo (++)	Precipitado rojo (++)
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	Precipitado verde (+++)	Precipitado azul (+++)
Taninos	Gelatina 1%	Precipitado blanco (++)	Precipitado blanco (+++)
Quinonas	Reacción de Bortranger	No se evidencia precipitado (-)	Precipitado rojo (+++)
Aminoácidos	Ninhidrina	Coloración rosada (+)	No se evidencia (-)

Leyenda: (-) no se evidencia, (+) se evidencia poco, (++) se evidencia moderadamente, (+++) se evidencia notablemente.

En la identificación de los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas arrayán, se evidenció notablemente compuestos fenólicos (taninos hidrolizables) y alcaloides, moderadamente flavonoides y aminoácidos en poca cantidad.

En los resultados del extracto acuoso de la cáscara del fruto granada, se evidenció notablemente compuestos fenólicos (taninos condensados), quinonas y alcaloides, moderadamente flavonoides.

C. De la prueba cromatografía en capa fina para separar alcaloides y flavonoides

Tabla 21. Resultados de la cromatografía en capa fina para alcaloides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada)

MUESTRA	FASE MOVIL	REVELADOR	Rf	MANCHA OBSERVADA (coloración)
5 µL de extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán)	Butanol/ agua/Ácido acético glacial (20:15:5)	Luz UV 254 nm Dragendorff	0.70 cm	• Mancha visible • Mancha anaranjada
Extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	Butanol/ agua/Ácido acético glacial (20:15:5)	• Luz UV 254 nm • Dragendorff	0.80 cm	• Mancha visible • Mancha anaranjada

Estándar: Cafeína 10mg/mL
RF: Distancia recorrida por M/P o Estándar/Distancia recorrida por la fase móvil

El cálculo de Rf es 0.70 cm y se pudo observar una mancha anaranjada en la placa cromatográfica y nos confirma la presencia de alcaloides a la marcha fitoquímica en el extracto de las hojas de arrayán.

En el extracto de la cáscara del fruto granada, el cálculo de Rf es 0.80 también confirmo la presencia de alcaloides.

Los Rf obtenidos en ambas muestras al comparar con el estándar no fueron similares.

Tabla 22. Resultados de la cromatografía en capa fina para flavonoides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada)

MUESTRA	FASE MOVIL	REVELADOR	Rf	MANCHA OBSERVADA (coloración)
5 µL de extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán)	Metanol/ agua (25:75)	• Luz UV 254 nm • Tricloruro de Aluminio	0.85 cm	• Mancha visible • Mancha amarilla
Extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	Metanol/ agua (25:75)	Luz UV 254 nm Tricloruro de aluminio	0.63 cm	• Mancha visible • Mancha amarilla

Estándar: Quercetina 10mg/mL
RF: Distancia recorrida por M/P o Estándar/ Distancia recorrida por la fase móvil

En la tabla 22, se evidencia una mancha color amarilla y confirma la presencia de flavonoides a la marcha fitoquímica. Obteniendo un Rf 0.85 cm. al ser comparado con el estándar fue idéntica, por tal motivo podemos decir que podría ser quercetina en el extracto de las hojas de arrayán.

El resultado de la prueba de cromatografía en capa fina para el extracto acuoso de la cáscara del fruto de granada, se observó una mancha color amarilla y confirmó a la marcha fitoquímica la presencia de flavonoides. El Rf es 0.63, comparado con el estándar no fueron similares.

4.2. Resultados de la segunda etapa

A. De la pérdida del fluido corporal de *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano)

Tabla 23. Porcentaje del promedio de la pérdida del fluido corporal de *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano)

GRUPO EXPERIMENTAL	MOLUSCOS	[%].	P.P.I.	P.P.F	% P.F.C.	% P.P.F.C.
Control negativo (agua destilada)	10		39.54 g	39.54 g	0%	0%
Control positivo (metaldehído)	10	5%	36.52 g	24.33 g	33.38%	33.38%
Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán)	10	100%	30.49 g	24.79 g	37.22%	21.07%
	10	50%	27.79 g	23.35 g	15.98%	
	10	25%	28.68 g	24.20 g	15.62%	
	10	12.5%	23.97 g	20.26 g	15.48%	
Extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	10	100%	22.71 g	14.51 g	36.11%	18.19%
	10	50%	29.97 g	26.17 g	12.68%	
	10	25%	36.69 g	32.10 g	12.51%	
	10	12.5%	42.20 g	37.36 g	11.47%	
Combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	10	100%	36.52 g	25.61 g	29.88%	23.76%
	10	50%	27.70 g	20.55 g	25.81%	
	10	25%	37.56 g	30.12 g	19.81%	
	10	12.5%	31.21 g	25.12 g	19.52%	

Leyenda: [%]: Concentración %, **P.P.I.:** Promedio del peso inicial, **P.P.F.:** Promedio del peso final, **% P.F.C.:** % de pérdida del fluido corporal, **%P.P.F.C.:** % promedio de pérdida del fluido corporal

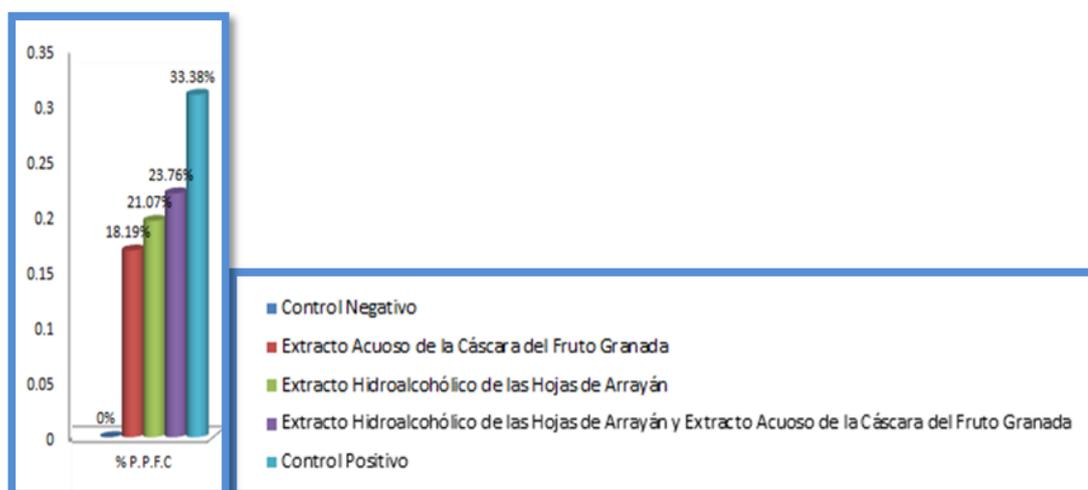


Figura 9. Porcentaje de pérdida del fluido corporal de *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano) en todos los grupos experimentales

B. De la mortalidad del molusco en estudio en todos los grupos experimentales

Tabla 24. Resultados de mortalidad de *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano) en el grupo control negativo y grupo control positivo

Grupo Experimental		Grupo Control Negativo				Grupo Control Positivo			
		(Agua Destilada)				Metaldehído 5%			
N° de Caracoles		10				10			
Tiempo de Exposición		24 H	48 H	72 H	Total %	24 H	48 H	72 H	Total %
Muertes Registradas		N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.
N° de aspersiones	Primera aspersión	0	0	0	0	7	0	0	70
	Segunda aspersión	0	0	0	0	3	0	0	30
	Tercera aspersión	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cuarta aspersión	0	0	0	0	0	0	0	0
	Quinta aspersión	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sexta aspersión	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		0	0	0	0	10/10	0	0	100

Legenda: N° M.: Número de muertes

Tabla 25. Resultados de mortalidad de *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano) en el grupo experimental del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán)

Grupo Experimental		Extracto Hidroalcohólico de las Hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (Arrayán)															
Concentración		100 %				50%				25%				12.5%			
N° de Caracoles		10				10				10				10			
Tiempo de Exposición		24 H	48 H	72 H	Total %	24 H	48 H	72 H	Total %	24 H	48 H	72 H	Total %	24 H	48 H	72 H	Total %
Muertes Registradas		N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.
N° de aspersiones	Primera aspersión	0	0	0	0	0	0	1	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	Segunda aspersión	1	1	1	30	0	1	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tercera aspersión	0	0	0	0	1	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cuarta aspersión	2	0	1	30	0	0	1	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	Quinta aspersión	0	2	0	20	0	2	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sexta aspersión	2	0	0	20	2	0	0	20	0	0	1	10	0	0	0	0
Total		5/10	3/10	2/10	100	3/10	3/10	2/10	80	0	0	1/10	10	0	0	0	0

Legenda: N° M.: Número de muertes

Tabla 26. Resultados de mortalidad de *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano) en el grupo experimental del extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada)

Grupo Experimental		Extracto Acuoso de la Cáscara del Fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)															
Concentración		100 %				50%				25%				12.5%			
N° de Caracoles		10				10				10				10			
Tiempo de Exposición		24 H	48 H	72 H	Total %	24 H	48 H	72 H	Total %	24 H	48 H	72 H	Total %	24 H	48 H	72 H	Total %
Muertes Registradas		N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.
N° de aspersiones	Primera aspersión	0	2	0	20	0	2	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	Segunda aspersión	0	0	1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tercera aspersión	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cuarta aspersión	2	0	1	30	0	0	1	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	Quinta aspersión	0	0	0	0	0	2	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sexta aspersión	0	2	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		2/10	4/10	2/10	80	0	4/10	1/10	50	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: N° M.: Número de muertes

Tabla 27. Resultados de mortalidad de *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano) en el grupo experimental de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada.)

Grupo Experimental		Combinación del Extracto Hidroalcohólico de las Hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y Extracto Acuoso de la Cáscara del Fruto de <i>Punica granatum</i> L. (granada)															
Concentración		100 %				50%				25%				12.5%			
N° de Caracoles		10				10				10				10			
Tiempo de Exposición		24 H	48 H	Total %	24 H	48 H	72 H	Total %	24 H	48 H	72 H	Total %	24 H	48 H	72 H	Total %	
Muertes Registradas		N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	N° M.	
N° de aspersiones	Primera aspersión	0	0	0	0	0	1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Segunda aspersión	1	1	20	0	2	0	20	0	0	1	10	0	0	0	0	
	Tercera aspersión	0	0	0	2	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cuarta aspersión	2	2	40	0	0	1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Quinta aspersión	0	0	0	0	2	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Sexta aspersión	3	1	40	2	0	0	20	0	0	1	10	0	0	0	0	
Total		6/10	4/10	100	4/10	4/10	2/10	100	0	0	2/10	20	0	0	0	0	

Legenda: N° M.: Número de muertes

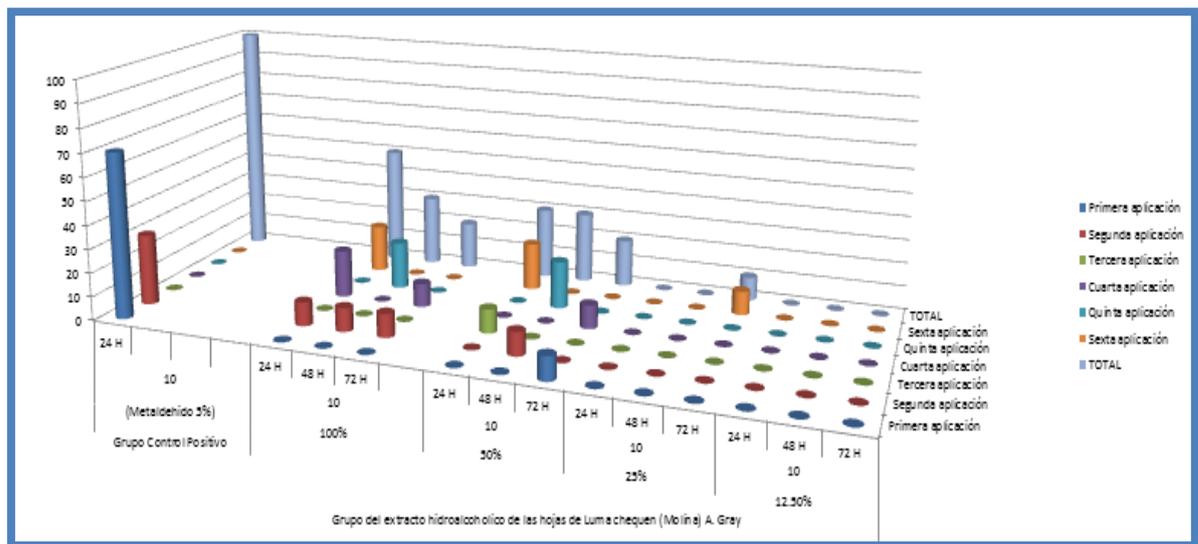


Figura 10. Comparación del porcentaje de mortalidad de *Achatina (Lissachatina) fulica* (caracol africano) del grupo control positivo (metaldehído 5%) frente al grupo experimental del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) al 100, 50, 25 y 12.5 % en 24, 48 y 72 Horas

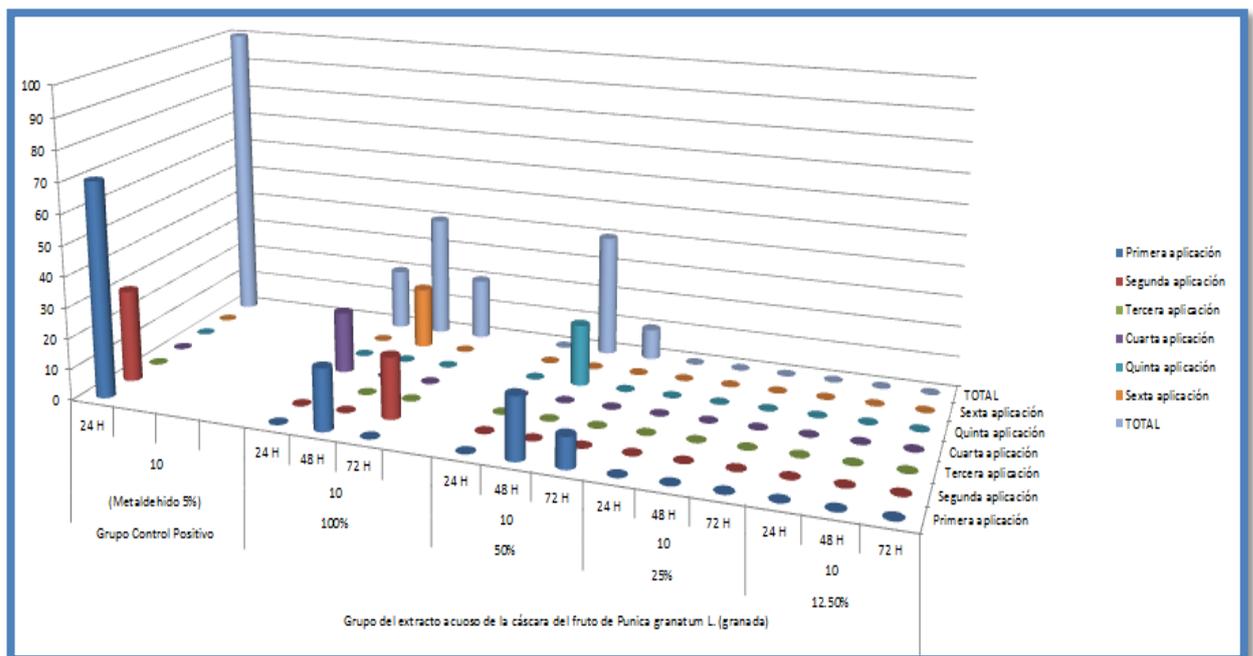


Figura 11. . Comparación del porcentaje de mortalidad de *Achatina (Lissachatina) fulica* (caracol africano) del grupo control positivo (metaldehído 5%) frente al grupo experimental del extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) al 100, 50, 25 y 12.5 % en 24, 48 y 72 Horas

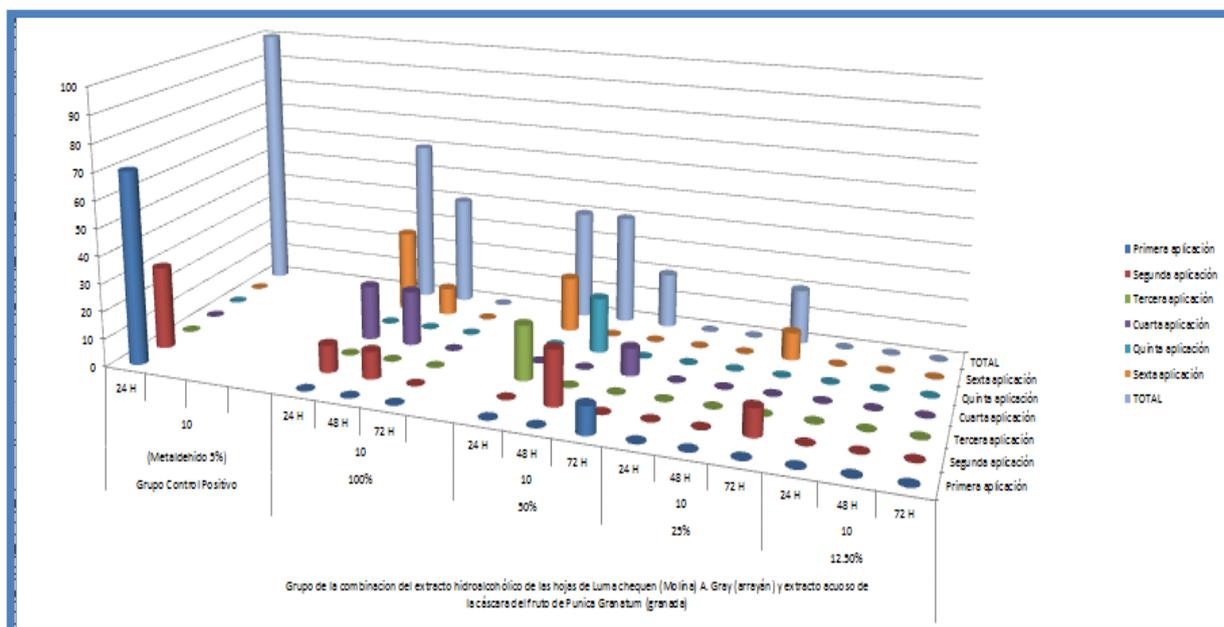


Figura 12. Comparación del porcentaje de mortalidad de *Achatina (Lissachatina) fulica* (caracol africano) del grupo control positivo (metaldehído 5%) frente al grupo experimental de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) al 100, 50, 25, 12.5% en 24, 48 y 72 horas

C. Resultados de la CL₅₀ de los extractos botánicos en estudio.

Tabla 28. Resultados de la CL₅₀ del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) al 100, 50, 25 y 12.5% en 24, 48 y 72 horas

Nº Caracoles	Conc. (%)	Log. (Conc. %)	% Mortalidad	Probit
10	12.5	1.09691001	0	0
10	25	1.39794001	10	3.72
10	50	1.69897	80	5.84
10	100	2	100	8.09

Regresión: $y = -9.162136485 + 8.766568242x$

CL₅₀ = 41.34%

Legenda: Conc.: (Concentración)

Tabla 29. Resultados de la CL₅₀ del extracto acuoso de la cáscara el fruto *Punica granatum* L. (granada) al 100, 50, 25, 12.5% en 24, 48 y 72 horas

N° Caracoles	Conc. (%)	Log (Conc. %)	% Mortalidad	Probit
10	12.5	1.09691001	0	0
10	25	1.39794001	0	0
10	50	1.69897	50	5
10	100	2	80	5.84

Regresión: $y = -8.873964139 + 7.48098207x$

CL₅₀ = 71.50%

Leyenda: Conc.: (Concentración)

Tabla 30. Resultados de la CL₅₀ de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) al 100, 50, 25, 12.5% en 24, 48 y 72 horas

N° caracoles	Conc. (%)	Log (Conc. %)	% Mortalidad	Probit
10	12.5	1.096910013	0	0
10	25	1.397940009	20	4.16
10	50	1.698970004	100	8.09
10	100	2	100	8.09

Regresión: $y = -9.420674455 + 9.367837228x$

CL₅₀ = 34.59%

Leyenda: Conc.: (Concentración)

4.3. Contrastación de hipótesis

Descripción del plan experimental, modelo y estimación puntual

Las fuentes de variación controladas de caracoles muertos

Factor principal: Concentración (4 niveles)

- Concentración al 100%
- Concentración al 50%
- Concentración al 25%
- Concentración al 12.5 %

Factor secundario: Tiempo de Exposición (3 niveles)

- 24 horas
- 48 horas
- 72 horas

Factor bloque: Intervalos de Aspersión (6 niveles)

- Primera aspersión
- Segunda aspersión
- Tercera aspersión
- Cuarta aspersión
- Quinta aspersión
- Sexta aspersión

Diseños en bloques completos al azar

- Nivel de Confianza: 95%
- Nivel de Significancia: 5%

La variable respuesta de este experimento es el número de caracoles muertos en los grupos experimentales. En la muerte de los caracoles marcado como objetivo intervienen tres factores, los cuales han sido fijados por el investigador y son de efectos fijos

4.3.1. Contrastación de hipótesis general

H₀: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) NO tienen efecto molusquicida en *Achatina* (*Lissachatina*) *fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).

