



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

TEMA DE TESIS

**“EFECTO DE LOS ÁCIDOS FÚLVICOS EN LA FISIOLÓGÍA DE
VERTEBRADOS DETERMINADO POR MEDIO DE TRAZADORES
RADIATIVOS”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M en C. Omar Yhair Morales Balderas



TUTOR: Dr. Juan Manuel Navarrete Tejero

AÑO: 2012

Esta tesis doctoral se desarrolló en el Laboratorio de Química Inorgánica y Nuclear del edificio D de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los avances de esta tesis doctoral se presentaron en los siguientes congresos internacionales:

“4th International Conference on Drug Discovery and Therapy”

(Dubai U. A. E. 12 – 15 Febrero 2012)

PRIMER CONGRESO DE ALUMNOS DE POSGRADO UNAM

(Cd. de México, México. 18 – 20 Mayo 2011)

“QUIMIUNAM 2011”

(Cd. de México, México. 16 – 18 Noviembre 2011)

“3rd International Nuclear Chemistry Congress”

(Palermo Italia. 18 – 23 Septiembre 2011)

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca otorgada (número de becario 177366) durante mis estudios de doctorado en el Programa de Ciencias Químicas de la UNAM.

Al **Dr. Juan Manuel Navarrete Tejero** por todo su apoyo y confianza en la dirección de este proyecto de investigación.

Al **Dr. Emilio Bucio Carrillo** y a la **Dra Rosario Muñoz Clares** miembros del comité tutorial por enriquecer éste trabajo cada semestre con sus comentarios y consejos.

A los **miembros del jurado** por sus aportaciones y observaciones hechas en este trabajo.

Al **Dr. Fernando García Tamayo** de la Facultad de Química por sus valiosas sugerencias y recomendaciones para realizar con éxito el presente trabajo.

A la **M. en C. María Isabel Gracia Mora** y el **M. en C. Héctor Ariel** por permitirme trabajar en el laboratorio del bioterio de la Facultad de Química.

A la **MVZ Lucía Macías Rosales**, **MVZ Marisol Rivera Huerta** y al **cDr. Francisco Sánchez Bartéz** por todo su apoyo para obtener las muestras biológicas y enseñarme las técnicas necesarias para su análisis.

Al personal administrativo del Posgrado en Ciencias Químicas; **Josefina Tenopala**, **Rosy Viñas**, **Beatriz López**, **Susana Ramírez**, **Adriana Martínez**, por sus atenciones y ayuda a lo largo de estos últimos seis años.

A mis amigos del posgrado: **Iván Meléndez**, **Alejandro Nava**, **Violeta Álvarez**, **Paty García**, **Alejandro Ramírez**, **Isabel Domínguez** y **Jaime Guerra** por todas las buenas experiencias, consejos y cariño que sólo los verdaderos amigos saben dar.

A la **UNAM** por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

*Dedicada a la memoria de mi padre Arturo Morales, al gran apoyo recibido por mi madre Maritza Balderas, a mi hermano Germán Morales y a mi cuñada Patricia Martínez gracias por compartir este logro conmigo los
amo.*