H₁: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) tienen efecto molusquicida en *Achatina* (*Lissachatina*) *fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano)

Análisis univariado de varianza

Tabla 31. Factores inter-sujetos

Factores inter-sujetos			
		Etiqueta de valor	N
CONCENTRACIÓN	1	AGUA DESTILADA	18
	2	METALDEHIDO	18
	3	CONCENTRACIÓN AL 100%	54
	4	CONCENTRACIÓN AL 50%	54
	5	CONCENTRACIÓN AL 25%	54
	6	CONCENTRACIÓN AL 12.5%	54
TIEMPO	1	24 HORAS	84
	2	48 HORAS	84
	3	72 HORAS	84
DOSIS	1	PRIMERA DOSIS	42
	2	SEGUNDA DOSIS	42
	3	TERCERA DOSIS	42
	4	CUARTA DOSIS	42
	5	QUINTA DOSIS	42
	6	SEXTA DOSIS	42

Tabla 32. Pruebas de efectos inter-sujetos

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: NÚMERO DE CARACOLES MUERTOS					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	64,290 ^a	57	1,128	1,737	,003
Intersección	13,380	1	13,380	20,609	,000
CONCENTRACION	13,401	5	2,680	4,128	,001
TIEMPO	9,670	2	4,835	7,448	,001
DOSIS	8,254	5	1,651	2,543	,030
CONCENTRACION * TIEMPO	14,135	10	1,413	2,177	,021
CONCENTRACION * DOSIS	17,020	25	,681	1,049	,407
TIEMPO * DOSIS	5,611	10	,561	,864	,568
Error	125,944	194	,649		
Total	207,000	252			
Total corregido	190,234	251			

a. R al cuadrado = ,338 (R al cuadrado ajustada = ,143)

La tabla ANOVA muestra las filas de concentración, tiempo, dosis y concentración*tiempo, corresponde a la variabilidad debida a los efectos de cada uno de los factores y a la interacción de orden dos entre ambos y se encuentran dentro del rango de significancia del 5%, los efectos que no son significativos del modelo planteado son las interacciones entre los factores concentración*dosis y tiempo*dosis porque los p-valores obtenidos son 0.407 y 0.568 son mayores y no corresponden. Como consecuencia de este resultado, el modelo debe suprimir los efectos concentración*dosis y tiempo dosis.

Donde los efectos deben de cumplir las condiciones expuestas anteriormente. ANOVA nos muestra el modelo a continuación.

Tabla 33. Pruebas de efectos inter-sujetos

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: NÚMERO DE CARACOLES MUERTOS					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	47,270 ^a	32	1,477	2,263	,000
Intersección	13,380	1	13,380	20,496	,000
CONCENTRACION	13,401	5	2,680	4,106	,001
TIEMPO	9,670	2	4,835	7,407	,001
DOSIS	6,258	5	1,252	1,917	,093
CONCENTRACION * TIEMPO	14,135	10	1,413	2,165	,021
TIEMPO * DOSIS	5,611	10	,561	,860	,572
Error	142,964	219	,653		
Total	207,000	252			
Total corregido	190,234	251			

a. R al cuadrado = ,248 (R al cuadrado ajustada = ,139)

Tabla 34. Pruebas de efectos inter-sujetos

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: NÚMERO DE CARACOLES MUERTOS					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	41,659 ^a	22	1,894	2,919	,000
Intersección	13,380	1	13,380	20,622	,000
CONCENTRACION	13,401	5	2,680	4,131	,001
TIEMPO	9,670	2	4,835	7,452	,001
DOSIS	6,258	5	1,252	1,929	,090
CONCENTRACION * TIEMPO	14,135	10	1,413	2,179	,020
Error	148,575	229	,649		
Total	207,000	252			
Total corregido	190,234	251			

a. R al cuadrado = ,219 (R al cuadrado ajustada = ,144)

Tabla 35. Número de caracoles muertos

NÚMERO DE CARACOLES MUERTOS			
Duncan ^{a,b,c}			
CONCENTRACIÓN	N	Subconjunto	
		1	2
AGUA DESTILADA	18	,00	
CONCENTRACIÓN AL 12.5%	54	,00	
CONCENTRACIÓN AL 25%	54	,07	
CONCENTRACIÓN AL 50%	54	,43	,43
CONCENTRACIÓN AL 100%	54		,52
METALDEHIDO	18		,56
Sig.		,054	,550

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
 Se basa en las medias observadas.
 El término de error es la media cuadrática(Error) = ,662.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 32,400.
 b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.
 c. Alfa = 0.05.

Comprobamos que la concentración que produce mayores caracoles muertos es al 100% y el que produce el menor número de caracoles muertos es el 12.5%. A continuación el programa analizará el efecto de la interacción de los factores concentración*tiempo mediante el gráfico de las medias como se detalla a continuación.

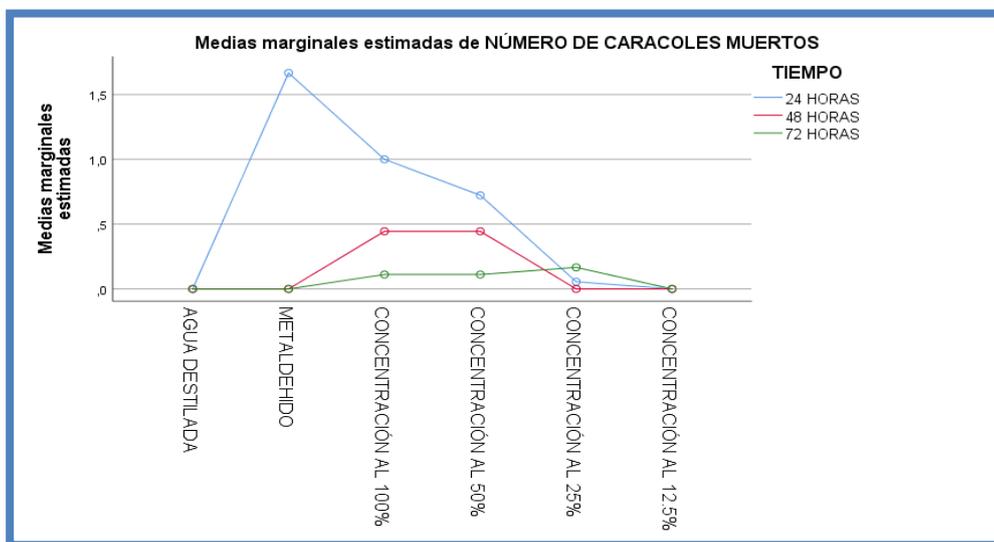


Figura 13. Gráfico de medias de número de caracoles muertos en 24, 48 y 72 Horas

En el recorrido de las medias se produce un cruce entre las distintas concentraciones por lo tanto confirma la interacción entre los factores concentración*tiempo.

Decisión Estadística

El p_valor obtenido:

Para el factor **concentración es 0.01**

Para el factor **tiempo es 0.01**

Para el factor **concentración*tiempo es 0.020**

Nos muestra que son menores que el nivel de significancia (0.05). Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y concluye que:

“El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) tienen efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano)”.

4.3.2. Contrastación de hipótesis específicas

Hipótesis específica 1

H₀: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) NO tiene efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).

H₁ El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) tiene efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).

Tabla 36. Resultados estadísticos

Estadísticos para una muestra ^a				
	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
NUMERO DE CARACOLES MUERTOS	72	,26	,650	,077

a. GRUPO = EXTRACTO HIDROALCOHOLICO

Prueba para una muestra ^a						
	Valor de prueba = 0				95% Intervalo de confianza para la diferencia	
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Inferior	Superior
NUMERO DE CARACOLES MUERTOS	3,446	71	,001	,264	,11	,42

a. GRUPO = EXTRACTO HIDROALCOHOLICO

Decisión estadística

La prueba procesada estadísticamente nos da un p_valor de 0.001 y se encuentra por debajo del 0.05 se toma la decisión de rechazar la hipótesis nula y se concluye que **“el extracto de hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) tiene efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* (caracol africano)”**.

Hipótesis específica 2

H₀: El extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) NO tiene efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).

H₁: El extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) tiene efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).

Tabla 37. Resultados estadísticos

Estadísticos para una muestra ^a				
	N	Media	Desviación tip.	Error tip. de la media
NÚMERO DE CARACOLES MUERTOS	72	,19	,573	,067

a. GRUPO = EXTRACTO ACUOSO

Prueba para una muestra ^a						
	Valor de prueba = 0				95% Intervalo de confianza para la diferencia	
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Inferior	Superior
NÚMERO DE CARACOLES MUERTOS	2,882	71	,005	,194	,06	,33

a. GRUPO = EXTRACTO ACUOSO

Decisión estadística

Los resultados muestran un p_valor 0.005 y es menor que el nivel de significación, por lo tanto se afirma la hipótesis alterna “**el extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) tiene efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano)”.**

Hipótesis específica 3

H₀: La combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) NO tienen efecto sinérgico molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).

H₁: La combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) tienen efecto sinérgico molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).

Tabla 38. Resultados estadísticos

Estadísticos para una muestra ^a				
	N	Media	Desviación tip.	Error tip. de la media
NÚMERO DE CARACOLES MUERTOS	72	,31	1,070	,126

a. GRUPO = EXTRACTO HIDROALCOHOLICO Y EXTRACTO ACUOSO

Prueba para una muestra ^a						
	Valor de prueba = 0				95% Intervalo de confianza para la diferencia	
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Inferior	Superior
NÚMERO DE CARACOLES MUERTOS	2,423	71	,018	,306	,05	,56

a. GRUPO = EXTRACTO HIDROALCOHOLICO Y EXTRACTO ACUOSO

Decisión estadística: El p_valor es 0.018 y es menor que el nivel de significancia, se afirma la hipótesis alterna.

4.4. Discusión de resultados

Con intenciones de aportar nuevos conocimientos buscando molusquicidas botánicos, se realizó el presente trabajo de investigación en dos plantas de la familia Myrtaceae y Punicaceae, es importante señalar, que en nuestro país el estudio de las plantas con efectos molusquicidas son muy pocos, tal es así que no existen referencias que evidencien que el extracto hidroalcohólico de las hojas de arrayán y extracto acuoso de la cáscara del fruto granada presenten efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica*, pero existen estudios realizados por Mahdi (2012), quien reporta que el extracto acuoso de las hojas *Myrtus communis* que pertenece a la familia Myrtaceae y extracto acuoso de la cáscara del fruto de la granada que pertenece a la familia Punicaceae, presentan actividad molusquicida en el caracol *Lymnaea auricularia* cuyos logros avalan el estudio realizado¹³.

Al realizar experimentalmente el estudio nos muestra que el extracto seco de las hojas de arrayán fueron muy solubles en etanol e isopropanol, resultados que concuerdan con Llerena y Yucra (2017) quienes reportan que el extracto seco de arrayán es altamente soluble en etanol, no realizaron estudios con isopropanol y el extracto seco de la cáscara del fruto granada resultó ser altamente soluble en agua reportes que concuerdan con Jacobo y Zuñiga (2016). Por lo que se confirma que los metabolitos secundarios presentes en las muestras son de naturaleza polar^{24, 31}.

Según la OMS uno de los lineamientos que plantea para aceptar que una planta tenga efecto molusquicida, es que la extracción de los principios activos se realice con agua, de una forma muy sencilla para reducir costos, por tal motivo el solvente utilizado para la preparación del extracto de la granada fue el agua, asimismo podemos señalar que el solvente utilizado para la preparación del extracto del arrayán fue una solución hidroalcohólica al 70% para reducir costos por otro lado como se puede observar en la tabla 19, la marcha de solubilidad del arrayán muestra que es soluble en alcohol 96° y poco soluble en agua por esta razón se utilizó una solución hidroalcohólica para obtener mejor los metabolitos secundarios y puedan ejercer su efecto molusquicida. Como señala Remington (2003) que el “alcohol es el mejor solvente para extraer y preservar los compuestos presentes en una planta”⁷⁴.

Los resultados de la identificación de los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de arrayán, evidencia en la tabla 20, presencia de compuestos fenólicos (taninos hidrolizables), alcaloides, flavonoides y aminoácidos, estos resultados confirman con lo expuesto por Torres (2014) quien identificó la presencia de metabolitos secundarios (compuestos fenólicos, alcaloides, taninos y flavonoides) en los diferentes extractos de *Luma chequen* (Molina) A. Gray y es acorde con la investigación¹⁹.

Los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada), como se observa en la tabla 20, presencia de compuestos fenólicos (taninos condensados), quinonas, alcaloides y flavonoides, estos resultados confirman con lo expuesto por Peña et al (2008), en su estudio científico. “Estandarización y tamizaje fitoquímico del extractos de frutos de *Punica granatum* L.”, estos autores concluyeron que los extractos acuosos presentan flavonoides, taninos, aminoácidos y alcaloides, este último aumentaría el potencial tóxico y los efectos colaterales y ello es acorde con lo que esta investigación presenta⁷⁵.

En la tabla 21, se observa los resultados de la prueba de cromatografía en capa fina, para la separación de alcaloides del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) un Rf 0.7 cm y para el extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) un Rf 0.8 cm, al aplicar el reactivo Dragendorff como revelador, se puede visualizar una mancha de color anaranjada en ambos resultados, lo que confirma la presencia de alcaloides a la marcha fitoquímica, según Sharapin (2000) sostiene que dicho “reactivo está constituido por yoduro doble de bismuto y potasio, lo que permite la detección de alcaloides y aminas cuaternarias, esto se debe a que los alcaloides pueden combinarse fácilmente con metales como bismuto y yodo y se forma sales dobles “y esto propicia a visualizar la coloración anaranjada⁵⁹.

Según lo expuesto se comprueba que los resultados obtenidos del análisis cualitativo de la cromatografía en capa fina en ambos extractos se pudieron evidenciar alcaloides. Los Rf presentados en esta investigación son experimentales y al comparar con el estándar no son iguales, significa que se trata de otro tipo de alcaloide y no cuentan con Rf teóricos para su comparación.

En la tabla 22 se observa los resultados de la cromatografía en capa fina para separar flavonoides en el extracto hidroalcohólico de la hojas de arrayán un Rf 0.85 cm y al aplicar el reactivo tricloruro de aluminio como revelador se puede evidenciar una mancha de color amarillo, comparando con el estándar (quercetina), también se obtuvo un Rf 0.85 cm, esto nos confirma la posible presencia de quercetina. Según Torres (2017), reporta que el extracto etanólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, la presencia de compuestos bioactivos e identificó el flavonoide quercetina, obteniendo el mismo Rf comparando con el estándar y observando una mancha de color amarilla y estos resultados afirman esta investigación²⁵.

También se observa en la tabla 22, el resultado de la cromatografía en capa fina realizada en el extracto acuoso de la cáscara del fruto granada un Rf =0.63 cm y al aplicar el reactivo tricloruro de aluminio como revelador, se pudo evidenciar una mancha color amarillo y comparando con el estándar no son iguales, pero las manchas de color amarillo que presenta, se identifica un flavonoide, según Jacobo y Zuñiga (2016) en su estudio experimental del extracto de la granada comprobó que el extracto metanólico de *Punica granatum* L., la presencia de flavonoides obteniendo un Rf de 0.16 cm, por lo que estos resultados concuerda con los datos hallados en esta investigación, pero no concuerda el valor del Rf experimental³¹. Según Sharapin (2000) sostiene que existen factores que causan variaciones en el valor del Rf que no permite que sea un valor absoluto y estas son la variación en la temperatura del ambiente, grado de pureza de los solventes utilizados y variaciones de homogeneidad de las diferentes placas de capa fina. Debido a estos factores, el uso de una sustancia de referencia para garantizar la identificación es importante, principalmente cuando se trata de extractos de plantas⁵⁹.

Observando todos los resultados realizados en la identificación de metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) se identificó compuestos fenólicos (taninos hidrolizables), alcaloides, flavonoides (quercetina) y aminoácidos. En el extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) se identificó compuestos fenólicos (taninos condensados), quinonas, alcaloides y flavonoides. Estos metabolitos en su conjunto atribuyen el efecto molusquicida en *Achatina fulica* (caracol africano), al no haber estudios que evidencien el efecto molusquicida en *Achatina fulica* (caracol africano)

para su comparación, se tomó como referencia a Mahdi et al (2012), en su estudio, donde informa que la cáscara del fruto *Punica granatum* presenta actividad molusquicida por la presencia de taninos y compuestos fenólicos, señalando que los taninos fueron capaces de precipitar sobre la proteína de la membrana celular durante su absorción en el caracol *Lymnaea auricularia* y los compuestos fenólicos son capaces de formar enlaces de hidrógeno sin nitrógeno y grupos multihidroxiolos que causan inhibición de algunas enzimas que son esenciales para el organismo, la actividad molusquicida de las hojas de *Myrtus communis* puede deberse a la presencia de taninos, myrtol y compuestos fenólicos los cuales evidencian que estos metabolitos secundarios influyen en el efecto molusquicida⁴

Otro estudio realizado por Tripathi et al (2000) “Actividad molusquicida de la corteza de *Punica granatum* y raíz de *Canna indica*” donde sostiene que *Punica granatum* es un potente molusquicida botánico debido a que en la corteza de la granada contiene alcaloides del grupo piridina donde informa que la isopeletierina, causa debilidad muscular, seguida de parálisis y muerte en animales tratados, concluyendo que las actividades molusquicidas del extracto de *Punica granatum* en contra del caracol *L. acuminata* se deben al número de alcaloides presentes en ellas por lo tanto *Punica granatum* pueden utilizarse como molusquicidas potentes debido que su ensayo tóxico no causó ningún daño al pez *Colisa fasciatus*. Por lo que podemos decir que estos resultados guardan relación con la presente investigación ya que en ambos extractos se identificaron alcaloides que pueden ejercer el efecto molusquicida en *Achatina fulica* (caracol africano)¹⁴.

Por lo tanto se puede inferir que los metabolitos secundarios en su conjunto en ambos extractos influyen en el efecto molusquicida siguiendo los mismos mecanismos en *Achatina fulica* (caracol africano) lo cual provoca la muerte en ellos.

El estudio reveló que al aplicar en forma de aspersión los extractos de arrayán y granada, también la combinación de ambos en el caracol africano, se pudo visualizar una reacción inmediata, presencia de espasmos dentro del caparazón, activándose su mecanismo de defensa, donde el caracol elimina fluido corporal (baba), llegando a producir abrasión de la masa corporal, produciendo debilidad y finalmente la muerte. Observando que el grupo control negativo no presentó ninguna reacción, tampoco pérdida de fluidos por lo tanto no hubo efecto molusquicida, lo cual ratifica

que el responsable del efecto molusquicida es la concentración de los compuestos bioactivos de la planta en este caso los compuestos fenólicos (taninos, condensados, hidrolizados), quinonas y alcaloides que han sido identificados.

El grupo control positivo para demostrar el efecto molusquicida se utilizó metaldehído 5% en diez caracoles africanos, reportando la muerte total de los moluscos en un 100% en 24 horas después de la segunda aspersion siendo más efectiva que los extractos botánicos, Esta sustancia produjo un exceso de secreción de moco con un promedio de pérdida de fluido corporal del 33.38% llegando a producir la muerte en el caracol, estos datos guardan relación con lo manifestado por Garcés et al (2016), en su investigación quienes reportaron que el metaldehído es la sustancia que presentó mayor mortalidad de caracoles frente a los extractos botánicos que actúa provocando daños graves en la membrana celular del molusco, lo cual desencadena una fuerte expulsión de baba por lo que se muestra inapetente y conlleva a la muerte motivo por el cual esta sustancia es potencialmente tóxica, pues provoca los mismos efectos en moluscos nativos y algunos vertebrados, razón por la cual el uso se ha restringido en algunas localidades¹⁶.

La pérdida del fluido corporal del molusco fueron mayores con 23.76 % con la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de arrayán y el extracto acuoso de la cáscara del fruto granada, seguido del extracto hidroalcohólico de las hojas de arrayán con un 21.07% y finalmente con un 18.19% del extracto acuoso de la cáscara del fruto granada en estos grupos los estudios se realizaron a diferentes concentraciones (100, 50, 25 y 12.5%) demostrando que la concentración al 100% es eficaz en relación a las otras concentraciones en todos los grupos para su comparación tomamos en cuenta los estudios realizados por Mahdi et al (2012)¹³ quien utilizando los extractos acuosos de la cáscara de *Punica granatum* y hojas de *Myrtus communis* en el control biológico del caracol *Lymnaea auricularia* en diferentes concentraciones reportan una alta actividad molusquicida a concentraciones mayores explicando, que el extracto acuoso de *Punica granatum*, la concentración más efectiva fue 1.75 mg/mL en comparación a las concentraciones menores de 1.5 y 0.5 mg/mL y para el extracto de *Myrtus communis* la concentración más efectiva fue de 2 mg/mL en comparación a las concentraciones menores de 1.25 y 1 mg/L), demostrando que la supervivencia del caracol disminuyó

con el aumento de la concentración y el tiempo de exposición, estos resultados también guardan relación con los datos hallados en la presente investigación, a mayor concentración y tiempo de exposición de los extractos de *Luma chequen* (Molina) A. Gray y *Punica granatum* L. en *A. fulica* aumenta la efectividad molusquicida, según datos estadísticos analizados el efecto molusquicida fueron dependientes del factor tiempo y concentración, como detalla en la tabla 33, ANOVA obteniendo el p_valor para el factor concentración 0.01, factor tiempo 0.01 y factor concentración * tiempo 0.020 siendo menores que el nivel de significancia (0.05) por lo tanto se demuestra que el efecto molusquicida de los extractos contra el caracol africano son dependientes del tiempo de exposición y concentración de los extractos que ha mayor concentración y tiempo de exposición, el tiempo de inactivación y mortalidad fue reducido para *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowich, 1822.

Según los estudios realizados la combinación del extracto de arrayán y granada es más efectiva, la relación sinérgica de esta combinación fue mayor frente al grupo experimental del extracto hidroalcohólico de las hojas de arrayán y este a su vez presentó mayor efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano) frente al grupo del extracto acuoso de la cáscara del fruto granada, importante señalar que estudios realizados por Rao y Singh (2002) donde señala que los molusquicidas derivados de plantas en tratamiento individuales y binarios fueron más efectivas los tratamientos binarios contra *A. fulica*, teniendo en cuenta los resultados es posible que el efecto molusquicida no solo es el resultado de la acción de un compuesto bioactivo sino la acción de otros metabolitos presentes en el extracto y su combinación produce el efecto sinérgico, del mismo modo también podemos considerar que el rendimiento de los extractos depende de la naturaleza química de los metabolitos, polaridad de solvente utilizado y la técnica de extracción utilizada¹².

La CL₅₀ fue hallada estadísticamente a concentraciones diferentes 100, 50, 25 y 12.5% en tiempos determinados 24, 48 y 72 horas que causan muerte en el caracol africano, resultando ser más tóxica la combinación de los extractos de arrayán y granada con un CL₅₀ = 34.59%, seguida del extracto hidroalcohólico de las hojas de arrayán con un CL₅₀ = 41.34 % y resultando ser menos tóxica con un CL₅₀ = 71.50% para el extracto acuoso de la cáscara del fruto granada. Es importante mencionar

que para estos extractos en estudio no se encuentran reportes sobre CL_{50} en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano), lo que significa que estas concentraciones obtenidas sirva como fuente para investigaciones futuras ya que al preparar los extractos siguiendo los parámetros definidos como resultados deben de obtener el 50% de muerte, estos datos sirven para realizar estudios de efectos tóxicos.

La presente investigación mostró que los extractos de arrayán y granada y en su combinación podría ser una fuente viable para usarse como molusquicidas para controlar *Achatina fulica* en estadíos juveniles, de una manera segura y no afectar al medio ambiente y ser una posible solución para conservar nuestra biodiversidad biológica en bienestar de nuestro planeta.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. Se identificó la presencia de compuestos fenólicos (taninos condensados, hidrolizados), alcaloides, quinonas, flavonoides y aminoácidos en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y el extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* (granada) que en su conjunto influyen en el efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).
2. Se determinó que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) posee efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).
3. Se determinó que el extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) posee efecto molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).
4. Se comprobó que la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) posee efecto sinérgico molusquicida en *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano).

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda utilizar en la técnica de observación, sistemas de video vigilancia, esta actividad es de forma continua.
- Se recomienda realizar estudios de toxicidad en otras especies nativas, otros animales, suelo y el hombre.
- Se propone realizar estudios bioquímicos en el caracol africano para observar la acción fisiológica como produce mortalidad.
- Se propone realizar estudios para identificar si los extractos en estudio tienen efecto ovicida con respecto a los caracoles africanos.
- Se recomienda que esta investigación interaccione con el apoyo de diferentes ciencias, profesionales malacólogos, biólogos, toxicólogos, etc. Para obtener un producto con el efecto deseado.
- Continuar con los estudios en la búsqueda de plantas con efecto molusquicida en beneficio del hombre y del medio ambiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Pooter M. 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the global invasive species database. *Aliens* 2000; 1(12): 1-12.
2. MINAGRI. Notificando sobre el desarrollo agrario y la seguridad alimentaria. Lima, SENASA PERU [Internet]; 2016. [Fecha de acceso 13 de marzo 2018]. Disponible en: <http://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2016/09-10-pdf>.
3. Solórzano AL, Martini RL, Hernández AH, Sarracent PJ, Muzzio AJ, Rojas RL. et al. *Angiostrongylus cantonensis* an emerging parasite in Ecuador. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2014; 66(1):1-10.
4. Nava PE, García GC. Camacho BJ, Vásquez ME. Bioplaguicidas una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai* 2012; 8(3): 17-29.
5. Iglesias PF. Eco-agroquímicos de acción ovicida como agentes controladores de las plagas babosas y caracoles en la agricultura. *Xunta Galicia* 2010: 1-24.
6. Olano S. Acción molusquicida de *F. andina* Trel (Agavaceae) sobre *Fossaria viatrix* y sus componentes fitoquímicos. [Tesis para la obtención del título de Biólogo]. Lima: Facultad de Ciencias Biológicas .Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1999.
7. Iannacone J, Cajachagua C, Dueñas B, Castillo L, Alvarino L, Argota G. Toxicidad de *Agave americana* y *Furcraea andina* (Asparagaceae) sobre *Culex quinquefasciatus* (diptera) y *Heleobia cumingii* (Mollusca). *Neotropical helminthology* 2013; 7(2): 311-325.
8. Guzmán W. Efecto de plantas molusquicidas sobre *Physa venustula* (Gould, 1847) y miracidios de *Fasciola hepática* (Linnaeus, 1758) en Perú. [Tesis doctoral]. Lima: Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela de Post-grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.

9. Iannacone J, La Torre M, Alvariño L, Cepeda C, Ayala H, Argota G. Toxicidad de los bioplaguicidas *Agave americana*, *Furcraea andina* (Aspagueae) y *Sapindus saponaria* (Sapindaceae) sobre el caracol invasor *Melanoides Tuberculata* (Thiaridae). Neotropical Helminthology 2013; 7(2): 231-241.
10. Selvi V, Mastro R. Efecto molusquicida de la sílice biogénica y pesticidas botánicos para el control de *Achatina fulica* (gigante caracol africano) y *Laevicaulis alte* (babosa de jardín). Revista Fitopatológica y Control de Plagas 2015; 2(1):12-2.
11. Rao I, Singh D. Efectos tóxicos de tratamientos individuales y binarios de molusquicidas sintéticos y derivados de plantas contra *Achatina fulica*. Revista de Toxicología Aplicada 2002; 22(1): 211-215.
12. Rao I. Singh A, Singh V, Singh D. Efecto de combinaciones simples y binarias de molusquicidas derivados de plantas en diferentes actividades enzimáticas en el tejido nervioso de *Achatina fulica*. Revista de Toxicología Aplicada 2003; 23(1): 19-22.
13. Mahdi H. Effect of some plants extracts as a molluscicides *Lymnaea auricularia* L. in Barash. Academic Scientific Journals. 2012; 20(2): 556-561.
14. Tripathi S, Singh D. La actividad molusquicida de corteza de *Punica granatum* y raíz de *Canna indica*. Revista Médica Biológica 2000; 33(11): 1351-1355.
15. Romero L, Grasielle S, Vestene S. Evaluación de la actividad molusquicida de extractos de plantas en *fulica* Bowdich (mollusca, Achatinidae). Arq. Instituto Biológico 2016; 83(1): 1-8.
16. Garcés M, Patiño A, Gómez M, Giraldo A, Bolívar W. Sustancias alternativas para el control del caracol africano (*Achatina fulica*) en Valle del Cauca, Colombia. Biota Colombia 2016; 17(1): 44-59.

17. Brako L, Zarucchi, J. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Perú. Missouri Botanical Garden. Missouri. 1993.
18. Carhuapoma YM. Plantas medicinales aromáticas nativas de la provincia de Huamanga y sus perspectivas económicas. UNSCH. Ayacucho; 2002.
19. Torres Chati J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. [Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo, Microbiólogo, Parasitólogo].Lima: Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Mayor de San Marcos; 2014.
20. Mantilla HJ, Olazábal CO. Las plantas medicinales de nuestra madre tierra, “Pachamama Hampi Qhoranchiskuna.” “Valle sagrado de los Inkas-Cusco”. Instituto de Ecología y Plantas Medicinales, “Pachamama hampihoranchiskuna”. 2008.
21. Moscoso M. secretos medicinales de la flora peruana y guía de la maternidad Cuzco: Apha. 1997.
22. Pamplona J. Enciclopedia de las plantas medicinales. 2ª ed. Madrid: Safeliz. 1999.
23. Carhuapoma Yance M. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”. [Tesis para optar el Título académico de Magister en Recursos Vegetales y Terapéuticos]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica. Unidad de Post grado. Universidad Mayor de San Marcos; 2006.
24. Llerena S, Yucra J. Evaluación in vitro del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) sobre *Staphylococcus epidermidis*, *Echerichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, y *Candida albicans*. [Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico]. Arequipa: Facultad de

- Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas. Universidad Católica de Santa María; 2017.
25. Torres E. Efecto hipoglicemiante, hipolipemiante y antiaterogénico del extracto etanólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “rayán castilla” en ratas dislipidémicas. [Tesis doctoral]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2017.
 26. Vergara S. Estrategias tecnológicas para optimizar la producción y la vida útil de zumo de granada (*Punica granatum*) [Tesis doctoral]. Elche (Alicante): Instituto de Biología Molecular y Celular. Universidad Miguel Hernández De Elche; 2014.
 27. Escobar FB, Quispe QL. Actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum* L. “granada”. [Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Norbert Wiener; 2017.
 28. Especies frutales forestales. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 34^a ed. Roma. Estudio FAO: Montes; 1982.
 29. Garachh D, Chakraborty M. Perfil fitoquímico y farmacológico de *Punica granatum*: Una Visión general. Revista Internacional de Investigación de Farmacia 2012; 3(2): 65-68.
 30. Morton Francés J. Atlas of medicinal plants of middle América: Bahamas to Yucatán. 1^a ed. USA: Springfield; 1981.
 31. Jacobo CD, Zuñiga OG. Evaluación del efecto antiinflamatorio tópico de la asociación del extracto de *Punica granatum* L. “granada” y *Plantago lanceolata* L. “llantén” en animales de experimentación – Arequipa 2016. [Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico]. Arequipa: Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas. Universidad Católica de Santa María; 2017.

32. Cuasapaz Sarabia J. Área de vida del caracol africano, *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Gastropoda: Achatinidae) en dos áreas bajo distinto grado de alteración en el bosque protector Cerro Blanco (Guayas-Ecuador) durante febrero – mayo 2016. [Tesis de grado]. Guayaquil: Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Guayaquil; 2017.
33. Todo lo que tiene que saber del caracol gigante africano [en línea]. Lima: Diario El comercio: 2017 [Fecha de acceso 13 de febrero 2018] URL disponible: <http://elcomercio.pe/peru/tienes-caracol-gigante-africano-423215>.
34. Ecology of *Achatina fulica* - invasive. Francia: Global invasive species database; 2010.
35. Mead AR. El caracol gigante africano: un problema en la malacología económica. EE.UU.: Universidad de Chicago Press. 1961, 207.
36. Tomiyama K. Growth and maturation pattern in the african giant snail, *Achatina fulica* (Ferussac) (Stylommatophora: Achatinidae) in the field. Venus 1993; 52(1), 87-100.
37. Tomiyama K. Comportamiento de cortejo del gigante caracol africano, *Achatina fulica* (Ferussac) (Stylommatophora: Achatinidae) en el capo. Revista de Estudios Moluscos 1994; 60(1), 47.
38. Raut SK, Barker GM. *Achatina fulica* Bowdich and other Achatinidae as pest in tropical agricultura in: Molluscs as crop pest. Wallingford. 2002, 55-114.
39. Van Weel P. Algunas notas sobre el caracol gigante africano. *Achatina fulica* Fer. Sobre su propagación en los trópicos asiáticos. En su importancia económica. Sobre su equilibrio biológico y sus medios de destrucción. Chronica Naturae 1949; 104: 241-243.
40. Prasad GS, Singh DR, Senani S, Medhi RP. Una forma respetuosa con el medio ambiente de mantener alejado al caracol gigante africano pateroso, *Achatina*

- fulica* Bowdich, de la base de datos mundial de especies invasoras. *Ciencia actual* 2004; 87: 1657-1659.
41. Meyer WM, Hayes AL, Meyer AL. giant african snail, *Achatina fulica*, as a snail predator. *American Malacological Bulletin* 2008; 24(1): 117-119.
 42. Thesin Rh, Sharma SK. Primer registro del caracol de tierra africano gigante *Achatina fulica* de Rajasthan. *Zoo's Print Journal* 2000; 15(3): 231.
 43. Tillier S, Jackson G, MacFarlane R. caracol gigante africano. Folleto de Adivisión de Plagas – Comisión del pacífico del Sur 1993; 2(6): 4.
 44. Schostman SY. Data sheet on the giant african snail *Achatina fulica* Bowdich (Mollusca) (Achatinidae). *RLAC-PROVEG* 1989; 16/17(2): 59-63.
 45. Zhong J, Wang W, Yang X, Yan R, Lui R. A novel cysteine-rich antimicrobial peptide from the mucus of the snail of *Achatina fulica*. *Science Direct* 2013; 39 (1): 1-5.
 46. Kobon T, Thongararm P, Roytrakul S, Meesuk L, Chumnannuen P, Prediction of anticancer peptides against MCF-7 breast cancer cells from the peptidones of *Achatina fulica* mucus fractions. *Biotechnology Journal* 2016; 14(1): 49-57.
 47. Martini RL, Dorta CA. Emergencias en América, *Angiostrongylus cantonensis*. 1ª ed. Habana: Academia; 2016.
 48. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Plan Interinstitucional del Sector Ambiental para el Manejo y control del caracol gigante africano (*Achatina fulica*) [Internet]. Colombia; 2011. [Fecha de acceso 18 de junio del 2018]. URL disponible en: https://web.observatorio.co/publicaciones/achatina_fulica_plan_interinstitucional_de_manejo.pdf.

49. Poucher C. Erradication of the giant african snail in Florida. In Proceedings, the Florida State. Horticultural Society 1975; 523-524.
50. Mead AR. The giant african snail: A problem in economic malacology. Chicago, USA: University of Chicago Press 1961; 257.
51. Convenio sobre la Diversidad Bilógica. Brasil: Organización de las Naciones Unidas; 1992.
52. Decreto Supremo N° 102-2001-PCM. Perú: Estado Peruano. Presidente de la República; 2001.
53. Decreto Supremo N° 009-2014-MINAM. Perú: Ministerio del Ambiente; 2014.
54. Ley Forestal y de Fauna Silvestre N° 29763 y sus reglamento. Ministerio de Agricultura y Riego. Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre; 2015.
55. Molina Noel. Uso de los extractos botánicos en control de plagas y enfermedades. Revista Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 2001; 59: 76-77.
56. Carrión Jara AV, García GC. Preparación de extractos vegetales, determinación de eficiencia de metódica. [Tesis de grado]. Ecuador: Escuela de Bioquímica y Farmacia. Universidad de Cuenca; 2010.
57. Casillas Navarrete I. Propuesta de una práctica de extracción líquida en una etapa para el laboratorio de introducción a los procesos de separación. [Tesis para optar el Título de Ingeniero Químico Industrial]. México: Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas. Instituto Politécnico Nacional; 2014.
58. Ángeles Méndez. Reflujo. La guía (química orgánica) [en línea]. 2010. [5 de agosto del 2018] URL disponible en: <http://química.laguia2000.com/quimica-organica/reflujo>.