ÍDICE GENERAL

| | |
|--|----------|
| ÍNDICE DE TABLAS | VII |
| ÍNDICE DE FIGURAS | X |
| RESUMEN | XV |
| ABSTRACT | XVI |
| | |
| ❖ <i>CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN</i> | <i>1</i> |
| | |
| ❖ <i>CAPITULO 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</i> | <i>3</i> |
| 2.1. Hipótesis | 3 |
| 2.2. Objetivos | 3 |
| 2.2.1. General | 3 |
| 2.2.2. Particulares | 3 |
| | |
| ❖ <i>CAPITULO 3. GENERALIDADES</i> | <i>4</i> |
| 3.1. Compostaje | 4 |
| 3.2. Humus | 4 |
| 3.3. Sustancias húmicas (SH) | 5 |
| 3.3.1. Huminas | 8 |
| 3.3.2. Ácidos Húmicos (AH) | 8 |
| 3.3.3. Ácidos Fúlvicos (AF) | 9 |
| 3.4. Propiedades de las sustancias húmicas | 11 |
| 3.5. Metabolismo de los minerales | 13 |
| 3.5.1. Yodo | 13 |
| 3.5.2. Hierro | 14 |
| 3.5.2.1 Absorción del hierro no hemático o inorgánico | 16 |
| 3.5.2.1.1 Absorción del hierro férrico (Fe ³⁺) | 16 |
| 3.5.2.1.2 Absorción del hierro ferroso (Fe ²⁺) | 16 |
| 3.6. Sistema inmunológico | 19 |
| 3.6.1. Defensas internas no específicas | 19 |
| 3.6.2. Defensas internas específicas | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 3.6.3. El sistema inmunitario reconoce al invasor | 21 |
| 3.6.4. El sistema de complemento | 23 |
| 3.6.5. Anticuerpos | 24 |
| 3.6.5.1. Inmunoglobulina G (IgG)..... | 25 |
| 3.6.5.2. Inmunoglobulina M (IgM)..... | 26 |
| 3.6.5.3. Inmunoglobulina D (IgD)..... | 26 |
| 3.6.5.4. Inmunoglobulina E (IgE)..... | 27 |
| 3.6.5.5. Inmunoglobulina A (IgA)..... | 27 |
| | |
| ❖ CAPITULO 4. ANTECEDENTES | 29 |
| 4.1. Aplicaciones de las sustancias húmicas | 29 |
| 4.1.1. Agricultura | 29 |
| 4.1.2. Medio ambiente | 29 |
| 4.1.3. Biomedicina | 30 |
| 4.2. Toxicidad de las sustancias húmicas | 33 |
| | |
| ❖ CAPITULO 5. METODOLOGÍA | 34 |
| 5.1. Espectrometría gamma | 34 |
| 5.1.1. Detectores de centelleo | 34 |
| 5.1.1.1. Principio | 34 |
| 5.1.1.2. Sustancias luminiscentes | 35 |
| 5.2. Enzimoinmunoanálisis (EIA) | 37 |
| 5.2.1. Inmunoensayos homogéneos y heterogéneos | 38 |
| 5.2.1.1. Homogéneo | 38 |
| 5.2.1.2 Heterogéneo | 39 |
| 5.2.2. Inmunoensayos con reactivos marcados | 40 |
| 5.2.2.1 Competitivo | 40 |
| 5.2.2.2. No competitivo | 41 |
| 5.2.3. ELISA (Enzyme Linked Inmunoabsorbent Assay) | 42 |
| 5.2.3.1. ELISA indirecto | 43 |
| 5.3. Refractometría | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3.1. Refractómetros de ángulo límite | 44 |
| ❖ <i>CAPITULO 6. PARTE EXPERIMENTAL</i> | 46 |
| 6.1. Extracción del ácido fúlvico | 47 |
| 6.2. Determinación de iones Γ y Fe^{3+} | 48 |
| 6.3. Determinación de inmunoglobulina G de ratón (experimento 1) | 50 |
| 6.4. Determinación de inmunoglobulina G de ratón (experimento 2) | 52 |
| 6.5. Determinación de inmunoglobulina G de ratón (experimento 3) | 52 |
| 6.6. Determinación de inmunoglobulina G de ratón (experimento 4) | 53 |
| 6.7. Determinación de inmunoglobulinas totales (ratas) | 54 |
| ❖ <i>CAPITULO 7. RESULTADOS</i> | 56 |
| 7.1. Determinación de iones Γ y Fe^{3+} | 56 |
| 7.2 Concentración de inmunoglobulina G (IgG) e inmunoglobulinas totales de ratón (experimento 1) | 65 |
| 7.3 Concentración de inmunoglobulina G (IgG) e inmunoglobulinas totales de ratón (experimento 2) | 66 |
| 7.3.1. Análisis estadístico (concentración de inmunoglobulina G) | 69 |
| 7.3.1.1. Prueba de Hipótesis | 69 |
| 7.3.1.2. Análisis de varianza | 70 |
| 7.3.1.3. Estadística de contraste de las medias muestrales | 71 |
| 7.3.1.4. Potencia de la prueba ($1 - \beta$) | 72 |
| 7.3.2. Análisis estadístico (concentración de inmunoglobulinas totales) | 72 |
| 7.3.2.1. Análisis de varianza | 73 |
| 7.3.2.2. Estadística de contraste de las medias muestrales | 74 |
| 7.3.2.3. Potencia de la prueba ($1 - \beta$) | 74 |
| 7.3.3. Análisis estadístico (masa final en ratones) | 75 |
| 7.3.3.1. Análisis de varianza | 76 |
| 7.3.3.2. Estadística de contraste de las medias muestrales | 77 |
| 7.3.3.3. Potencia de la prueba ($1 - \beta$) | 77 |

| | |
|---|-----|
| 7.4. Concentración de inmunoglobulina G (IgG) e inmunoglobulinas totales de ratón (experimento 3) | 78 |
| 7.4.1. Análisis estadístico (concentración de inmunoglobulina G en ratones) .81 | |
| 7.4.1.1. Análisis de varianza | 81 |
| 7.4.1.2. Estadística de contraste de las medias muestrales | 82 |
| 7.4.1.3. Potencia de la prueba (1 - β) | 83 |
| 7.4.1.4. Incremento de inmunoglobulina G | 83 |
| 7.4.2. Análisis estadístico (concentración de inmunoglobulinas totales en ratones) | 84 |
| 7.4.2.1. Análisis de varianza | 84 |
| 7.4.2.2. Estadística de contraste de las medias muestrales | 85 |
| 7.4.2.3. Potencia de la prueba (1 - β) | 86 |
| 7.4.2.4. Incremento de inmunoglobulinas totales | 86 |
| 7.4.3. Análisis estadístico (masa final en ratones) | 86 |
| 7.4.3.1. Análisis de varianza | 86 |
| 7.4.3.2. Estadística de contraste de las medias muestrales | 88 |
| 7.4.3.3. Potencia de la prueba (1 - β) | 88 |
| 7.4.3.4. Incremento de masa en ratones | 89 |
| 7.5. Concentración de inmunoglobulina G (IgG) e inmunoglobulinas totales de ratón (experimento 4) | 90 |
| 7.5.1. Análisis estadístico (concentración de inmunoglobulina G) | 95 |
| 7.5.1.1. Análisis de varianza | 96 |
| 7.5.1.2. Contraste posterior a la F de Snedecor | 97 |
| 7.5.1.3. Estadística de contraste de las medias muestrales | 98 |
| 7.5.1.4. Potencia de la prueba (1 - β) | 99 |
| 7.5.1.5. Incremento de inmunoglobulina G | 100 |
| 7.5.2. Análisis estadístico (Concentración de inmunoglobulinas totales) | 101 |
| 7.5.2.1. Análisis de varianza | 101 |
| 7.5.2.2. Contraste posterior a la F de Snedecor | 103 |
| 7.5.2.3. Estadística de contraste de las medias muestrales | 103 |
| 7.5.2.4. Potencia de la prueba (1 - β) | 105 |