59. Sharapin N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. 1ª ed. Colombia: Convenio Andrés Bello (organization); 2000.
60. Fernández MJ. Rojas VJ. Estudios molusquicidas en sustancias naturales derivadas de plantas. 1ª ed. Venezuela: Editorial Académica Española; 2014.
61. Litter Manuel. Compendio de Farmacología. 5ª ed. Buenos Aires: El Ateneo; 2003.
62. Diccionario de Ciencias Médicas Dorland. Comité consultivo. 7ª ed. Barcelona: El Ateneo; 1981.
63. Manual agricultura alternativa: Principios. Cuidando la creación. Vol 2. Bogotá: San Pablo; 2004.
64. Romero R. Microbiología y Parasitología Humana/ Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.
65. UICN. International Union for Conservation of Nature. Suiza: Artgraphic Cavin SA; 2017.
66. Perú. Ministerio De Agricultura y Riego SENASA. [Internet] 2015. [Fecha de acceso 06 de Noviembre 2018]. URL disponible en: <http://www.minagri.gob.pe/portal/nosotros/historia>
67. Campos Gómez I. Saneamiento ambiental. 1ª ed. Costa Rica: UENED; 2000
68. Nina Den Holder G. intoxicación por metaldehído en animales domésticos. 1ª ed. España: Universidad Zaragoza; 2016.
69. Roca W. Mroginski L. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. 2ª ed. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical; 1993.

70. Gimeno Creus E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. Revista Offam 2004; 23(6): 80-84.
71. Álvarez AC, Lock de Ugaz O. Taninos. Revista de Química 1992; VI: 47-63.
72. Aguilar Barojas S. Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. Salud en Tabasco 2005; 11(1-2): 333-338.
73. Nieto S, Rodríguez M. Investigación y evaluación educativa en la sociedad del conocimiento. 1ª ed. España: Gráficas Varona S.A; 2010.
74. Remington Price J. Farmacia. 20ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2003.
75. Peña NB, Morejón RZ, García HA, Morón RF. Estandarización y tamizaje fitoquímico de extractos de frutos de *Punica granatum* L. Revista Cubana de Plantas Medicinales 2008; 13(4): 65-68.

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de Consistencia

EFFECTO MOLUSQUICIDA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Luma chequen</i> (MOLINA) A. GRAY (ARRAYÁN) Y EXTRACTO ACUOSO DE LA CÁSCARA DEL FRUTO <i>Punica granatum</i> L. (GRANADA) EN <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> BOWDICH, 1822 (CARACOL AFRICANO)”						
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES		METODOLOGÍA	INTRUMENTOS
					Observacional	
			VARIABLE INDEPENDIENTE	INDICADORES	TIPO	
¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y el extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) poseerá efecto molusquicida en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano)?	Determinar el efecto molusquicida del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano).	El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y el extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) tienen efecto molusquicida en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano).	Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	Compuestos Fenólicos, Alcaloides, Taninos, Flavonoides y Aminoácidos Compuestos Fenólicos, Taninos, Quinonas, Alcaloides y Flavonoides	Experimental Prospectivo Longitudinal Cuantitativo	Identificación de los metabolitos bioactivos. Determinar el efecto molusquicida en el extracto hidroalcohólico de las de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto de <i>Punica granatum</i> L. (granada) en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano)
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLE DEPENDIENTE	INDICADORES	NIVEL	
1. ¿Cuáles serán los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) que posiblemente influyen en el efecto molusquicida en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano)?	1. Identificar metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) que influyen en el efecto molusquicida en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano)	1. El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) tienen metabolitos secundarios que influyen en el efecto molusquicida en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano).	Efecto molusquicida	Porcentaje de mortalidad de los caracoles africanos depende del Porcentaje de la pérdida de la secreción del caracol africano	Básico	
2. ¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) poseerá efecto molusquicida en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano)?	1. Evaluar el efecto molusquicida del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano)	2. El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) posee efecto molusquicida en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano)			Diseño Experimental: El proceso se realizará en dos etapas: Primera etapa: Primera etapa: Técnica de elaboración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto de <i>Punica granatum</i> L. (granada), marcha de solubilidad e identificación de los metabolitos secundarios de las muestras correspondientes. Segunda etapa: Técnica para determinar el efecto molusquicida de los extractos botánicos en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano).	
3. ¿El extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) poseerá efecto molusquicida en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano)?	2. Evaluar el efecto molusquicida del extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano).	3. El extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) posee efecto molusquicida en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano).				
3. ¿La combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) poseerá efecto sinérgico molusquicida en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano)?	4. Evaluar el efecto sinérgico molusquicida en la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano).	5. La combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada) posee efecto sinérgico molusquicida en <i>Achatina (Lissachatina) fulica</i> Bowdich, 1822 (caracol africano).				

Anexo 2. Clasificación taxonómica de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, "arrayán", constancia otorgada por el Museo de Historia Natural de la UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 15-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (rama fértil) recibida de **Reyna Alejandrina TORRES FERNANDEZ**, Bachiller en Farmacia y Bioquímica, Universidad Inca Garcilaso de la Vega; ha sido estudiada y clasificada como ***Luma chequen*** (Molina) A. Gray y tiene la siguiente posición taxonómica; según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: MYRTALES

FAMILIA: MYRTACEAE

GENERO: *Luma*

ESPECIE: *Luma chequen* (Molina) A. Gray

Nombre vulgar: "Arrayán"

Determinado por Blgo. Severo Baldeón Malpartida

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 18 de enero de 2018


Mag. ASUNCIÓN CANO ECHEVARRIA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



ACE/yr.

Anexo 3. Clasificación taxonómica de *Punica granatum* L. (granada), constancia otorgada por el Museo de Historia Natural de la UNMSM



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 29-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa), recibida de **Reyna Alejandrina TORRES FERNANDEZ**; bachiller en Farmacia y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; ha sido estudiada y clasificada como: ***Punica granatum* L.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: MYRTALES

FAMILIA: PUNICACEAE

GENERO: Punica

ESPECIE: *Punica granatum* L.

Nombre vulgar: "Granada"

Determinado por: Dra. Mónica Arakaki

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 26 de enero de 2018


Mag. ASUNCIÓN A. CANO-ECHENARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



ACE/yr.

Anexo 4. Identificación de la especie *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 “Caracol africano” otorgada por el Museo de Historia Natural de la UNMSM.



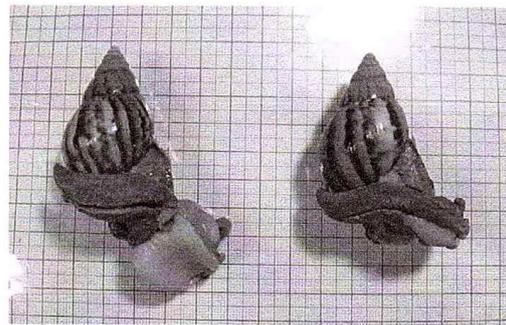
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



IDENTIFICACIÓN DE CARACOL TERRESTRE

Mediante la presente se entrega la identificación de la especie de dos ejemplares de caracol terrestre, a solicitud de la interesada, quien dejó los siguientes datos:

NOMBRES: REYNA ALEJANDRINA
APELLIDOS: TORRES FERNANDEZ
Bachiller en Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica
UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
DNI: 42515312
CORREO :reyna_aleja@hotmail.com
TELEFONO CELULAR: 956866210
MUESTRA
NOMBRE COMUN: Caracol Africano
PROCEDENCIA
ANEXO: PAMPA SILVA
DISTRITO: Perene
PROVINCIA: Chanchamayo
DEPARTAMENTO: Junín



Los dos ejemplares en alcohol recibidos corresponden a individuos jóvenes de la especie:

***Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822**
Nombre común: Caracol Africano

Es una especie cuya distribución nativa es el este de África. Al presente es una plaga de cultivos, con su distribución expandida en Africa, India, SE Asia, Pacífico, Caribe y América. En el Perú ya ha sido encontrada en varias regiones. También se ha reportado que es hospedero intermediario del nemátodo pulmonar de la rata *Angiostrongylus cantonensis*, que causa la meningitis eosinofílica en humanos.

La interesada se lleva las muestras.

Atentamente,

Dra. RINA LASTENIA RAMÍREZ MESÍAS
Jefe del Departamento de Malacología

Lima, 23 de abril del 2018.

Anexo 5. Certificado de calibración otorgado por Advanced Metrology de la balanza no automática (CI-21813) página 1 de 2.



SERVICIO DE ASEGURAMIENTO METROLÓGICO

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN N°: 58064-6274-CLM-2018

Expediente : 5979-16388-2018
 Página : 1 de 2
 Fecha de emisión : 2018 - 03 - 21

1. SOLICITANTE : TORRES FERNANDEZ REYNA ALEJANDRINA
 DIRECCIÓN : Mza. k Lt. 21 Urb. Vipol de Naranjal Piso 2, San Martin de Porres, Lima, Lima.
2. INSTRUMENTO DE MEDICIÓN : BALANZA NO AUTOMÁTICA
 MARCA : No Indica CAPACIDAD MÁXIMA : 2000 g
 MODELO : No Indica DIVISION DE ESCALA (d) : 0,1 g
 N° SERIE : No Indica DIV. DE VERIFICACIÓN (e) : 0,1 g
 PROCEDENCIA : China CLASE DE EXACTITUD : NO INDICA
 CÓDIGO. IDENTIF : CI-21813 (*)
 TIPO : Electrónica
 UBICACIÓN : No Indica

3.- FECHA Y LUGAR DE MEDICIÓN.
 La calibración se realizó el día 21 de marzo del 2018 en las instalaciones de ADVANCED METROLOGY S.A.C.

4. MÉTODO.
 La calibración se efectuó por comparación con los patrones de referencia que tienen trazabilidad al SNM -INDECOPI. Se usó como referencia el Procedimiento para la calibración de balanzas de funcionamiento no automático Clase I y II, PC - 011 del SNM - INDECOPI.

5. PATRÓN DE REFERENCIA.

PATRÓN UTILIZADO	CAPACIDAD	MARCA	N° DE CERTIFICADO	TRAZABILIDAD
JUEGO DE PESAS E2	1 mg a 1 kg	METTLER TOLEDO	LM-C-214-2017	INACAL

6. CONDICIONES AMBIENTALES.
 La calibración se realizó bajo las siguientes condiciones ambientales:
 Temperatura : 21,3 °C a 21,3 °C Humedad Relativa : 61 % a 61 %
 Presión Atmosférica : 1004,3 mbar a 1004,1 mbar

7. OBSERVACIONES.
 Los resultados de las mediciones efectuadas se muestran en la página 02 del presente documento. Para el cálculo de la incertidumbre de medición se utilizó un factor de cobertura k=2 que corresponde a un nivel de confianza de aproximadamente 95 %.
 Con fines de identificación se colocó una etiqueta autoadhesiva de color verde con la indicación de "CALIBRADO". Verificar la indicación de cero y el nivel del instrumento antes de cada medición.
 La periodicidad de la calibración depende del uso, mantenimiento y conservación del instrumento de medición. El equipo no indica clase de exactitud, pero se le asignó el error máximo permitido de una balanza no automática de clase II
 (*) Código Asignado por ADVANCED METROLOGY S.A.C.

César Toledo Baca
 Gerencia Técnica



PROHIBIDA LA REPRODUCCION TOTAL O PARCIAL DE ESTE DOCUMENTO SIN AUTORIZACION ESCRITA DE ADVANCED METROLOGY SAC

Jr. Tnte. Aristides del Carpio N° 1626 Urb. Los Cipreces - Cercado de Lima, Lima - Perú Telf.: (511) 564-5492 / 5645244 / 5640612 / 5645937 / 5642046
 Cel.: 990381037 / 958800968 / 976950160 / 963754100 / 994194670 / 981167242 E-mail: ventas@ametrology.pe / www.ametrology.com

Anexo 5: Certificado de calibración otorgado por Advanced Metrology de la balanza no automática (CI-21813) página 2 de 2.



SERVICIO DE ASEGURAMIENTO METROLÓGICO

Certificado N°: 58064-6274-CLM-2018
Pág. 2 de 2

INSPECCIÓN VISUAL			
AJUSTE DE CERO	TIENE	ESCALA	NO TIENE
OSCILACION LIBRE	TIENE	CURSOR	NO TIENE
PLATAFORMA	TIENE	NIVELACION	NO TIENE
SISTEMA DE TRABA	NO TIENE		

ENSAYO DE REPETIBILIDAD

Medición N°	Temp. (°C)								
	Inicial			Final					
	21,3			21,4					
Carga L1 =	1000,0 g			Carga L2 =			2000,0 g		
	I (g)	Δ L (mg)	E (mg)	I (g)	Δ L (mg)	E (mg)			
1	1000,0	80	-10	2000,0	70	-20			
2	1000,0	60	-10	2000,0	70	-20			
3	1000,0	60	-10	2000,0	70	-20			
4	1000,0	80	-30	2000,0	60	-10			
5	1000,0	80	-30	2000,0	60	-10			
6	1000,0	80	-30	2000,0	80	-30			
7	1000,0	70	-20	2000,0	80	-30			
8	1000,0	70	-20	2000,0	80	-30			
9	1000,0	70	-20	2000,0	60	-10			
10	1000,0	70	-20	2000,0	60	-10			
Diferencia Máxima							20		
error máximo permitido ±	100 mg			±			100 mg		

2	3
1	
5	4

ENSAYO DE EXCENTRICIDAD

Posición de carga	Carga (g)	Temp. (°C)							
		Inicial		Final					
		21,4		21,6					
Carga L (g)	Carga mínima*	Determinación de Eo			Determinación del Error corregido				
		I (g)	Δ L (mg)	Eo (mg)	I (g)	Δ L (mg)	E (mg)	Ec (mg)	
1	1,0	1,0	80	-30	700,0	700,0	20	30	60
2		1,0	80	-30		700,0	60	-10	20
3		1,0	80	-30		700,0	60	-10	20
4		1,0	70	-20		700,0	60	-10	10
5		1,0	70	-20		700,0	40	10	30
* valor entre 0 y 10 e					Error máximo permitido: ± 100 mg				

ENSAYO DE DESAJE

Carga L (g)	Temp. (°C)				e.m.p. (**)
	Inicial		Final		
L (g)	CRECIENTES				e.m.p. (**)
	I (g)	Δ L (mg)	E (mg)	Ec (mg)	
1	1,0	80	-30		100
10	10,0	80	-30	0	100
20	20,0	60	-10	20	100
50	50,0	60	-10	20	100
100	100,0	60	-10	20	100
200	200,0	60	-10	20	100
300	300,0	60	-10	20	100
400	400,0	20	30	60	100
500	500,0	20	30	60	100
1000	1000,0	70	-20	10	100
1500	1500,0	70	-20	10	100
2000	2000,0	70	-20	10	100

(**) emp= error máximo permitido

Incertidumbre Expandida: $U = 81,81 \text{ mg} + 0,0001089 \times I^*$
Lectura Corregida: $I(L)_{\text{corregida}} = I(L) - 0,000067188 \times I(L)$

- I : Indicación del instrumento E₀ : Error en cero
 ΔL : Carga añadida E_c : Error corregido
 E : Error del instrumento I* : Indicación del instrumento en miligramos



PROHIBIDA LA REPRODUCCION TOTAL O PARCIAL DE ESTE DOCUMENTO SIN AUTORIZACION ESCRITA DE ADVANCED METROLOGY SAC

Jr. Tnte. Aristides del Carpio N° 1626 Urb. Los Cipreces - Cercado de Lima, Lima - Perú Telf.: (511) 564-5492 / 5645244 / 5640612 / 5645937 / 5642046
 Cel.: 990381037 / 958800968 / 976950160 / 963754100 / 994194670 / 981167242 E-mail: ventas@ametrology.pe / www.ametrology.com

Anexo 6. Certificado de calibración del patrón utilizado (balanza Mettler Toledo) serie 158857, otorgado por el INACAL página 1 de 4.



INACAL
Instituto Nacional
de Calidad
Metrología

Laboratorio de Masas

Certificado de Calibración

LM - C - 214 - 2017

Consistente con las capacidades de medida y
Calibración (CMC – MRA)

Página 1 de 4

Expediente	94258	<p>Este certificado de calibración documenta la trazabilidad a los patrones nacionales, que realizan las unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI)</p> <p>Este certificado es consistente con las capacidades que se incluyen en el Apéndice C del MRA elaborado por el CIPM. En el marco del MRA, todos los institutos participantes reconocen entre sí la validez de sus certificados de calibración y medición para las magnitudes, alcances e incertidumbres de medición especificados en el Apéndice C (para más detalles ver http://www.bipm.org).</p> <p><i>This certificate is consistent with the capabilities that are included in Appendix C of the MRA drawn up by the CIPM. Under the MRA, all participating institutes recognize the validity of each other's calibration and measurement certificates for the quantities, ranges and measurement uncertainties specified in Appendix C (for details see http://www.bipm.org).</i></p>
Solicitante	ADVANCED METROLOGY S.A.C.	
Dirección	Tnte. Aristides del Carpio N° 1626 Urb. Los Cipreses - Cercado de Lima	
Patrón de Medición	PESAS	
Valor Nominal	1 mg a 1 kg	
Clase de Exactitud	E2	
Material	ACERO INOXIDABLE	
Marca	METTLER TOLEDO	
Procedencia	NO INDICA	
Número de Serie	158857	
Cantidad	25	
Fecha de Calibración	2017-05-03 al 2017-05-04	



Este certificado de calibración sólo puede ser difundido completamente y sin modificaciones. Los extractos o modificaciones requieren la autorización de la Dirección de Metrología del INACAL. Certificados sin firma y sello carecen de validez.

Fecha	Responsable del Area de Mecánica	Responsable del laboratorio
2017-05-04	 ALDO QUIROGA ROJAS	 LUZ MARINA CORI ALMONTE



Instituto Nacional de Calidad - INACAL
Dirección de Metrología
Calle Las Camelias N° 817, San Isidro, Lima – Perú
Telf.: (01) 640-8820 Anexo 1501
email: metrologia@inacal.gob.pe
Web: www.inacal.gob.pe



Anexo 6: Certificado de calibración del patrón utilizado (balanza Mettler Toledo) serie 158857, otorgado por el INACAL página 2 de 4.