| | |
|---|-----|
| 7.5.2.5. Incremento de inmunoglobulinas totales | 106 |
| 7.5.3. Análisis estadístico (masa final en ratones) | 106 |
| 7.5.3.1. Análisis de varianza y contraste posterior a la F de Snedecor | 106 |
| 7.5.3.2. Estadística de contraste de las medias muestrales | 106 |
| 7.5.3.3. Potencia de la prueba (1 - β) | 107 |
| 7.5.3.4. Incremento de masa en ratones | 108 |
| 7.6. Concentración de anticuerpos totales en ratas | 109 |
| 7.6.1. Análisis estadístico (concentración de inmunoglobulinas totales) | 113 |
| 7.6.1.1. Comparación de las medias dentro de los grupos | 113 |
| 7.6.1.1.1. Estadística de contraste de medias muestrales | 114 |
| 7.6.1.1.2. Potencia de la prueba (1 - β) | 116 |
| 7.6.1.2. Comparación de las medias entre los grupos | 117 |
| 7.6.1.2.1. Análisis de varianza | 117 |
| 7.6.1.2.2. Estadística de contraste de las medias muestrales... | 119 |
| 7.6.1.2.3. Potencia de la prueba (1 - β) | 120 |
| 7.6.1.3. Incremento de inmunoglobulinas totales en ratas | 121 |
| 7.6.2. Análisis estadístico (masa final) | 121 |
| 7.6.2.1. Análisis de varianza | 122 |
| 7.6.2.2. Estadística de contraste de las medias muestrales | 123 |
| 7.6.2.3. Potencia de la prueba (1 - β) | 124 |
| 7.6.2.4. Incremento de masa | 124 |
| 7.6.3. Dosis de ácido fúlvico ingerida por día en ratas | 125 |
| 7.7. Resumen de resultados | 126 |
| 7.7.1. Resultados estadísticos | 126 |
| 7.7.1.1. Resumen del segundo ensayo en ratones | 126 |
| 7.7.1.2. Resumen del tercer ensayo en ratones | 126 |
| 7.7.1.3. Resumen del cuarto ensayo en ratones | 126 |
| 7.7.1.4. Resumen del quinto ensayo en ratas | 128 |
| 7.7.2. Efectos observados del ácido fúlvico | 129 |

| | |
|--|------------|
| ❖ <i>CAPITULO 8. DISCUSIÓN</i> | 130 |
| 8.1 Determinación de iones I ⁻ y Fe ³⁺ | 130 |
| 8.2 Concentración de IgG e inmunoglobulinas totales de ratón e inmunoglobulinas totales en rata | 132 |
| 8.2.1. Primer ensayo | 132 |
| 8.2.2. Segundo ensayo | 132 |
| 8.2.3. Tercer ensayo | 132 |
| 8.2.4. Cuarto ensayo | 132 |
| 8.2.5. Quinto ensayo | 133 |
| | |
| ❖ <i>CAPITULO 9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</i> | 136 |
| 9.1 Determinación de iones I ⁻ y Fe ³⁺ | 136 |
| 9.2 Concentración de IgG e inmunoglobulinas totales de ratón e inmunoglobulinas totales en rata | 136 |
| 9.3 Perspectivas | 137 |
| | |
| ❖ <i>REFERENCIAS</i> | 138 |
| | |
| ❖ <i>APÉNDICE A. Aprobación del protocolo por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL)</i> | 148 |
| | |
| ❖ <i>APÉNDICE B. Certificado de salud de los animales de laboratorio</i> | 149 |
| | |
| ❖ <i>APÉNDICE (Publicación)</i> | |

ÍDICE DE TABLAS

CAPITULO 3. GENERALIDADES

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Algunos de los principales efectos biológicos de las sustancias húmicas en plantas y animales | 7 |
| Tabla 2. Distribución de grupos funcionales oxigenados en las sustancias húmicas (mEq/100g)..... | 10 |
| Tabla 3. Intervalos usuales para la composición elemental de las sustancias húmicas | 10 |
| Tabla 4. Composición elemental, masa molecular y fórmula de un ácido fúlvico | 11 |
| Tabla 5. Distribución del hierro en el organismo humano | 15 |

CAPITULO 4. ANTECEDENTES

| | |
|---|----|
| Tabla 6. Concentración inhibitoria media antiviral de ácidos húmicos sintéticos y de humatos | 31 |
|---|----|

CAPITULO 6. PARTE EXPERIMENTAL

| | |
|---|----|
| Tabla 7. Concentración de minerales en 2 L..... | 53 |
| Tabla 8. Concentración de minerales en 2,7 L | 54 |

CAPITULO 7. RESULTADOS

| | |
|--|----|
| Tabla 9. Cuentas por segundo y cuentas por segundo/(masa ó volumen) para el ⁵⁹ Fe y ¹³¹ I de las muestras tratadas sin ácido fúlvico (grupo 1) | 56 |
| Tabla 10. Cuentas por segundo y cuentas por segundo/(masa ó volumen) para el ⁵⁹ Fe y ¹³¹ I de las muestras tratadas con ácido fúlvico (grupo 2) | 57 |
| Tabla 11. Incremento en la absorción de I ⁻ y Fe ³⁺ con suplemento de ácido fúlvico | 58 |