INACAL
Instituto Nacional
de Calidad
Metrología
Laboratorio de Masas

Certificado de Calibración LM - C - 214 - 2017

Consistente con las capacidades de medida y
Calibración (CMC - MRA)

Página 2 de 4

Método de Calibración

La calibración fue ejecutada mediante comparación con los patrones de referencia del laboratorio de calibración según el método de sustitución con corrección del empuje del aire

Lugar de Calibración

Laboratorio de Masas
Calle De la Prosa N° 150, San Borja - Lima

Condiciones Ambientales

	INICIAL	FINAL
Temperatura	20,89 °C	20,90 °C
Humedad Relativa	55,3 %	55,4 %
Presión Atmosférica	993 mbar	992 mbar

Patrones de referencia

Trazabilidad	Patrón utilizado	Certificado de calibración
Patrones de referencia del Centro Español de Metrología	PESAS (Clase de exactitud E1)	150033005

Observaciones

Manipular las pesas con cuidado y mantenerlas limpias para evitar la alteración de su masa.
Se ha considerado para la determinación de la masa una densidad : 7 950 kg/m³.
La pesa con valor nominal de 100 g presenta un error mayor al error máximo permitido para pesas de clase de exactitud E2
Con fines de identificación se ha colocado una etiqueta autoadhesiva de color verde INACAL - DM a la caja que contiene a las pesas.

Instituto Nacional de Calidad - INACAL
Dirección de Metrología
Calle Las Camelias N° 817, San Isidro, Lima - Perú
Telf.: (01) 640-8820 Anexo 1501
email: metrologia@inacal.gob.pe
WEB: www.inacal.gob.pe



Anexo 6: Certificado de calibración del patrón utilizado (balanza Mettler Toledo) serie 158857, otorgado por el INACAL página 3 de 4.



INACAL
Instituto Nacional
de Calidad
Metrología
Laboratorio de Masas

**Certificado de Calibración
LM - C - 214 - 2017**

Consistente con las capacidades de medida y
Calibración (CMC – MRA)

Página 3 de 4

Resultados de Medición

Masa convencional y error máximo permitido de conformidad con OIML R 111 - 2004 y NMP-004-2007

VALOR NOMINAL	IDENTIF.	MASA CONVENCIONAL	INCERTIDUMBRE	FORMA	MATERIAL	ERROR MÁXIMO PERMITIDO E ₂
1 mg	--	1 mg + 0,002 mg	0,002 mg	HILO	ACERO INOXIDABLE	0,006 mg
2 mg	--	2 mg + 0,002 mg	0,002 mg	HILO	ACERO INOXIDABLE	0,006 mg
2 mg	(-)	2 mg + 0,003 mg	0,002 mg	HILO	ACERO INOXIDABLE	0,006 mg
5 mg	--	5 mg + 0,003 mg	0,002 mg	HILO	ACERO INOXIDABLE	0,006 mg
10 mg	--	10 mg + 0,001 mg	0,003 mg	HILO	ACERO INOXIDABLE	0,006 mg
20 mg	--	20 mg + 0,002 mg	0,003 mg	HILO	ACERO INOXIDABLE	0,010 mg
20 mg	(-)	20 mg + 0,001 mg	0,003 mg	HILO	ACERO INOXIDABLE	0,010 mg
50 mg	--	50 mg - 0,003 mg	0,004 mg	HILO	ACERO INOXIDABLE	0,012 mg
100 mg	--	100 mg - 0,002 mg	0,005 mg	HILO	ACERO INOXIDABLE	0,016 mg
200 mg	--	200 mg + 0,003 mg	0,006 mg	HILO	ACERO INOXIDABLE	0,020 mg
200 mg	(-)	200 mg - 0,000 mg	0,006 mg	HILO	ACERO INOXIDABLE	0,020 mg
500 mg	--	500 mg - 0,004 mg	0,008 mg	HILO	ACERO INOXIDABLE	0,025 mg
1 g	--	1 g - 0,022 mg	0,010 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,03 mg
2 g	--	2 g - 0,002 mg	0,012 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,04 mg
2 g	(.)	2 g + 0,002 mg	0,012 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,04 mg
5 g	--	5 g - 0,002 mg	0,016 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,05 mg
10 g	--	10 g - 0,051 mg	0,020 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,06 mg
20 g	--	20 g + 0,014 mg	0,025 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,08 mg
20 g	(.)	20 g + 0,011 mg	0,025 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,08 mg
50 g	--	50 g - 0,09 mg	0,03 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,10 mg
100 g	--	100 g - 0,19 mg	0,05 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,16 mg
200 g	--	200 g + 0,14 mg	0,10 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,3 mg
200 g	(.)	200 g - 0,29 mg	0,10 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,3 mg
500 g	--	500 g - 0,19 mg	0,25 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,8 mg
1 kg	--	1 kg - 0,5 mg	0,5 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	1,6 mg

NOTA: La caja que contiene a las pesas está identificada con el código 0517-AM



Instituto Nacional de Calidad - INACAL
Dirección de Metrología
Calle Las Camelias N° 817, San Isidro, Lima - Perú
Telf.: (01) 640-8920 Anexo 1501
email: metrologia@inacal.gob.pe
WEB: www.inacal.gob.pe



Anexo 6: Certificado de calibración del patrón utilizado (balanza Mettler Toledo) serie 158857, otorgado por el INACAL página 4 de 4.



INACAL
Instituto Nacional
de Calidad

Metrología
Laboratorio de Masas

Certificado de Calibración LM - C - 214 - 2017

Consistente con las capacidades de medida y
Calibración (CMC - MRA)

Página 4 de 4

Incertidumbre

La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición que resulta de multiplicar la incertidumbre estándar combinada por el factor de cobertura $k=2$. La incertidumbre fue determinada según la "Guía para la Expresión de la Incertidumbre en la Medición", segunda edición, julio del 2001 (Traducción al castellano efectuada por Indecopi, con autorización de ISO, de la GUM, "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement", corrected and reprinted in 1995, equivalente a la publicación del BIPM JCGM:100 2008, GUM 1995 with minor corrections "Evaluation of Measurement Data - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement").

La incertidumbre expandida de medición fue calculada a partir de los componentes de incertidumbre de los factores de influencia en la calibración. La incertidumbre indicada no incluye una estimación de variaciones a largo plazo.

Puesto que en general no se indica covariancias, hay que sumar para combinaciones de pesas las incertidumbres según la fórmula:

$$u_g = \sum u_i$$

siendo u_g la incertidumbre total y u_i las incertidumbres de las pesas empleadas.

Recalibración

Los resultados son válidos en el momento de la calibración. Al solicitante le corresponde disponer en su momento la ejecución de una recalibración, la cual está en función del uso, conservación y mantenimiento del instrumento de medición o a reglamentaciones vigentes.

DIRECCION DE METROLOGIA

El Servicio Nacional de Metrología (actualmente la Dirección de Metrología del INACAL), fue creado mediante Ley N° 23560 el 6 enero de 1983 y fue encomendado al INDECOPI mediante Decreto Supremo DS-024-93 ITINCI.

El 11 de julio 2014 fue aprobada la Ley N° 30224 la cual crea el Sistema Nacional de Calidad, y tiene como objetivo promover y garantizar el cumplimiento de la Política Nacional de Calidad para el desarrollo y la competitividad de las actividades económicas y la protección del consumidor.

El Instituto Nacional de Calidad (INACAL) es un organismo público técnico especializado adscrito al Ministerio de Producción, es el cuerpo rector y autoridad técnica máxima en la normativa del Sistema Nacional de la Calidad y el responsable de la operación del sistema bajo las disposiciones de la ley, y tiene en el ámbito de sus competencias: Metrología, Normalización y Acreditación.

La Dirección de Metrología del INACAL cuenta con diversos Laboratorios Metrológicos debidamente acondicionados, instrumentos de medición de alta exactitud y personal calificado. Cuenta con un Sistema de Gestión de la Calidad basado en las Normas ISO 17034 e ISO/IEC 17025 con lo cual se constituye en una entidad capaz de brindar un servicio integral, confiable y eficaz de aseguramiento metrológico para la industria, la ciencia y el comercio.

La Dirección de Metrología del INACAL cuenta con la cooperación técnica de organismos metrológicos internacionales de alto prestigio tales como: el Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB) de Alemania; el Centro Nacional de Metrología (CENAM) de México; el National Institute of Standards and Technology (NIST) de USA; el Centro Español de Metrología (CEM) de España; el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) de Argentina; el Instituto Nacional de Metrología (INMETRO) de Brasil; entre otros.

LABORATORIO DE MASAS - LM

Diversos servicios del Laboratorio de Masas cuentan con el reconocimiento internacional ya que están incluidos en el Apéndice C, dentro del marco del Acuerdo de Reconocimiento Mutuo internacional (MRA) del Comité Internacional de Pesas y Medidas (CIPM) conforme puede verse en la base de datos internacional del Bureau International des Poids et Mesures BIPM en el siguiente link

http://www.bipm.org/exalead/kcdb/extra_kcdb.jsp?c=+12386644022181527139&C=eJylz2FlzWOIL8ij8HZ2cYp3LChzUvJrH BmiM8vKMnMzYtmMIQzq1MTi5lzQAKJBQwGDPE5uSB2AZgsZChil SplIM*ILHErzclhMDJgAAAuGRu6&p=AppC

Concordantemente todos estos servicios tienen su Sistema de Calidad aprobado por el Quality System Task Force (QSTF) que es el grupo encargado de evaluar los Sistemas de Calidad de los Institutos Nacionales de Metrología INMs del Sistema Interamericano de Metrología (SIM).

Instituto Nacional de Calidad - INACAL
Dirección de Metrología
Calle Las Camelias N° 817, San Isidro, Lima - Perú
Telf.: (01) 640-8620 Anexo 1501
email: metrologia@inacal.gob.pe
WEB: www.inacal.gob.pe



Anexo 7. Certificado de calibración otorgado por Advanced Metrology del termohigrómetro CI-21827, página 1 de 2



SERVICIO DE ASEGURAMIENTO METROLÓGICO

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN N° 58097-12706-CLT-2018

EXPEDIENTE : 5979-16389-2018
PÁGINA : 1 de 2
FECHA DE EMISIÓN : 2018-3-21

1. SOLICITANTE : YARASCO ATOC IGNACIO LUIS - BOTICA DIVINO CORAZON DE JESUS
DIRECCIÓN : Jr. Atahualpa 352 Dpto. A Urb. El Trebol Etapa II, Los Olivos, Lima, Lima.
2. INSTRUMENTO DE MEDICIÓN : TERMOHIGROMETRO
MARCA : TAYLOR MODELO : NO INDICA
PROCEDENCIA : CHINA NRO. SERIE : NO INDICA
IDENTIFICACIÓN : CI-21827 (*)
UBICACIÓN : NO INDICA

DESCRIPCIÓN	SENSOR DE HUMEDAD	SENSOR DE TEMPERATURA IN
ALCANCE DE INDICACIÓN	20 %HR a 95 %HR	0 °C a 50 °C
RESOLUCIÓN	1 %HR	0,1 °C

3. **FECHA Y LUGAR DE MEDICIÓN.**
La calibración se realizó el 21 de marzo del 2018 en las instalaciones de ADVANCED METROLOGY S.A.C.
4. **MÉTODO.**
La calibración se realizó por comparación directa, tomando como referencia el "Procedimiento para la calibración de Termohigrómetros digitales y analógicos" PCI-TTH-2006 de ADVANCED METROLOGY S.A.C.
5. **PATRÓN DE MEDICIÓN.**

INSTRUMENTO	MARCA	SENSOR	MODELO	N° DE CERTIFICADO	TRAZABILIDAD
TERMÓMETRO DIGITAL	LUTRON	PT100	TM-917	LT-401-2017	INACAL
TERMOHIGRÓMETRO	LUTRON	NO INDICA	MHB-382SD	LT-594-2017	INACAL

6. **CONDICIONES AMBIENTALES.**
La calibración se realizó bajo las siguientes condiciones ambientales
Temperatura : Inicial: 22,3 °C ; Final : 22,4 °C
Presión atmosférica : Inicial: 1,005,3 mbar ; Final : 1,005,5 mbar
Humedad Relativa : Inicial: 57,5 %hr ; Final : 59,7 %hr
7. **OBSERVACIONES.**
Los resultados de las mediciones efectuadas se muestran en la página 02 del presente documento.
Para el cálculo de la incertidumbre de medición se utilizó un factor de cobertura k=2 que corresponde a un nivel de confianza de aproximadamente 95 %.
Con fines de identificación se colocó una etiqueta autoadhesiva de color verde con la indicación "CALIBRADO".
La periodicidad de la calibración depende del uso, mantenimiento y conservación del instrumento de medición.
(*) Código asignado por Advanced Metrology S.A.C.


César Toledo Baco
Gerencia Técnica



PROHIBIDA LA REPRODUCCION TOTAL O PARCIAL DE ESTE DOCUMENTO SIN AUTORIZACION ESCRITA DE ADVANCED METROLOGY SAC

Jr. Tnte. Aristides del Carpio N° 1626 Urb. Los Cipreces - Cercado de Lima, Lima - Perú Telf.: (511) 564-5492 / 5645244 / 5640612 / 5645937 / 5642046
Cel.: 990381037 / 958800968 / 976950160 / 963754100 / 994194670 / 981167242 E-mail: ventas@ametrology.pe / www.ametrology.com

Anexo 7: Certificado de calibración otorgado por Advanced Metrology del termohigrómetro CI-21827, página 2 de 2



SERVICIO DE ASEGURAMIENTO METROLÓGICO

Certificado N°: 58097-12706-CLT-2018
PÁGINA: 2 de 2

RESULTADOS MEDICIONES DE TEMPERATURA

(IN)

INDICACIÓN DEL TERMÓMETRO	CORRECCIÓN	TEMPERATURA CONVENCIONALMENTE VERDADERA	INCERTIDUMBRE
(°C)	(°C)	(°C)	°C
15,0	0,5	15,5	0,36
25,0	0,2	25,2	0,36
30,0	0,6	30,6	0,36

Temperatura Convencionalmente Verdadera = Indicación del termómetro + corrección

RESULTADOS MEDICIONES DE HUMEDAD

INDICACIÓN DEL HIGRÓMETRO	CORRECCIÓN	HUMEDAD CONVENCIONALMENTE VERDADERA	INCERTIDUMBRE
(%HR)	(%HR)	(%HR)	%HR
45,0	-3,8	41,2	2,16
60,0	-1,2	58,8	2,16
75,0	1,6	76,6	2,16

Humedad Convencionalmente Verdadera = Indicación del Higrómetro + corrección

Tecnología Calidad



PROHIBIDA LA REPRODUCCION TOTAL O PARCIAL DE ESTE DOCUMENTO SIN AUTORIZACION ESCRITA DE ADVANCED METROLOGY SAC

Jr. Tnte. Aristides del Carpio N° 1626 Urb. Los Cipreces - Cercado de Lima, Lima - Perú Telf.: (511) 564-5492 / 5645244 / 5640612 / 5645937 / 5642046
Cel.: 990381037 / 958800968 / 976950160 / 963754100 / 994194670 / 981167242 E-mail: ventas@ametrology.pe / www.ametrology.com

Anexo 8. Certificado de calibración del primer patrón utilizado (termómetro digital modelo TM-917), otorgado por el INACAL página 1 de 4



INACAL
Instituto Nacional
de Calidad
Metrología

Certificado de Calibración

LT - 401 - 2017

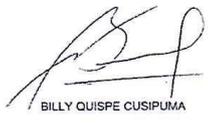
Laboratorio de Temperatura

Página 1 de 4

Expediente	96187	<p>Este certificado de calibración documenta la trazabilidad a los patrones nacionales, que realizan las unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI)</p> <p>La Dirección de Metrología custodia, conserva y mantiene los patrones nacionales de las unidades de medida, calibra patrones secundarios, realiza mediciones y certificaciones metrológicas a solicitud de los interesados, promueve el desarrollo de la metrología en el país y contribuye a la difusión del Sistema Legal de Unidades de Medida del Perú. (SLUMP).</p> <p>La Dirección de Metrología es miembro del Sistema Interamericano de Metrología (SIM) y participa activamente en las Intercomparaciones que éste realiza en la región.</p> <p>Con el fin de asegurar la calidad de sus mediciones el usuario está obligado a recalibrar sus instrumentos a intervalos apropiados.</p>
Solicitante	ADVANCED METROLOGY S.A.C.	
Dirección	Tnte. Aristides del Carpio N° 1626 Urb. Los Cipreses - Lima	
Instrumento de Medición	TERMOMETRO DE INDICACION DIGITAL	
Intervalo de Indicación	-199,99 °C a 850,0 °C (*)	
Resolución	0,01 °C ; 0,1 °C (**)	
Marca	LUTRON	
Modelo	TM-917	
Procedencia	TAIWAN	
Número de Serie	I.317253	
Elemento Sensor	Una termorresistencia de platino de 100 Ω	
Fecha de Calibración	2017-08-01 al 2017-08-02	



Este certificado de calibración sólo puede ser difundido completamente y sin modificaciones. Los extractos o modificaciones requieren la autorización de la Dirección de Metrología del INACAL. Certificados sin firma y sello carecen de validez.

Fecha	Responsable del Área de Electricidad y Termometría	Responsable del laboratorio
 2017-08-02	 ALDO QUIROGA ROJAS	 BILLY QUISEP CUSIPUMA

Instituto Nacional de Calidad - INACAL
Dirección de Metrología
Calle Las Camelias N° 817, San Isidro, Lima - Perú
Telf.: (01) 640-8820 Anexo 1501
Email: metrologia@inacal.gob.pe
Web: www.inacal.gob.pe

Anexo 8: Certificado de calibración del primer patrón utilizado (termómetro digital modelo TM-917), otorgado por el INACAL página 2 de 4.



INACAL
 Instituto Nacional
 de Calidad
 Metrología
 Laboratorio de Temperatura

Certificado de Calibración
LT – 401 – 2017

Página 2 de 4

Método de Calibración

Calibración por comparación siguiendo el procedimiento INDECOPI-SNM PC-017 "Procedimiento para la Calibración de Termómetros Digitales" (2da Edición Diciembre 2012)

Lugar de Calibración

Laboratorio de Temperatura
 Calle De la Prosa 150, San Borja - Lima

Condiciones Ambientales

Temperatura	23 °C ± 2 °C
Humedad Relativa	59 % ± 5 %

Patrones de referencia

Trazabilidad	Patrón utilizado	Certificado de calibración
Patrones de referencia de la Dirección de Metrología	Dos termómetros digitales con incertidumbres del orden desde 0,012 °C hasta 0,025 °C	LT-044-2017 Enero 2017
		LT-045-2017 Enero 2017

Observaciones

Con fines de identificación se ha colocado una etiqueta autoadhesiva de la Dirección de Metrología - INACAL. Las temperaturas convencionalmente verdaderas mostradas en los resultados de medición son las de la Escala Internacional de Temperatura de 1990 (International Temperature Scale (ITS-90)).
 (*) Para el indicador, según su manual; con termorresistencias de Pt 100.
 (**) La resolución del termómetro es de 0,01 °C desde -199,99 °C hasta 199,99 °C . Fuera de este alcance la resolución es de 0,1 °C ; según su manual.



Instituto Nacional de Calidad - INACAL
 Dirección de Metrología
 Calle Las Camelias N° 817, San Isidro, Lima – Perú
 Telf.: (01) 649-8820 Anexo 1501
 email: metrologia@inacal.gob.pe
 WEB: www.inacal.gob.pe

Anexo 8: Certificado de calibración del primer patrón utilizado (termómetro digital modelo TM-917), otorgado por el INACAL página 3 de 4.