| | |
|---|----|
| Tabla 12. Concentración de inmunoglobulina G e inmunoglobulinas totales para los grupos 1 (ácido fúlvico) y 2 (control) Dosis de ácido fúlvico $\frac{1}{1000}$ de saturación | 65 |
| Tabla 13. Concentración de inmunoglobulina G e inmunoglobulinas totales para los grupos 1 (prueba) y 2 (control). Dosis de ácido fúlvico $\frac{1}{50}$ de saturación | 66 |
| Tabla 14. Masa final en los grupos 1 (prueba) y 2 (control). Dosis de ácido fúlvico $\frac{1}{50}$ de saturación | 68 |
| Tabla 15. Concentración de inmunoglobulina G en ambos grupos y suma de los cuadrados para cada valor | 70 |
| Tabla 16. Concentración de inmunoglobulinas totales en ambos grupos y suma de los cuadrados para cada valor | 73 |
| Tabla 17. Masa final en ambos grupos y suma de los cuadrados para cada valor | 75 |
| Tabla 18. Concentración de inmunoglobulina G e inmunoglobulinas totales para los grupos 1 (control) y 2 (prueba). Dosis de ácido fúlvico para el grupo 2 $\frac{1}{111}$ de saturación | 78 |
| Tabla 19. Masa final en los grupos 1 (control) y 2 (prueba). Dosis de ácido fúlvico para el grupo 2 $\frac{1}{111}$ de saturación..... | 80 |
| Tabla 20. Concentración de inmunoglobulina G en ambos grupos y suma de los cuadrados para cada valor | 81 |
| Tabla 21. Concentración de inmunoglobulinas totales en ambos grupos y suma de los cuadrados para cada valor | 84 |
| Tabla 22. Concentración de inmunoglobulinas totales en ambos grupos y suma de los cuadrados para cada valor | 87 |
| Tabla 23. Concentración de IgG de ratón en los tres grupos de ratones. Dosis de ácido fúlvico para los grupos dos y tres $\frac{1}{111}$ de saturación | 90 |
| Tabla 24. Concentración de inmunoglobulinas totales en los 3 grupos de ratones. Dosis de ácido fúlvico para los grupos dos y tres $\frac{1}{111}$ de saturación | 93 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 25. Masa inicial y final de los tres grupos de ratones durante el periodo de ensayo. Dosis de ácido fúlvico para los grupos dos y tres $\frac{1}{111}$ de saturación | 94 |
| Tabla 26. Concentración de IgG en los tres grupos y suma de los cuadrados para cada valor | 95 |
| Tabla 27. Concentración de inmunoglobulinas totales en los tres grupos y suma de los cuadrados para cada valor | 101 |
| Tabla 28. Concentración inicial y final de inmunoglobulinas totales en ratas para los grupos 1 y 2. Dosis de ácido fúlvico $\frac{1}{75}$ de saturación | 109 |
| Tabla 29. Masa inicial y final de las ratas para ambos grupos. Dosis de ácido fúlvico $\frac{1}{75}$ de saturación | 111 |
| Tabla 30. Concentración inicial y final de inmunoglobulinas totales en ambos grupos y suma de cuadrados para cada valor | 113 |
| Tabla 31. Masa final de ratas en ambos grupos y suma de cuadrados para cada valor | 122 |
| Tabla 32. Resumen de resultados para el segundo ensayo en ratones | 126 |
| Tabla 33. Resumen de resultados para el tercer ensayo en ratones | 126 |
| Tabla 34. Resumen de resultados para el tercer ensayo en ratones | 127 |
| Tabla 35. Resumen de resultados para el cuarto ensayo en ratas | 128 |
| Tabla 36. Efectos observados del ácido fúlvico en ratones | 129 |
| Tabla 37. Efectos observados del ácido fúlvico en ratas | 129 |

ÍDICE DE FIGURAS

CAPITULO 3. GENERALIDADES

| | |
|--|----|
| Figura 1. Fraccionamiento de las sustancias húmicas | 6 |
| Figura 2. Modelo teórico TMB del ácido húmico | 9 |
| Figura 3. Modelo teórico TMB del ácido fúlvico | 10 |
| Figura 4. Absorción de hierro en un enterocito duodenal humano | 17 |
| Figura 5. Estructura de los anticuerpos | 22 |
| Figura 6. Selección clonal entre células B y producción de células plasmática | 23 |
| Figura 7. Estructura de las 5 inmunoglobulinas | 24 |

CAPITULO 5. METODOLOGÍA

| | |
|--|----|
| Figura 8. Inmunoensayos homogéneos y heterogéneos | 38 |
| Figura 9. Diseño de inmunoensayos | 40 |
| Figura 10. La concentración de antígeno esta inversamente relacionada a la concentración de marca (señal) en formatos competitivos | 41 |
| Figura 11. La concentración de antígeno es directamente proporcional a la concentración de marca (señal) en formatos no competitivos | 42 |
| Figura 12. Espectrofotómetro | 43 |
| Figura 13. El ensayo ELISA indirecto emplea dos anticuerpos, unos de ellos marcado con la enzima el cual produce un doble reconocimiento y una mayor sensibilidad | 43 |
| Figura 14. Índice de refracción de la luz | 44 |
| Figura 15. Esquema de un refractómetro de ángulo límite | 45 |