INACAL
Instituto Nacional
de Calidad
Metrología
Laboratorio de Temperatura

**Certificado de Calibración
LT – 401 – 2017**

Página 3 de 4

Resultados de Medición

INDICACION DEL TERMOMETRO (°C)	TEMPERATURA CONVENCIONALMENTE VERDADERA (°C)	CORRECCION (°C)	INGERTIDUMBRE (°C)
-45,00	-44,734	0,266	0,024
-20,05	-19,947	0,103	0,021
0,01	0,042	0,032	0,020
40,00	39,868	-0,132	0,025
80,00	79,755	-0,245	0,024
150,05	149,551	-0,499	0,024
200,05	199,610	-0,440	0,025

La temperatura convencionalmente verdadera (TCV) resulta de la relación:
 $TCV = \text{Indicación del termómetro} + \text{corrección}$

Nota 1.- La profundidad de inmersión del sensor fue de 12 cm aproximadamente.

Nota 2.- Tiempo de estabilización no menor a 10 minutos.

Nota 3.- La identificación MT-2119 se encuentra grabada en una etiqueta adherida al mango del sensor.



Anexo 8: Certificado de calibración del primer patrón utilizado (termómetro digital modelo TM-917), otorgado por el INACAL página 4 de 4.



INACAL
Instituto Nacional
de Calidad

Metrología

Laboratorio de Temperatura

Certificado de Calibración LT – 401 – 2017

Página 4 de 4

Incertidumbre

La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición que resulta de multiplicar la incertidumbre estándar combinada por el factor de cobertura $k=2$. La incertidumbre fue determinada según la "Guía para la Expresión de la Incertidumbre en la Medición", segunda edición, julio del 2001 (Traducción al castellano efectuada por Indecopi, con autorización de ISO, de la GUM, "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement", corrected and reprinted in 1995, equivalente a la publicación del BIPM JCGM:100 2008, GUM 1995 with minor corrections "Evaluation of Measurement Data - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement").

La incertidumbre expandida de medición fue calculada a partir de los componentes de incertidumbre de los factores de influencia en la calibración. La incertidumbre indicada no incluye una estimación de variaciones a largo plazo.

Recalibración

Los resultados son válidos en el momento de la calibración. Al solicitante le corresponde disponer en su momento la ejecución de una recalibración, la cual está en función del uso, conservación y mantenimiento del instrumento de medición o a reglamentaciones vigentes.

DIRECCION DE METROLOGIA

El Servicio Nacional de Metrología (actualmente la Dirección de Metrología del INACAL), fue creado mediante Ley N° 23560 el 6 enero de 1983 y fue encomendado al INDECOPI mediante Decreto Supremo DS-024-93 ITINCI.

El 11 de julio 2014 fue aprobada la Ley N° 30224 la cual crea el Sistema Nacional de Calidad, y tiene como objetivo promover y garantizar el cumplimiento de la Política Nacional de Calidad para el desarrollo y la competitividad de las actividades económicas y la protección del consumidor.

El Instituto Nacional de Calidad (INACAL) es un organismo público técnico especializado adscrito al Ministerio de Producción, es el cuerpo rector y autoridad técnica máxima en la normativa del Sistema Nacional de la Calidad y el responsable de la operación del sistema bajo las disposiciones de la ley, y tiene en el ámbito de sus competencias: Metrología, Normalización y Acreditación.

La Dirección de Metrología del INACAL cuenta con diversos Laboratorios Metrológicos debidamente acondicionados, instrumentos de medición de alta exactitud y personal calificado. Cuenta con un Sistema de Gestión de la Calidad basado en las Normas ISO 17034 e ISO/IEC 17025 con lo cual se constituye en una entidad capaz de brindar un servicio integral, confiable y eficaz de aseguramiento metrológico para la industria, la ciencia y el comercio.

La Dirección de Metrología del INACAL cuenta con la cooperación técnica de organismos metrológicos internacionales de alto prestigio tales como: el Physikalische Technische Bundesanstalt (PTB) de Alemania; el Centro Nacional de Metrología (CENAM) de México; el National Institute of Standards and Technology (NIST) de USA; el Centro Español de Metrología (CEM) de España; el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) de Argentina; el Instituto Nacional de Metrología (INMETRO) de Brasil; entre otros.

SISTEMA INTERAMERICANO DE METROLOGIA- SIM

El Sistema Interamericano de Metrología (SIM) es una organización regional auspiciado por la Organización de Estados Americanos (OEA), cuya finalidad es promover y fomentar el desarrollo de la metrología en los países americanos. La Dirección de Metrología del INACAL es miembro del SIM a través de la subregión ANDIMET (Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela) y participa activamente en las Intercomparaciones realizadas por el SIM.

Anexo 9. Certificado de calibración del segundo patrón utilizado (termohigrómetro digital modelo MHB-382SD), otorgado por el INACAL página 1 de 4.



INACAL
Instituto Nacional
de Calidad
Metrología

Certificado de Calibración

LT - 594 - 2017

Laboratorio de Temperatura

Página 1 de 4

Expediente	97722	<p>Este certificado de calibración documenta la trazabilidad a los patrones nacionales, que realizan las unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI)</p> <p>La Dirección de Metrología custodia, conserva y mantiene los patrones nacionales de las unidades de medida, calibra patrones secundarios, realiza mediciones y certificaciones metrológicas a solicitud de los interesados, promueve el desarrollo de la metrología en el país y contribuye a la difusión del Sistema Legal de Unidades de Medida del Perú. (SLUMP).</p> <p>La Dirección de Metrología es miembro del Sistema Interamericano de Metrología (SIM) y participa activamente en las Intercomparaciones que éste realiza en la región.</p> <p>Con el fin de asegurar la calidad de sus mediciones el usuario está obligado a recalibrar sus instrumentos a intervalos apropiados.</p>
Solicitante	ADVANCED METROLOGY S.A.C.	
Dirección	Tnte. Arístides del Carpio N° 1626 Urb. Los Cipreses - Lima	
Instrumento de Medición	TERMOHIGROMETRO	
Indicación	DIGITAL	
Intervalo de Indicación	0 °C a 50 °C ; 10 %hr a 90 %hr (*)	
Resolución	0,1 °C ; 0,1 %hr	
Marca	LUTRON	
Modelo	MHB-382SD	
Procedencia	TAIWAN	
Número de Serie	AG.04386	
Fecha de Calibración	2017-11-09 al 2017-11-14	



Este certificado de calibración sólo puede ser difundido completamente y sin modificaciones. Los extractos o modificaciones requieren la autorización de la Dirección de Metrología del INACAL. Certificados sin firma y sello carecen de validez.

Fecha	Responsable del Área de Electricidad y Termometría	Responsable del laboratorio
2017-11-14	 EDWIN FRANCISCO GUILLEN MESTAS	 BILLY QUISPE CUSIPUMA



Instituto Nacional de Calidad - INACAL
Dirección de Metrología
Calle Las Camelias N° 817, San Isidro, Lima - Perú
Telf.: (01) 640-8820 Anexo 1501
Email: metrologia@inacal.gob.pe
Web: www.inacal.gob.pe

Anexo 9: Certificado de calibración del segundo patrón utilizado (termohigrómetro digital modelo MHB-382SD), otorgado por el INACAL página 2 de 4.



INACAL
Instituto Nacional
de Calidad
Metrología
Laboratorio de Temperatura

**Certificado de Calibración
LT – 594 – 2017**

Página 2 de 4

Método de Calibración

Calibración por comparación empleando cámaras de humedad y temperatura ambientales con condiciones controladas

Lugar de Calibración

Laboratorio de Higrometría
Calle De La Prosa N° 150, San Borja - Lima

Condiciones Ambientales

Temperatura	21 °C ± 2 °C
Humedad Relativa	65 % ± 5 %

Patrones de referencia

Trazabilidad	Patrón utilizado	Certificado de calibración
Patrones de referencia de la Dirección de Metrología	Termohigrómetro con incertidumbre de 1,4 %hr a 2,1 %hr	LT-746-2016 Noviembre 2016
	Termómetro Digital con incertidumbre de 0,012 °C a 0,024 °C	LT-039-2017 Enero 2017

Observaciones

(*) Dato tomado de su manual.

Con fines de identificación se ha colocado una etiqueta autoadhesiva de la Dirección de Metrología - INACAL. Las temperaturas convencionalmente verdaderas mostradas en los resultados de medición son las de la Escala Internacional de Temperatura de 1990 (International Temperature Scale ITS-90).



Instituto Nacional de Calidad - INACAL
Dirección de Metrología
Calle Las Camelias N° 817, San Isidro, Lima – Perú
Telf.: (01) 640-8820 Anexo 1501
email: metrologia@inacal.gob.pe
WEB: www.inacal.gob.pe

Anexo 9: Certificado de calibración del segundo patrón utilizado (termohigrómetro digital modelo MHB-382SD), otorgado por el INACAL página 3 de 4.



INACAL
 Instituto Nacional
 de Calidad
 Metrología
 Laboratorio de Temperatura

**Certificado de Calibración
 LT – 594 – 2017**

Página 3 de 4

Resultados de Medición

PARA EL TERMÓMETRO

INDICACIÓN DEL TERMÓMETRO (°C)	TEMPERATURA CONV. VERDADERA (°C)	CORRECCIÓN (°C)	INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN (°C)
14,8	15,0	0,2	0,25
24,8	24,9	0,1	0,2
30,0	30,0	0,0	0,2

La temperatura convencionalmente verdadera (TCV) resulta de la relación:
 $TCV = \text{Indicación del termómetro} + \text{corrección}$

PARA EL HIGRÓMETRO

INDICACIÓN DEL HIGRÓMETRO (%hr)	HUMEDAD RELATIVA CONV. VERDADERA (%hr)	CORRECCIÓN (%hr)	INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN (%hr)
36,9	33,0	-3,9	1,7
62,8	60,0	-2,8	2,0
89,6	90,0	0,4	2,3

La humedad relativa convencionalmente verdadera (HCV) resulta de la relación:
 $HCV = \text{Indicación del higrómetro} + \text{corrección}$

Nota 1.- El tiempo mínimo de estabilización fue al menos de 30 minutos.

Nota 2.- La identificación **0497-AM** está inscrita en una etiqueta adherida al barotermohigrómetro.



Anexo 9: Certificado de calibración del segundo patrón utilizado (termohigrómetro digital modelo MHB-382SD), otorgado por el INACAL página 4 de 4.



INACAL
Instituto Nacional
de Calidad
Metrología

Laboratorio de Temperatura

Certificado de Calibración LT – 594 – 2017

Página 4 de 4

Incertidumbre

La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición que resulta de multiplicar la incertidumbre estándar combinada por el factor de cobertura $k=2$. La incertidumbre fue determinada según la "Guía para la Expresión de la Incertidumbre en la Medición", segunda edición, julio del 2001 (Traducción al castellano efectuada por Indecopi, con autorización de ISO, de la GUM, "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement", corrected and reprinted in 1995, equivalente a la publicación del BIPM JCGM:100 2008, GUM 1995 with minor corrections "Evaluation of Measurement Data - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement").

La incertidumbre expandida de medición fue calculada a partir de los componentes de incertidumbre de los factores de influencia en la calibración. La incertidumbre indicada no incluye una estimación de variaciones a largo plazo.

Recalibración

Los resultados son válidos en el momento de la calibración. Al solicitante le corresponde disponer en su momento la ejecución de una recalibración, la cual está en función del uso, conservación y mantenimiento del instrumento de medición o a reglamentaciones vigentes.

DIRECCION DE METROLOGIA

El Servicio Nacional de Metrología (actualmente la Dirección de Metrología del INACAL), fue creado mediante Ley N° 23560 el 6 enero de 1983 y fue encomendado al INDECOPi mediante Decreto Supremo DS-024-93 ITINCI.

El 11 de julio 2014 fue aprobada la Ley N° 30224 la cual crea el Sistema Nacional de Calidad, y tiene como objetivo promover y garantizar el cumplimiento de la Política Nacional de Calidad para el desarrollo y la competitividad de las actividades económicas y la protección del consumidor.

El Instituto Nacional de Calidad (INACAL) es un organismo público técnico especializado adscrito al Ministerio de Producción, es el cuerpo rector y autoridad técnica máxima en la normativa del Sistema Nacional de la Calidad y el responsable de la operación del sistema bajo las disposiciones de la ley, y tiene en el ámbito de sus competencias: Metrología, Normalización y Acreditación.

La Dirección de Metrología del INACAL cuenta con diversos Laboratorios Metrológicos debidamente acondicionados, instrumentos de medición de alta exactitud y personal calificado. Cuenta con un Sistema de Gestión de la Calidad basado en las Normas ISO 17034 e ISO/IEC 17025 con lo cual se constituye en una entidad capaz de brindar un servicio integral, confiable y eficaz de aseguramiento metrológico para la industria, la ciencia y el comercio.

La Dirección de Metrología del INACAL cuenta con la cooperación técnica de organismos metrológicos internacionales de alto prestigio tales como: el Physikalisch Technische Bundesanstalt (PTB) de Alemania; el Centro Nacional de Metrología (CENAM) de México; el National Institute of Standards and Technology (NIST) de USA; el Centro Español de Metrología (CEM) de España; el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) de Argentina; el Instituto Nacional de Metrología (INMETRO) de Brasil; entre otros.

SISTEMA INTERAMERICANO DE METROLOGIA- SIM

El Sistema Interamericano de Metrología (SIM) es una organización regional auspiciado por la Organización de Estados Americanos (OEA), cuya finalidad es promover y fomentar el desarrollo de la metrología en los países americanos. La Dirección de Metrología del INACAL es miembro del SIM a través de la subregión ANDIMET (Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela) y participa activamente en las Intercomparaciones realizadas por el SIM.

Anexo 10. Validación de Instrumentos



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

HOJA DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS

“EFECTO MOLUSQUICIDA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Luma chequen* (MOLINA) A. GRAY (ARRAYÁN) Y EXTRACTO ACUOSO DE LA CÁSCARA DEL FRUTO *Punica granatum* L. (GRANADA) EN *Achatina (Lissachatina) fulica* BOWDICH, 1822 (CARACOL AFRICANO)

FICHA DE OBSERVACIÓN ADHOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Después de revisado el instrumento es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

MENOS DE:

- | | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| 1. ¿En qué porcentaje estima que con estos instrumentos Se lograrán los objetivos propuestos? | () | () | () | () | () | (/) |
| 2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidos a los conceptos del tema? | () | () | () | () | () | (/) |
| 3. ¿En qué porcentaje cree que los ítems planteados son suficientes para lograr los objetivos? | () | () | () | () | () | (/) |
| 4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de ejecución viable? | () | () | () | () | () | (/) |
| 5. ¿Qué porcentaje considera que los ítems siguen una secuencia lógica? | () | () | () | () | () | (/) |
| 6. ¿En qué porcentaje cree usted que con los instrumentos se obtendrán datos similares si se replicara con otras muestras? | () | () | () | () | () | (/) |

SUGERENCIAS:

1. ¿Qué ítems considera usted que deben agregarse?

Ninguno

2. ¿Qué ítems considera usted que deben eliminarse?

Ninguna

3. ¿Qué ítems considera usted que deben reformularse o precisarse mejor?

Ninguna

Fecha: 12-03-15

Validado por: Mg. Henry Montellanos Cabrera

Firma:

Mg. Q.F. Tox, Henry Montellanos Cabrera
QUÍMICO FARMACÉUTICO
C.Q.F.P. 7970
DNI: 25798967
R.N.E. 030

Anexo 10: Validación de Instrumentos



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

INSTRUMENTO DEL ENSAYO PARA DETERMINAR EL EFECTO MOLUSQUICIDA						
Grupo Experimental	Moluscos	Concentración del Extracto	Cantidad	Horario de Aspersión	Tiempo de Exposición	Porcentaje de mortalidad
Control Negativo (Agua destilada)	10		1 mL	7:00 a.m., 10:00 a.m., 1:00 p.m., 4:00 p.m., 7:00 p.m., 10:00 p.m.	24 H, 48 H, 72 H	0%
Control Positivo (Metaldehído)	10	5%	1 mL	7:15 a.m., 10:15 a.m., 1:15 a.m., 4:15 p.m., 7:15 p.m., 10:15 p.m.	24 H, 48 H, 72 H	100%
Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán)	10	100%	1 mL	7:33 a.m., 10:32 a.m., 1:33 p.m., 4:33 p.m., 7:33 p.m., 10:34 p.m.	24 H, 48 H, 72 H	100%
	10	50%	1 mL	7:48 a.m., 10:48 a.m., 1:48 p.m., 4:48 p.m., 7: 48 p.m., 10:48 p.m.	24 H, 48 H, 72 H	80%
	10	25%	1 mL	8:03 a.m., 11:03 a.m., 2:03 p.m., 5:03 p.m., 8:03 p.m., 11:03 p.m.	24 H, 48 H, 72 H	10%
	10	12.5%	1 mL	8:15 a.m., 11:15 a.m., 2:15 p.m., 5:15 p.m., 8:15 p.m., 11:15 p.m.	24 H, 48H, 72 H	0%
Extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	10	100%	1 mL	8:33 a.m., 11:32 a.m., 2:33 p.m., 5:33 p.m., 8:33 p.m., 11:33 p.m.	24 H, 48H, 72 H	80%
	10	50%	1 mL	8:48 a.m., 11:48 a.m., 2:48 p.m., 5:48 p.m., 8:48 p.m., 11:48 p.m.	24 H, 48H, 72 H	50%
	10	25%	1 mL	9:03 a.m., 12:03 p.m., 3:03 p.m., 6:03 p.m., 9:03 p.m., 12:03 a.m.	24 H, 48H, 72 H	0%
	10	12.5%	1 mL	9:18 a.m., 12:18 p.m., 3:18 p.m., 6:18 p.m., 9:18 p.m., 12: 18 a.m.	24 H, 48H, 72 H	0%
Combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	10	100%	1 mL	9:28 a.m., 12:28 p.m., 3:28 p.m., 6:28 p.m., 9:28 p.m., 12:28 a.m.	24 H, 48H, 72 H	100%
	10	50%	1 mL	9:35 a.m., 12:36 p.m., 3:36 p.m., 6:35 p.m., 9:35 p.m., 12:35 a.m.	24 H, 48H, 72 H	100%
	10	25%	1 mL	9:45 a.m., 12:45 p.m., 3:45 p.m., 6:45 p.m., 9:45 p.m., 12:45 a.m.	24 H, 48H, 72 H	20%
	10	12.5%	1 mL	9:55 a.m., 12:55 p.m., 3:55 p.m., 6:55 p.m., 9:55 p.m., 12:55 a.m.	24 H, 48H, 72 H	0%

Mg. Q.F. Tox. Henry Montalban Cabrerá
QUÍMICO FARMACÉUTICO
C.Q.F.P. 7970
DNI: 25796967
R.N.E. 030

Anexo 10: Validación de Instrumentos.