CAPITULO 6. PARTE EXPERIMENTAL

| | |
|---|----|
| Figura 16. Espectrofotómetro U. V. Lab System Multiskan M.S | 46 |
| Figura 17. Refractómetro de mano portátil ATC modelo SNA-91340 | 46 |
| Figura 18. Detector de centelleo sólido de NaI activado con Tl | 47 |
| Figura 19. Suplemento alimenticio de ácido fúlvico | 47 |

| | |
|---|----|
| Figura 20. Extracción del ácido fúlvico | 47 |
| Figura 21. Micrografía de transmisión electrónica del ácido fúlvico | 48 |
| Figura 22. Recolección de desechos (orina y heces) del grupo control (izquierda) y el grupo de prueba (derecha) durante el periodo de ensayo | 49 |
| Figura 23. Muestras de los órganos (riñones, hígado y tiroides), desechos (heces y orina) y fluidos (sangre), del grupo de prueba (letras negras) y del grupo control (letras rojas) | 50 |
| Figura 24. Grupo control y grupo de prueba con ácido fúlvico (dosis 0,75 mg/mL) en ratones..... | 51 |
| Figura 25. Grupo control (izquierda) y grupo de prueba con ácido fúlvico (derecha) | 54 |

CAPITULO 7. RESULTADOS

| | |
|---|----|
| Figura 26. Gráfica de barras para el incremento en la absorción de ^{131}I en los diferentes órganos y fluidos | 57 |
| Figura 27. Gráfica de barras para el incremento en la absorción de ^{59}Fe en los diferentes órganos y fluidos | 58 |
| Figura 28. Espectros del ^{59}Fe con un pico de energía gamma de 1099 keV, obtenidos en las muestras de hígado. Grupo control a) y grupo tratado con ácido fúlvico b) | 59 |
| Figura 29. Espectros del ^{59}Fe y ^{131}I con picos de energía gamma de 1099 y 364,5 keV respectivamente, obtenidos en las muestras de heces. Grupo control a) y grupo tratado con ácido fúlvico b) | 60 |
| Figura 30. Espectros del ^{59}Fe y ^{131}I con picos de energía gamma de 1099 y 364,5 keV respectivamente, obtenidos en las muestras de orina. Grupo control a) y grupo tratado con ácido fúlvico b) | 61 |
| Figura 31. Espectros del ^{59}Fe con un pico de energía gamma de 1099 keV, obtenidos en las muestras de riñones. Grupo control a) y grupo tratado con ácido fúlvico b) | 62 |

| | |
|--|----|
| Figura 32. Espectros del ^{59}Fe y ^{131}I con picos de energía gamma de 1099 y 364,5 keV respectivamente, obtenidos en las muestras de sangre. Grupo control a) y grupo tratado con ácido fúlvico b) | 63 |
| Figura 33. Espectros del ^{131}I con un pico de energía gamma de 364,5 keV, obtenidos en las muestras de tiroides. Grupo control a) y grupo tratado con ácido fúlvico b) | 64 |
| Figura 34. Curva estándar de inmunoglobulina G de ratón | 65 |
| Figura 35. Histograma para la concentración de inmunoglobulina G en ambos grupos | 67 |
| Figura 36. Histograma para la concentración de inmunoglobulinas totales en ambos grupos | 67 |
| Figura 37. Histograma para la masa final en ambos grupos | 68 |
| Figura 38. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética entre la concentración de IgG de ambos grupos) | 72 |
| Figura 39. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética entre la concentración de inmunoglobulinas totales de ambos grupos) | 75 |
| Figura 40. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética entre la masa final de ambos grupos) | 77 |
| Figura 41. Histograma y polígono de frecuencias para la distribución de concentración de inmunoglobulina G en el grupo control | 79 |
| Figura 42. Histograma y polígono de frecuencias para la distribución de concentración de inmunoglobulina G en el grupo tratado con ácido fúlvico más minerales | 79 |
| Figura 43. Histograma para la distribución de concentración de inmunoglobulinas totales en ambos grupos | 80 |
| Figura 44. Histograma para la masa final en ambos grupos | 81 |
| Figura 45. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de IgG entre los grupos 1 y 2) | 83 |

| | |
|---|-----|
| Figura 46. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de inmunoglobulinas totales entre los grupos 1 y 2) | 86 |
| Figura 47. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética de la masa final entre los grupos 1 y 2) | 89 |
| Figura 48. Histograma y polígono de frecuencias para la distribución de concentración de inmunoglobulinas G en el grupo control | 91 |
| Figura 49. Histograma y polígono de frecuencias para la distribución de concentración de inmunoglobulinas G en el grupo tratado con ácido fúlvico | 91 |
| Figura 50. Histograma y polígono de frecuencias para la distribución de concentración de inmunoglobulina G en el grupo tratado con ácido fúlvico más minerales | 92 |
| Figura 51. Histograma para la distribución de concentración de inmunoglobulinas totales en los tres grupos | 93 |
| Figura 52. Histograma para la masa inicial en los tres grupos | 94 |
| Figura 53. Histograma para la masa final en los tres grupos | 95 |
| Figura 54. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de IgG entre los grupos 1 y 2) | 99 |
| Figura 55. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de IgG entre los grupos 1 y 3) | 100 |
| Figura 56. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de IgG entre los grupos 2 y 3) | 100 |
| Figura 57. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de inmunoglobulinas totales entre los grupos 1 y 2) | 105 |
| Figura 58. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de inmunoglobulinas totales entre los grupos 1 y 3) | 105 |
| Figura 59. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de inmunoglobulinas totales entre los grupos 2 y 3) | 106 |

| | |
|---|-----|
| Figura 60. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la masa final entre los grupos 1 y 2) | 107 |
| Figura 61. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la masa final entre los grupos 1 y 3) | 107 |
| Figura 62. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la masa final entre los grupos 2 y 3) | 108 |
| Figura 63. Histograma para la concentración de inmunoglobulinas totales en las lecturas inicial y final (grupo 1) | 110 |
| Figura 64. Histograma para la concentración de inmunoglobulinas totales en las lecturas inicial y final (grupo 2) | 110 |
| Figura 65. Histograma para la distribución de frecuencias de la masa inicial en ambos grupos | 112 |
| Figura 66. Histograma para la distribución de frecuencias de la masa final en ambos grupos | 112 |
| Figura 67. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética de la concentración inicial y final de anticuerpos totales para el grupo 1) | 116 |
| Figura 68. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética de la concentración inicial y final de anticuerpos totales para el grupo 2) | 117 |
| Figura 69. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética entre la concentración inicial anticuerpos totales en ambos grupos) | 120 |
| Figura 70. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética entre la concentración final anticuerpos totales en ambos grupos) | 120 |
| Figura 71. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética entre la masa final en ambos grupos) | 124 |

RESUMEN

El humus hace referencia a la fracción de la materia orgánica que engloba a un grupo de sustancias difícilmente clasificables, de color oscuro, masa molecular elevada, naturaleza coloidal y propiedades ácidas. Las sustancias húmicas son el resultado de los procesos naturales de humificación y constituyen la parte más activa de la materia orgánica, su composición depende de factores bióticos y abióticos.

Uno de los principales desafíos que enfrenta la investigación de estas sustancias es su caracterización, conocer su estructura y fórmula. Los numerosos trabajos realizados hasta la fecha, no han conseguido de manera precisa, ninguno de los aspectos antes mencionados, así como el mecanismo por el cual estas sustancias ejercen diversos efectos biológicos, que en su mayoría son positivos, tanto en plantas como en animales, así como en ecosistemas terrestres y acuáticos.

Éste trabajo pretende comprobar, los beneficios que ofrecen las sustancias húmicas y en especial el ácido fúlvico en un sistema biológico animal.

Los principales objetivos de esta investigación son:

a) Estudiar la influencia del ácido fúlvico en el metabolismo de ciertos electrolitos como el I^- y Fe^{3+} , dada su importancia en la glándula tiroidea y el sistema hematopoyético, usando isotopos radiactivos de ^{131}I y ^{59}Fe , ya que ambos son emisores gamma, fácilmente identificados en el detector de centelleo sólido por espectrometría gamma

b) Comprobar la posibilidad de que éste ácido incremente el título de anticuerpos, para ello se cuantificara la concentración de inmunoglobulinas totales, y específicamente inmunoglobulina G, ya que éste último es uno de los más abundantes en el suero sanguíneo.

Los métodos utilizados en la presente investigación fueron, enzimoimmunoanálisis para inmunoglobulina G y refractometría en el caso de inmunoglobulinas totales. En los ensayos se usaron ratones y ratas macho de la cepa ICR y Sprague Dawley.

Para la medición de electrolitos, se empleo una sola dosis de ácido fúlvico y un sólo tiempo de tratamiento, mientras que para determinar el título de anticuerpos, se usaron tres dosis y dos tiempos de tratamiento.

ABSTRACT

The humus refers to the fraction of organic material which includes a group of substances are difficult to classify, dark colored, high molecular weight colloidal nature and acidic properties. Humic substances are the result of natural processes of humification and are the most active organic matter, its composition depends on biotic and abiotic factors.

One of the main challenges facing research into these substances is their characterization, to know its structure and formula. The numerous studies conducted to date have failed precisely, none of the above aspects and the mechanism by which these substances exert various biological effects, most of which are positive in plants and animals, as well as terrestrial and aquatic ecosystems.

This work seeks to establish the benefits offered by humic substances especially fulvic acid in a biological system animal.

The objectives of this research are:

- a) To study the influence of fulvic acid in the metabolism of certain electrolytes such as I^- and Fe^{3+} , due to their importance in the thyroid gland and the hematopoietic system. For this purpose radioisotopes ^{131}I and ^{59}Fe (both gamma emitters) were used and can be measured easily by gamma spectroscopy
- b) Another aim as this work is to study the possibility that fulvic acid may increase the antibody titer. To evaluate this aim, the concentration of total immunoglobulins and immunoglobulin G specifically, since the latter is of the most abundant in the blood serum. The methods used in this study were, enzyme immunoassay for immunoglobulin G and refractometry for total immunoglobulin. In the tests were used mice and rats ICR strain male and Sprague Dawley rats.

For measurement of electrolytes, was employed a single dose of fulvic acid and a single treatment time, while determining the antibody titer were used three doses and two treatment times.

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

Las sustancias húmicas son residuos de plantas y animales en estado de descomposición, unidos a los productos sintetizados por los microorganismos del suelo. Esta composición no es estable sino que presenta gran dinamismo, por lo que no solo representa un grupo de sustancias, más bien, un estado de materia orgánica diferente, según sus condiciones de formación. Actualmente se conoce, dentro de ciertos intervalos, la composición elemental de las sustancias húmicas. Sin embargo, la complejidad intrínseca de estos materiales debido a la variabilidad de factores que intervienen en su formación, hace que el estudio de su estructura química y sus efectos, sea complicado.

El fraccionamiento de las sustancias húmicas bajo condiciones de pH muy amplias, da como resultado, tres componentes básicos: humina, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos.