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

HOJA DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS

“EFECTO MOLUSQUICIDA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Luma chequen* (MOLINA) A. GRAY (ARRAYÁN) Y EXTRACTO ACUOSO DE LA CÁSCARA DEL FRUTO *Punica granatum* L. (GRANADA) EN *Achatina (Lissachatina) fulica* BOWDICH, 1822 (CARACOL AFRICANO)”

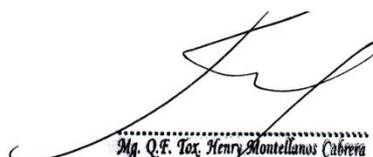
Ficha ad-hoc

INSTRUMENTO DEL ENSAYO DE SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO SECO DE LAS HOJAS DE *Luma chequen* (MOLINA) A. GRAY (ARRAYÁN) Y EXTRACTO SECO DE LA CÁSCARA DEL FRUTO *Punica granatum* L. (GRANADA)

Resultados de la prueba de solubilidad del extracto seco de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto seco de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)						
Muestra del extracto seco	Cloroformo	Isopropanol	Alcohol 96°	Etanol	Metanol	Agua destilada
<i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán)						
<i>Punica granatum</i> L. (granada)						

Leyenda:

- (-) No soluble
- (+) Poco soluble
- (++) Soluble
- (+++) Muy soluble


Mg. Q.F. Tor. Henry Montellanos Cabrera
QUÍMICO FARMACÉUTICO
C.O.F.P. 7970
DNI: 25796967
R.N.E. 030

Anexo 10: Validación de Instrumentos.



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

HOJA DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS

“EFECTO MOLUSQUICIDA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Luma chequen* (MOLINA) A. GRAY (ARRAYÁN) Y EXTRACTO ACUOSO DE LA CÁSCARA DEL FRUTO *Punica granatum* L. (GRANADA) EN *Achatina (Lissachatina) fulica* BOWDICH, 1822 (CARACOL AFRICANO)”

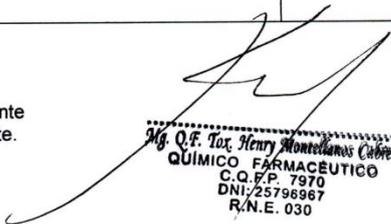
Ficha ad-hoc

INSTRUMENTO DE LA PRUEBA DE LA MARCHA FITOQUÍMICA PARA IDENTIFICAR METABOLITOS SECUNDARIOS EN EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Luma chequen* (MOLINA) A. GRAY (ARRAYÁN) Y EXTRACTO ACUOSO DE LA CÁSCARA DEL FRUTO *Punica granatum* L. (GRANADA)

Metabolitos secundarios	Reactivo de identificación	Resultados para el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán)	Resultados para el extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)
Alcaloides	Mayer		
	Wagner		
	Dragendorff		
	Scheibler		
	Sonneschein		
	Reineckato		
Flavonoides	Shinoda		
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico		
Taninos	Gelatina 1%		
Quinonas	Reacción de Bortranger		
Aminoácidos	Ninhidrina		

Leyenda:

- (-) La coloración o precipitado no se evidencia
- (+) La coloración o precipitado se evidencia poco
- (++) La coloración o precipitado se evidencia moderadamente
- (+++) La coloración o precipitado se evidencia notablemente.


Mg. Q.F. Tox. Henry Montelinos Cabrera
QUÍMICO FARMACÉUTICO
C.Q.F.P. 7970
DNI/25796967
R.N.E. 030

Anexo 10. Validación de Instrumentos



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

HOJA DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS

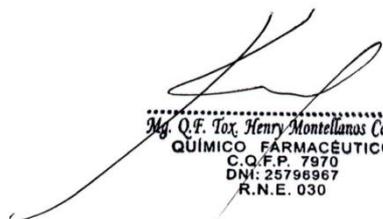
“EFECTO MOLUSQUICIDA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Luma chequen* (MOLINA) A. GRAY (ARRAYÁN) Y EXTRACTO ACUOSO DE LA CÁSCARA DEL FRUTO *Punica granatum* L. (GRANADA) EN *Achatina (Lissachatina) fulica* BOWDICH, 1822 (CARACOL AFRICANO)”

Ficha ad-hoc

INSTRUMENTO DE LA PRUEBA DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PARA SEPARAR FLAVONOIDES DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Luma chequen* (MOLINA) A. GRAY (ARRAYÁN) Y EXTRACTO ACUOSO DE LA CÁSCARA DEL FRUTO *Punica granatum* L. (GRANADA)

MUESTRA	FASE MOVIL	REVELADOR	Rf	MANCHA OBSERVADA (coloración)
Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán)	Metanol/ agua	Tricloruro de aluminio		
Extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	Metanol/ agua	Tricloruro de aluminio		

Estándar: cafeína 10mg/mL
RF: Distancia recorrida por M/P o Estándar/ Distancia recorrida por la fase móvil


Mg. Q.F. Tox. Henry Montellanos Cabrera
QUÍMICO FARMACÉUTICO
C.Q.F.P. 7970
DNI: 25796967
R.N.E. 030

Anexo 10: Validación de Instrumentos.



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

HOJA DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS

“EFECTO MOLUSQUICIDA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Luma chequen* (MOLINA) A. GRAY (ARRAYÁN) Y EXTRACTO ACUOSO DE LA CÁSCARA DEL FRUTO *Punica granatum* L. (GRANADA) EN *Achatina (Lissachatina) fulica* BOWDICH, 1822 (CARACOL AFRICANO)”

Ficha ad-hoc

INSTRUMENTO DE LA PRUEBA DE CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA PARA SEPARAR ALCALOIDES DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Luma chequen* (MOLINA) A. GRAY (ARRAYÁN) Y EXTRACTO ACUOSO DE LA CÁSCARA DEL FRUTO *Punica granatum* L. (GRANADA)

MUESTRA	FASE MOVIL	REVELADOR	RF	MANCHA OBSERVADA (coloración)
Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (arrayán)	Butanol/ Agua/ - Ácido acético glacial	Dragendorff		
Extracto acuoso de la cáscara del fruto <i>Punica granatum</i> L. (granada)	Butanol/ Agua/ - Ácido acético glacial	Dragendorff		

Estándar: Quercetina 10mg/mL
RF: Distancia recorrida por M/P o Estándar/Distancia recorrida por la fase móvil


Mg. Q.F. Tax. Henry Montellanos Cabrera
QUÍMICO FARMACÉUTICO
C.Q.F.P. 7970
DNI: 25796967
R.N.E. 030

Anexo 11. Testimonios fotográficos.

Fotografía 1: Recolección de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán), del distrito de Tapo, provincia de Tarma, departamento de Junín.



Fotografía 2: Recolección de los frutos de *Punica granatum* L. (granada) provincia de Cañete, departamento de Lima.



Fotografía 3: Proceso de selección, limpieza de las muestras de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) se colocaron bolsas de papel kraft para el proceso de secado a una temperatura de 40°C



Fotografía 4: Proceso de selección, limpieza de las muestras de las cáscaras del fruto *Punica granatum* L. (granada), se colocaron en bolsas de papel kraft para el proceso de secado a una temperatura de 40°C



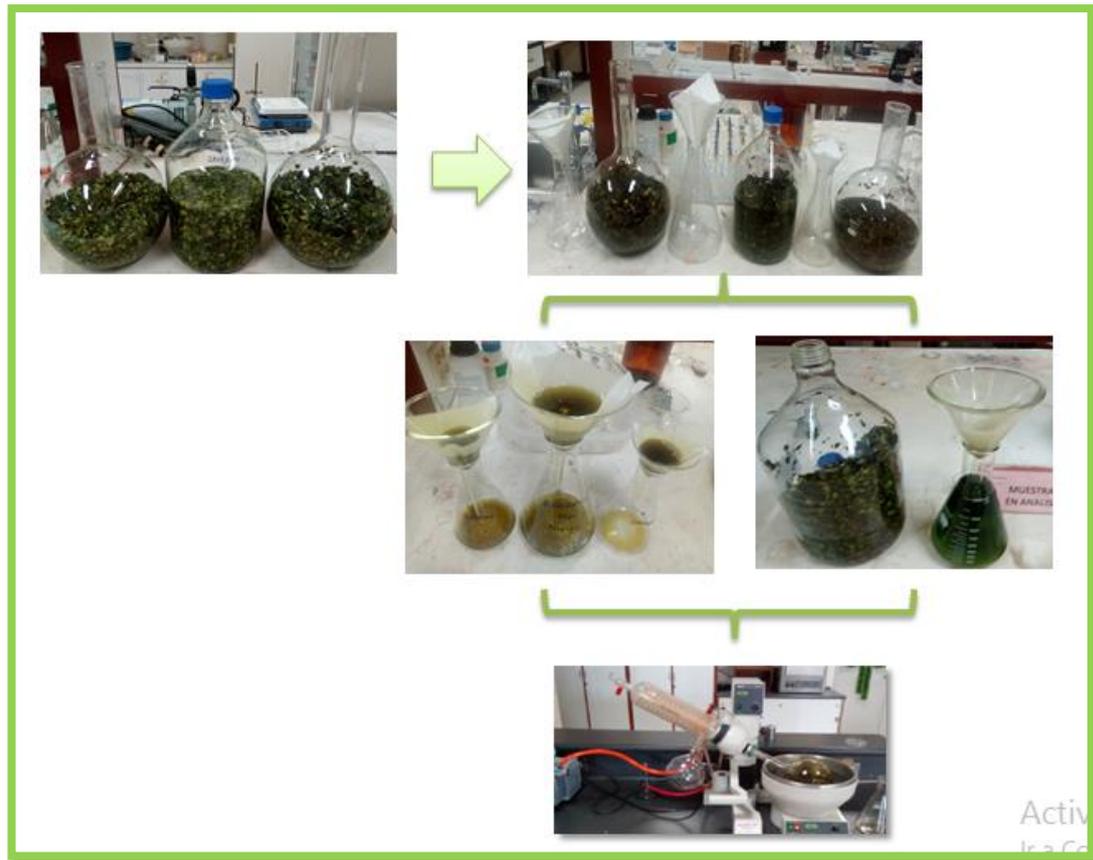
Fotografía 5: Pesado de las hojas secas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán)



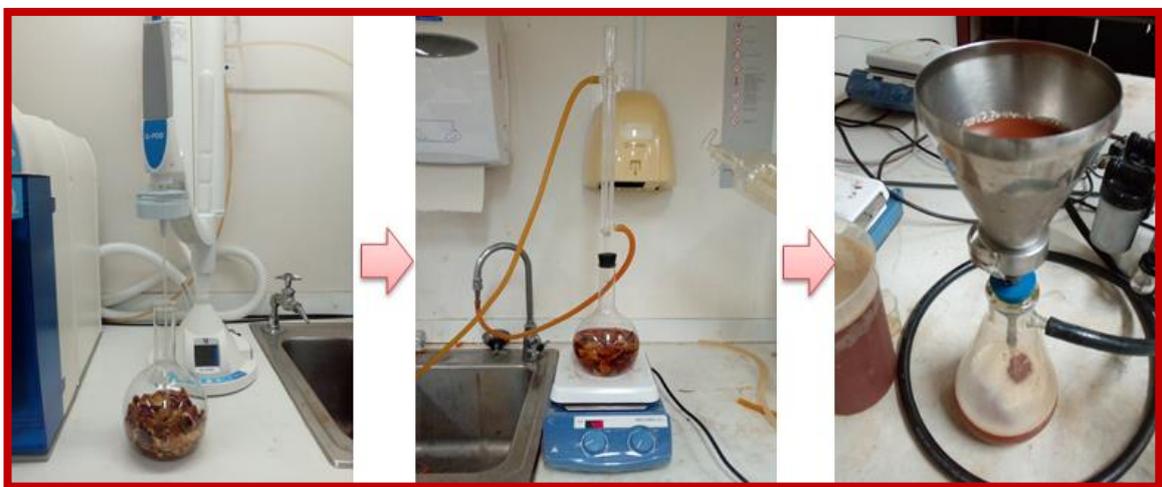
Fotografía 6: Pesado de la cáscara del fruto seco de *Punica granatum* L. granada.



Fotografía 7: Obtención, filtración del extracto hidroalcohólico de las hojas de arrayán y llevado a rotavapor para eliminar el solvente.



Fotografía 8: Obtención del extracto acuoso de la cáscara del fruto granada mediante la técnica de extracción por reflujo (24 horas) y filtración al vacío.



Fotografía 9: Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán)

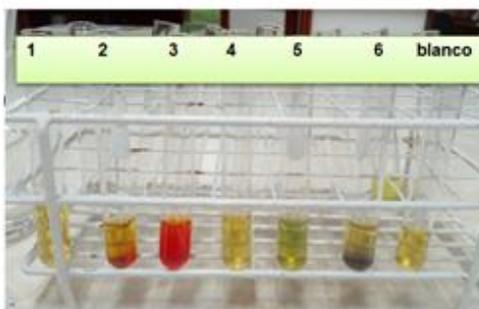
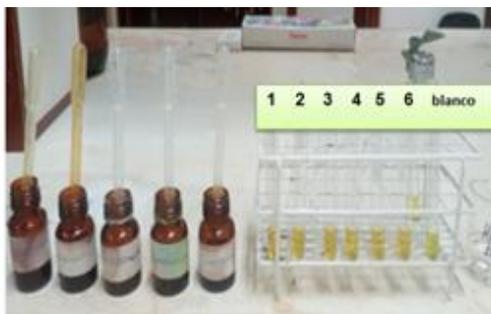


Fotografía 10: Prueba de solubilidad del extracto acuoso de la cáscara del fruto de *Punica granatum* L. (granada)



Fotografía 11: Identificación de los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán)

A. Identificación de alcaloides

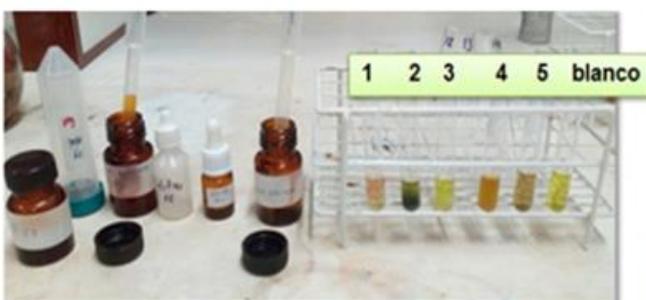


Para la identificación de los alcaloides se utilizaron 6 reactivos

Tubo con M/P	Reactivo	Resultado
1	Mayer	pp. blanco (+)
2	Wagner	pp. marrón (+++)
3	Dragendorff	pp. rojo (+++)
4	Scheibler	No se evidencia (-)
5	Sonneschein	No se evidencia (-)
6	Reineckato	pp. rosa (+++)

Donde
M/P: Muestra problema (extracto a estudiar)
pp.: Precipitado

B. Identificación de flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, quinonas y aminoácidos



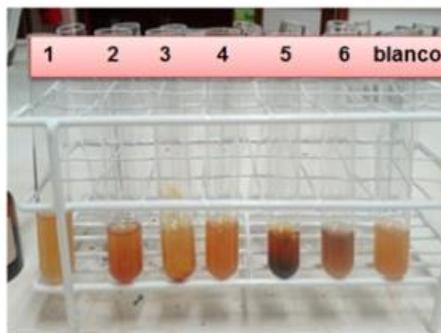
Para la identificación se utilizaron 5 reactivos

Tubo con M/P	Metabolito secundario	Reactivo	Resultado
1	Flavonoides	Shinoda	pp. rojo (++)
2	Compuestos fenólicos	cloruro ferrico	pp. verde (+++)
3	Taninos	Gelatina 1%	pp. blanco (++)
4	Quinonas	Reaccion Bortranger	No se evidencia (-)
5	Aminoacidos	Ninhidrina	Pp. rosada (+)

Donde
M/P: Muestra problema (extracto a estudiar)
pp.: Precipitado

Fotografía 12: Identificación de los metabolitos secundarios del extracto acuoso de la cáscara del fruto de *Punica granatum* L. (granada)

A. Identificación de alcaloides



Para la identificación de los alcaloides se utilizaron 6 reactivos

Tubo con M/P	Reactivo	Resultados
1	Mayer	pp. blanco (+)
2	Wagner	pp. marrón (+++)
3	Dragendorff	pp. naranja (++)
4	Scheibler	No se evidencia (-)
5	Sonneschein	pp naranja (+++)
5	Reineckato	Pp. rosa (++)

Donde

M/P: Muestra problema (extracto a estudiar)

pp.: Precipitado

Activar W

B. Identificación de flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, quinonas y aminoácidos



Para la identificación se utilizaron 5 reactivos

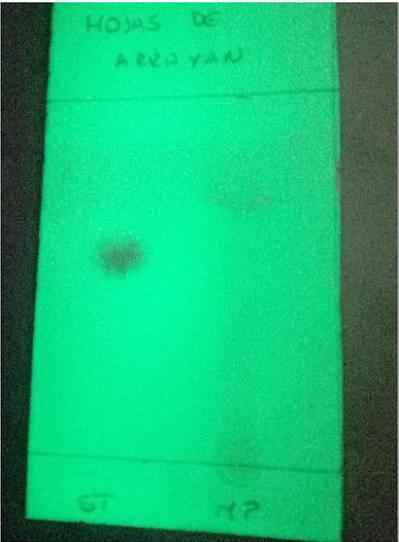
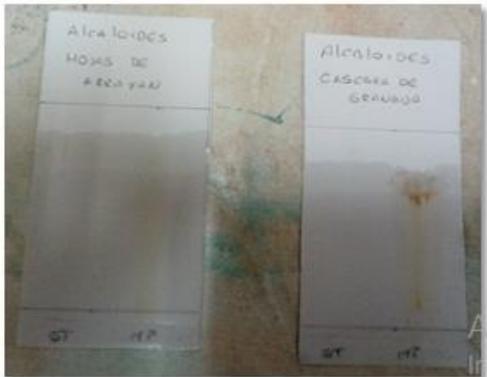
Tubo con M/P	Metabolito secundario	Reactivo	Resultado
1	Flavonoides	Shinoda	pp. rojo (++)
2	Compuestos fenólicos	cloruro ferrico	pp. negro (+++)
3	Taninos	Gelatina 1%	pp. blanco (+++)
4	Quinonas	Reaccion Bortranger	pp. rojo (+++)
5	Aminoacidos	Ninhidrina	Pp. rosada (-)

Donde

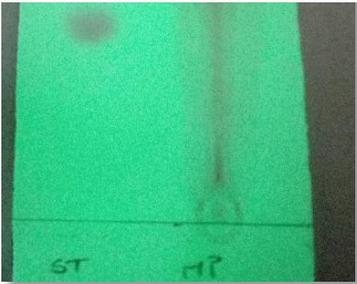
M/P: Muestra problema (extracto a estudiar)

pp.: Precipitado

Fotografía 13: Prueba de cromatografía en capa fina del extracto hidroalcohólico de las hojas del arrayán y del extracto acuoso de la cáscara del fruto granada – alcaloides

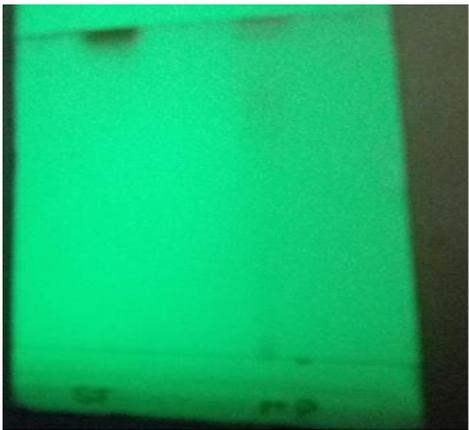
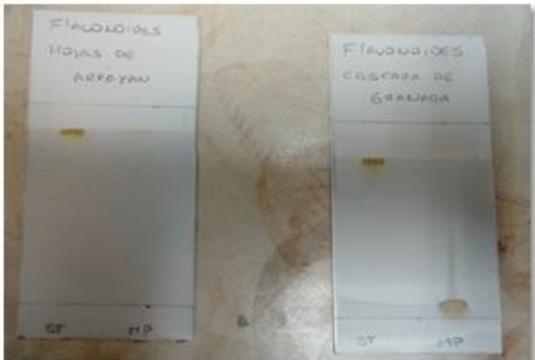
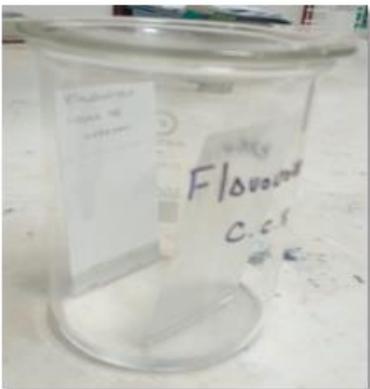


Alcaloides de las hojas de arrayán

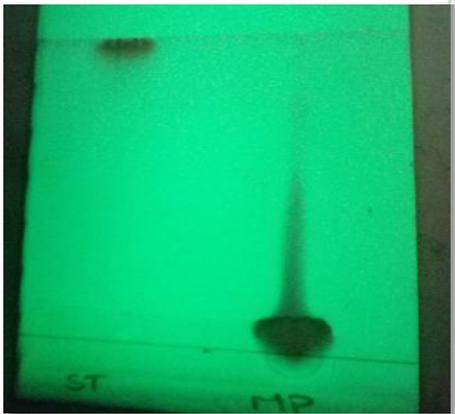


Alcaloides de la cáscara de la granada

Fotografía 14: Prueba de cromatografía en capa fina del extracto hidroalcohólico de las hojas del arrayán y del extracto acuoso de la cáscara del fruto granada – flavonoides



Flavonoides de las hojas de arrayán



Flavonoides de la cáscara de la granada

Fotografía 15: Preparación de las concentraciones al 100, 50, 25 y 12.5 % del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán)



Fotografía 16: Preparación de las concentraciones al 100, 50, 25 y 12.5 % del extracto acuoso de la cáscara del fruto de *Punica granatum* L. (granada).