Los ácidos fúlvicos son la fracción de menor masa molecular de las sustancias húmicas, solubles en medio ácido y básico. Estos ácidos se encuentran débilmente aromatzados, de naturaleza coloidal, formados en su mayoría por cadenas alifáticas. Son moléculas poco polimerizadas comparadas con los ácidos húmicos y generalmente están enriquecidos con grupos funcionales ácidos en su mayoría $-OH$ y $-COOH$ que les proporcionan una elevada capacidad de intercambio catiónico (CIC). Tienen una masa molecular relativamente baja y son biológicamente muy activos. Una vez formados, los ácidos fúlvicos probablemente sufran reacciones de condensación para formar ácidos húmicos más complejos.

En China, el uso de ácidos fúlvicos es una práctica muy popular, ya que son utilizados para el tratamiento de muchos padecimientos. Esto se debe a las propiedades que se les atribuyen, entre las que destacan: antiinflamatorios, anticoagulantes y por lo tanto promotores de la circulación sanguínea, útiles en el tratamiento de úlceras del tracto digestivo, del colon y dérmicas; mejoran el sistema inmune, regulan el sistema endocrino, previenen cánceres y disminuyen problemas de reumatismo.

Se ha encontrado relación entre personas longevas (120 – 140 años) que han ingerido preparados de ácidos fúlvicos toda su vida. Estos resultados han propiciado que en geriatría se comience a tratar a los pacientes con ácidos fúlvicos para mejorar su calidad ósea,

muscular y nerviosa, así como para combatir los estragos de la artritis y diabetes, además de minimizar alergias.

Dada su gran actividad biológica, resulta de gran interés estudiar los efectos fisiológicos que los ácidos fúlvicos ponen de manifiesto al reforzar el sistema inmunológico, así como su propiedad de formar quelatos con un gran número de metales. Por lo que de manera general, éste último forma parte del trabajo central de la presente investigación, llevada a cabo en ratones y ratas de la cepa ICR y Sprague Dawley respectivamente.

CAPITULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Posiblemente:

- a) El ácido fúlvico sea capaz de mejorar la absorción del hierro no hemático (ion férrico) así como del ion yoduro a nivel intestinal.

- b) El ácido fúlvico actúe como agente inmunógeno estimulando así la producción de anticuerpos.

2.2. Objetivos

2.2.1. General

Estudiar el efecto de los ácidos fúlvicos en la fisiología de ratas y ratones.

2.2.2. Particulares

- 1- Determinar la concentración de los iones $^{59}\text{Fe}^{+3}$ y $^{131}\text{I}^{-}$ mediante espectrometría gamma, en hígado, tiroides, riñones, sangre, orina y heces en ratones tratados con y sin ácido fúlvico.

- 2- Determinar la concentración de IgG y anticuerpos totales en el suero sanguíneo de ratones tratados con y sin ácido fúlvico. Por el método de enzimoinmunoanálisis y refractometría.

- 3- Determinar la concentración de anticuerpos totales por refractometría, en el suero sanguíneo de ratas tratadas con y sin ácido fúlvico.

CAPITULO 3. GENERALIDADES

3.1. Compostaje

La materia orgánica se descompone por vía aeróbica o por vía anaeróbica. Llamamos "compostaje", al ciclo aeróbico (con alta presencia de oxígeno) de descomposición de la materia orgánica. Llamamos "metanización" al ciclo anaeróbico (con nula o muy poca presencia de oxígeno) de descomposición de la materia orgánica^{1,2}. Este compostaje constituye un "grado medio" de descomposición de la materia orgánica, que ya es en sí un buen abono. Se denomina humus al "grado superior" de descomposición de la materia orgánica. El humus supera al compostaje en cuanto abono, siendo ambos orgánicos.

En el compostaje, la descomposición biológica de los residuos orgánicos es garantizada por las comunidades de microorganismos que conducen al producto final que es rico en humus. La calidad del compostaje se define por su estabilidad y madurez. Su madurez se relaciona con su nivel de sustancias húmicas, que son producidas en la última etapa del proceso de compostaje³, mientras que su estabilidad esta dada por el nivel de actividad microbiana. El compostaje inestable se caracteriza por grandes cantidades de materia orgánica fácilmente degradable. Es la madurez, un factor determinante en su comercialización: uno de los problemas asociados al compostaje no maduro es que la descomposición de la materia orgánica no estabilizada, continúa, incluso cuando el compostaje se ha incorporado al suelo. Este proceso puede provocar que el suelo se vuelva anaerobio mientras que la biomasa microbiana utiliza el oxígeno disponible en los poros del suelo para degradar la materia orgánica no estabilizada completamente contenida en el compostaje. Esto priva de oxígeno a las raíces de la planta y conduce a la generación de H₂S y de NO₂⁴.

3.2. Humus

El humus es un material complejo, amorfo y de naturaleza coloidal, que surge de los residuos vegetales modificados. La caracterización del humus dista mucho de estar completa, y los conceptos relacionados con el proceso de su formación son, en gran extensión, especulativos. El humus hace referencia a una fracción de la materia orgánica que engloba a un grupo de sustancias difícilmente clasificables, de color oscuro, muy resistentes al ataque microbiano, de masa molecular elevada, de naturaleza coloidal y propiedades ácidas⁵.

Las sustancias húmicas son el resultado de los procesos naturales de humificación⁶, consisten de una mezcla de diferentes compuestos orgánicos resultantes de la descomposición de residuos vegetales y animales⁷. Durante el compostaje, las sustancias no húmicas, tales como polisacáridos y ligninas, se degradan y, posteriormente se polimerizan para producir sustancias húmicas⁸.