Fotografía 17: Preparación de las concentraciones al 100, 50, 25 y 12.5 % de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada).



Fotografía 18: Preparación del ambiente o lugar de experimentación en el departamento Junín, provincia Chanchamayo, distrito Perené, anexo Santa Ana - Carretera Marginal Km 09 – vista alegre.



Fotografía 19: Recolección de *Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich, 1822 (caracol africano juvenil) en una zona de plantaciones de plátanos cerca a las orillas del río Perené, llamado la primera meseta del remolino del anexo de Pampa Silva, distrito Perené, provincia de Chanchamayo y departamento de Junín en el mes de Marzo del 2018



Fotografía 20: Mantenimiento de los caracoles africanos en el lugar de experimentación



Fotografía 21: Aplicación del agua destilada, metaldehído 5% y extracto hidroalcohólico de las hojas de arrayán en sus diferentes concentraciones en *Achatina fulica* Bowdich, 1822 en los grupos experimentales.



Aplicación del agua destilada al grupo control negativo



Aplicación del metaldehído al 5% al grupo control positivo



Aplicación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A: Gray (arrayán) en *Achatina fulica* Bowdich, 1822

Fotografía 22: Aplicación del extracto acuoso de la cáscara del fruto granada, de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de arrayán y extracto acuoso de la cáscara del fruto granada en diferentes concentraciones en *Achatina fulica* Bowdich, 1822. en los grupos experimentales.

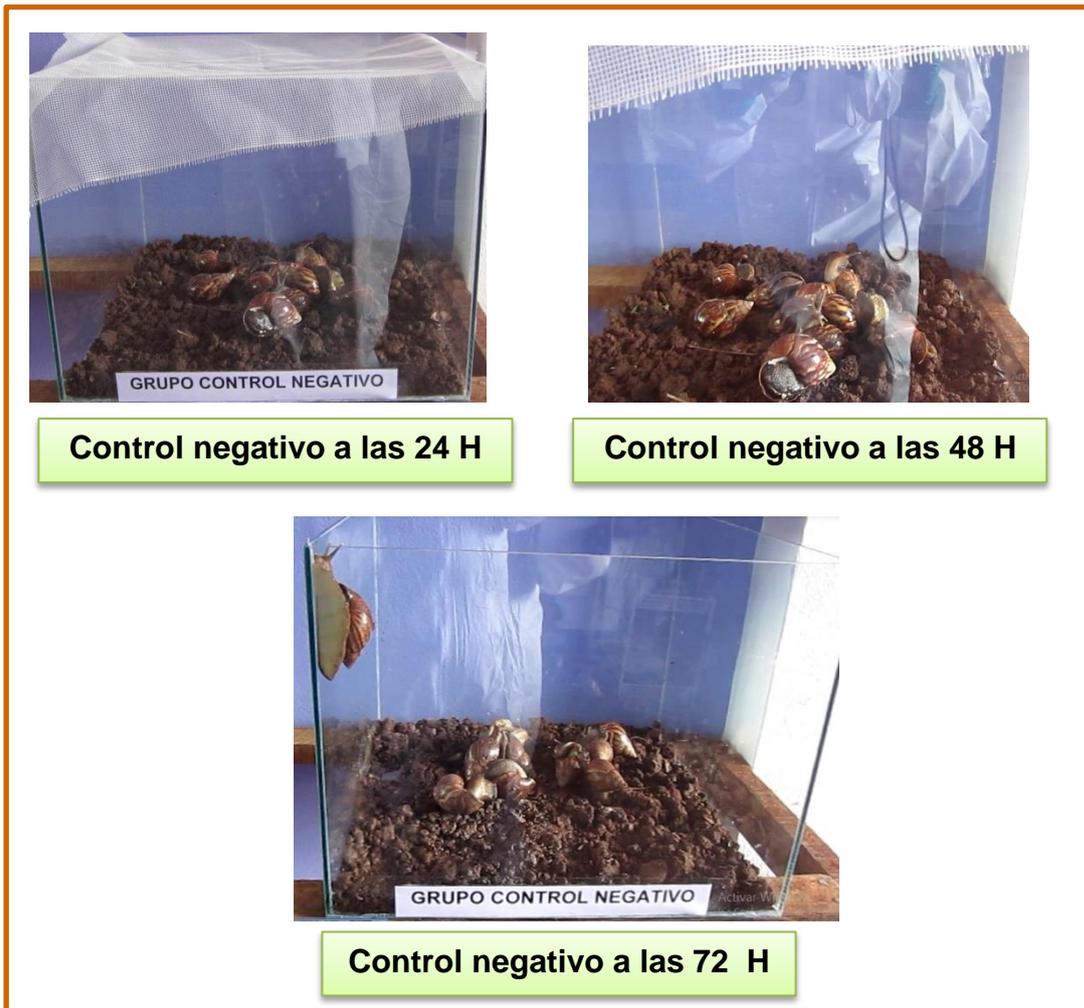


Aplicación del extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) en *Achatina fulica* Bowdich, 1822



Aplicación del extracto de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto de *Punica granatum* L. (granada) en *Achatina fulica* Bowdich, 1822.

Fotografía 23: Resultados del control negativo



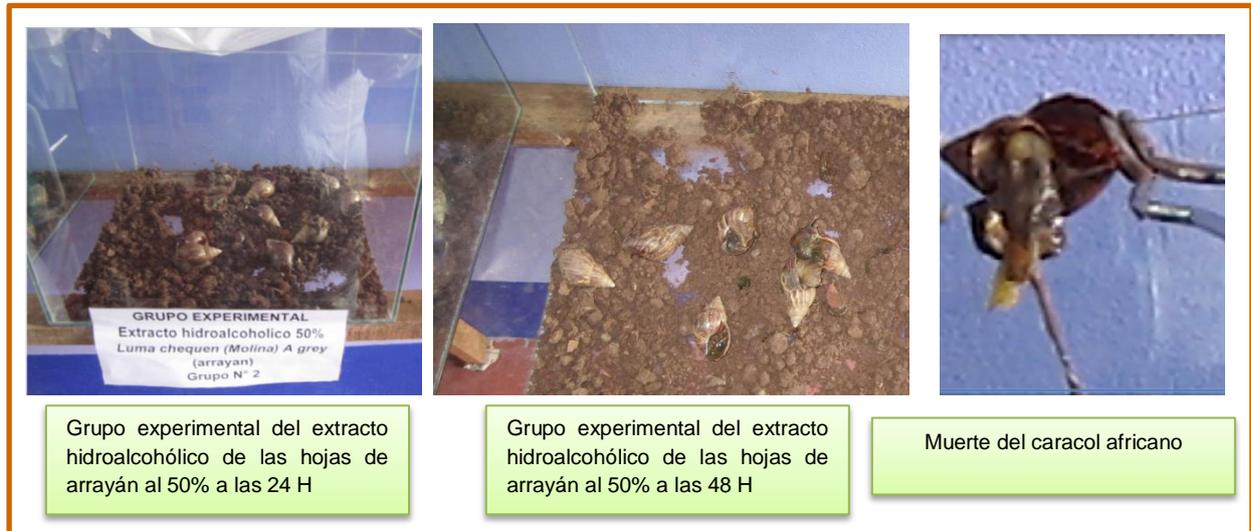
Fotografía 24: Resultados del control positivo (después de la aplicación del metaldehído al 5%)



Fotografía 25. Resultados del grupo experimental del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) al 100% en *Achatina fulica* Bowdich, 1822.



Fotografía 26. Resultados del grupo experimental del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) al 50% en *Achatina fulica* Bowdich, 1822.



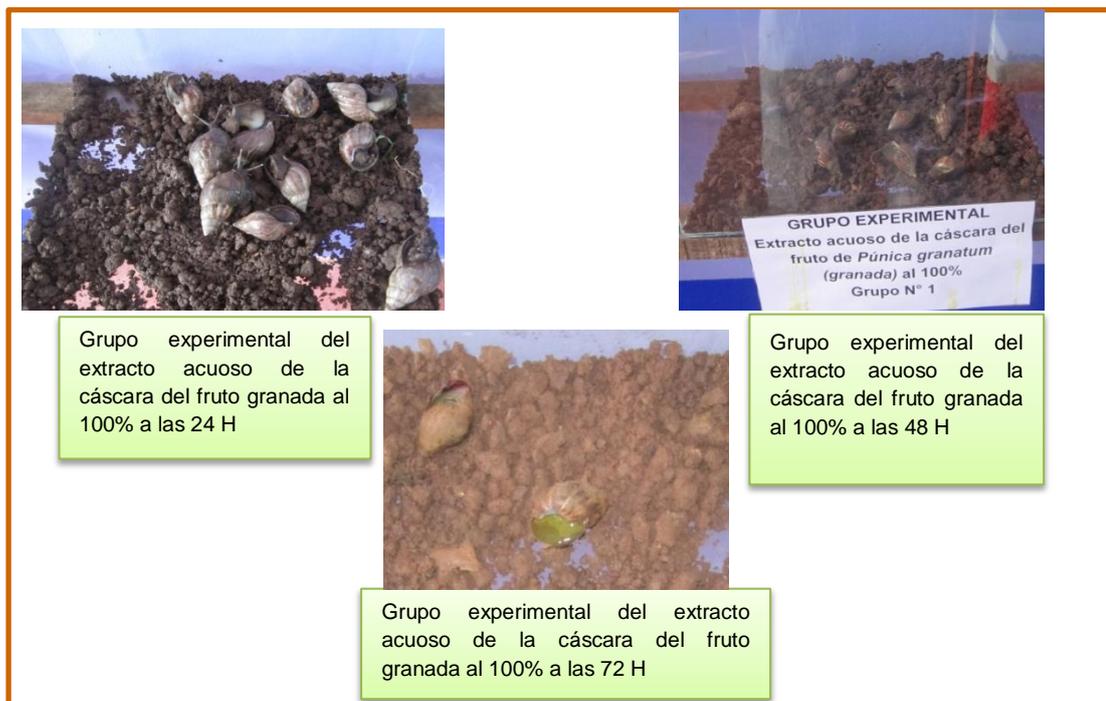
Fotografía 27. Resultados del grupo experimental del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) al 25% en *Achatina fulica* Bowdich, 1822.



Fotografía 28. Resultados del grupo experimental del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) al 12.5% en *Achatina fulica* Bowdich, 1822.



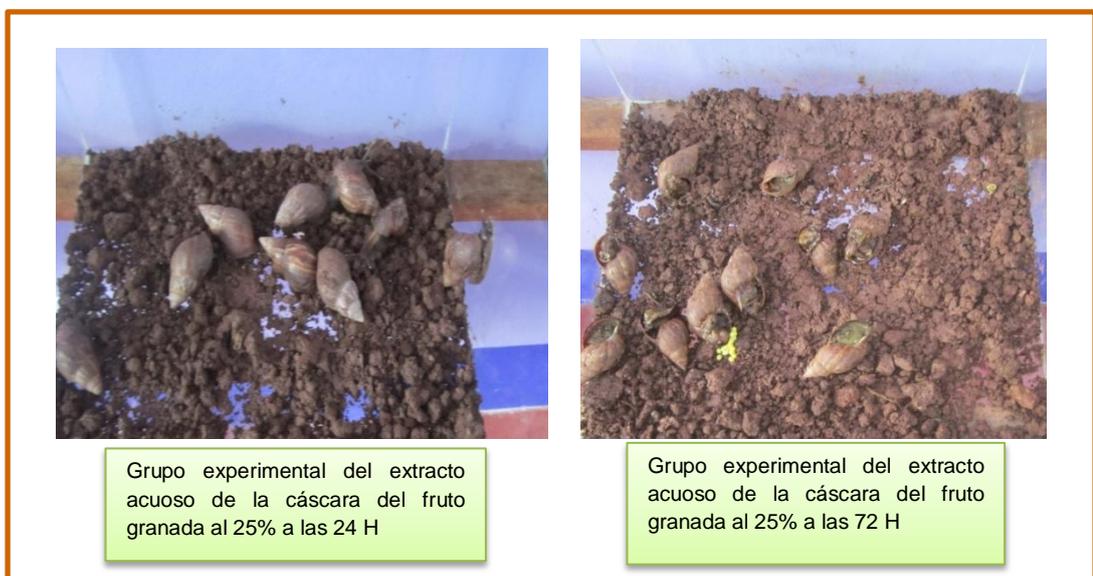
Fotografía 29. Resultados del grupo experimental del extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) al 100% en *Achatina fulica* Bowdich, 1822.



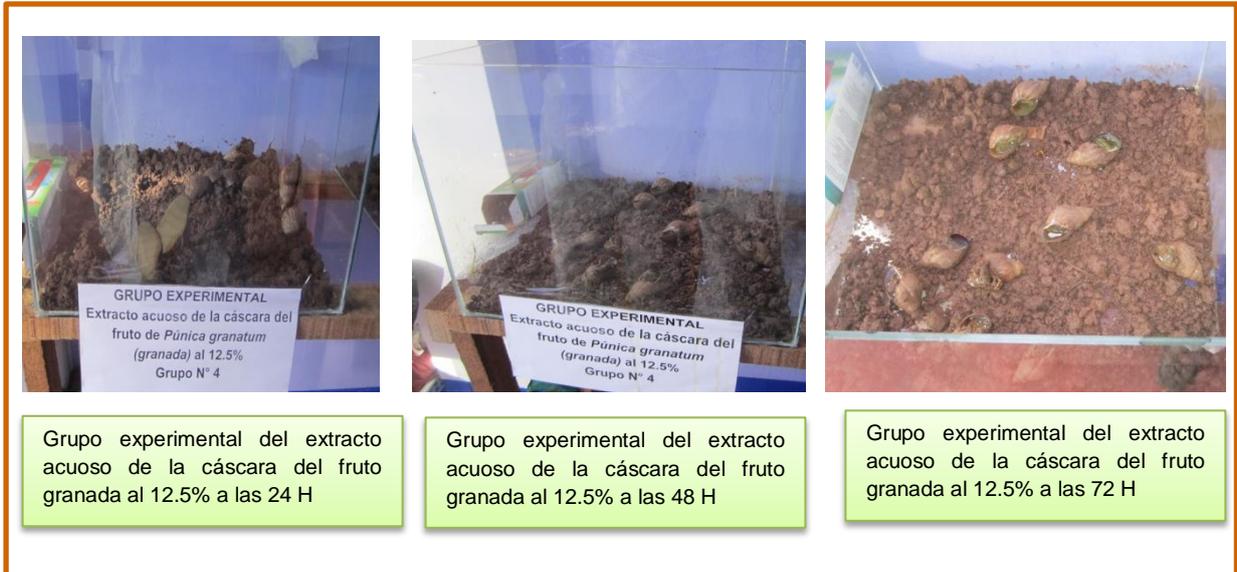
Fotografía 30. Resultados del grupo experimental del extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) al 50% en *Achatina fulica* Bowdich, 1822.



Fotografía 31. Resultados del grupo experimental del extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) al 25% en *Achatina fulica* Bowdich, 1822.



Fotografía 32. Resultados del grupo experimental del extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) al 12.5% en *Achatina fulica* Bowdich, 1822.



Fotografía 33. Resultados del grupo experimental de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) al 100% en *Achatina fulica* Bowdich, 1822.



Fotografía 34. Resultados del grupo experimental de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) al 50% en *Achatina fulica* Bowdich, 1822.



Grupo experimental de la combinación del extracto de las hojas de arrayán y extracto acuoso de la cáscara del fruto granada al 50 % en 24 H

Grupo experimental de la combinación del extracto de las hojas de arrayán y extracto acuoso de la cáscara del fruto granada al 50 % en 48 H

Grupo experimental de la combinación del extracto de las hojas de arrayán y extracto acuoso de la cáscara del fruto granada al 50 % en 48 H

Fotografía 35. Resultados del grupo experimental de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) al 25% en *Achatina fulica* Bowdich, 1822.



Grupo experimental de la combinación del extracto de las hojas de arrayán y extracto acuoso de la cáscara del fruto granada al 25 % 24 H

Grupo experimental de la combinación del extracto de las hojas de arrayán y extracto acuoso de la cáscara del fruto granada al 25 % 48 H

Grupo experimental de la combinación del extracto de las hojas de arrayán y extracto acuoso de la cáscara del fruto granada al 25 % 72 H

Fotografía 36. Resultados del grupo experimental de la combinación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (granada) al 12.5% en *Achatina fulica* Bowdich, 1822.



Grupo experimental de la combinación del extracto de las hojas de arrayán y extracto acuoso de la cáscara del fruto granada al 12.5 % 24 H



Grupo experimental de la combinación del extracto de las hojas de arrayán y extracto acuoso de la cáscara del fruto granada al 12.5 % 48 H



Grupo experimental de la combinación del extracto de las hojas de arrayán y extracto acuoso de la cáscara del fruto granada al 12.5 % 72 H