3.3. Sustancias húmicas (SH)

Se encuentran en todos los ambientes terrestres y acuáticos, y constituyen una de las formas más abundante de materia orgánica en la superficie de la Tierra⁷. Estas sustancias no son especies químicas estequiométricas, sino más bien fases coloidales macromoleculares. Sus composiciones son variables y difieren mucho de una muestra a otra⁹. Las sustancias húmicas son la parte activa de la materia orgánica, cuenta con 70-80% de toda la materia orgánica de suelo¹⁰. Son las macromoléculas orgánicas más extensamente distribuidas en la superficie de la Tierra.

Más recientemente, estas sustancias han sido descritas como asociaciones supramoleculares en lugar de polímeros macromoleculares, este modelo implica que las sustancias húmicas heterogéneas se auto-ensamblan en una conformación supramolecular, estabilizado principalmente por fuerzas débiles, como las interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno¹¹.

Las sustancias húmicas se componen de una serie de ácidos, de color amarillo-negro, de masa molecular moderadamente alta que se forman por reacciones de síntesis secundaria y tienen características diferentes a los compuestos que están presentes en los organismos vivos¹²⁻¹⁵. Químicamente tienen una estructura central de cadenas alifáticas unidas a anillos aromáticos, hidratos de carbono y restos peptídicos y un número considerable de grupos carboxilo^{12,16}. La aromaticidad de las sustancias húmicas, extraída de suelos de diferentes orígenes edafológicos, oscila entre 30 a 60%, muchos de ellos en el intervalo de 47 – 60%.

Una de las características más llamativas de las sustancias húmicas es su capacidad de interactuar con iones metálicos para formar complejos solubles en agua de aspecto coloidal de distintas propiedades químicas y estabilidad biológica^{12,14}. Teniendo en cuenta la unión de los metales traza, las sustancias húmicas pueden describirse mejor como ligandos con una variedad de grupos funcionales diferentes que pueden unirse a los metales traza de muchas maneras.

La formación de más de un enlace entre el metal y la molécula orgánica, por lo general resulta en una alta estabilidad del complejo. Los grupos funcionales más importantes de las sustancias húmicas que se enlazan con los metales son posiblemente los que contienen oxígeno como carboxilo, hidroxilo y fenólicos¹⁷⁻²⁶.

También las sustancias húmicas juegan un papel vital en la fertilidad del suelo y en la nutrición vegetal. El valor de estas sustancias se relaciona con las múltiples funciones que estos compuestos orgánicos complejos realizan como parte del ciclo de vida en la Tierra. Las sustancias húmicas influyen directa o indirectamente en el crecimiento y en la absorción de nutrientes de las plantas, la germinación de semillas, el metabolismo energético, etc. Sin embargo, su estructura molecular sigue siendo un tema de debate²⁷. Actualmente se conoce, dentro de ciertos intervalos, la composición elemental de las sustancias húmicas. Sin embargo, la complejidad de estos materiales se debe a sus mecanismos de formación y pueden ser ligeramente diferentes, debido a la variabilidad de factores que dependen de circunstancias geográficas, climáticas, físicas y biológicas, esto hace que el estudio de las estructuras químicas que las conforman sea realmente complicado. Por consiguiente, la incapacidad de definir a las sustancias húmicas en términos químicos específicos nos fuerza a usar definiciones imprecisas, en base únicamente a las características observadas en los procesos de su fraccionamiento. En este sentido, es posible realizar un fraccionamiento de las sustancias húmicas en distintos componentes que presentan diversas propiedades físicas y químicas (Figura 1).

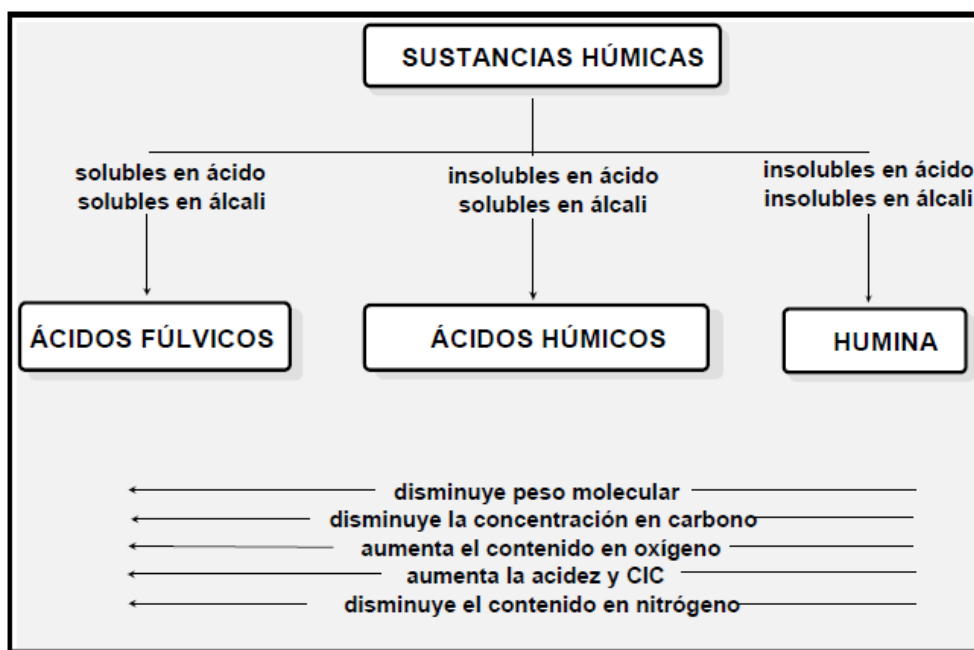


Figura 1. Fraccionamiento de las sustancias húmicas²⁸.

La técnica de fraccionamiento más común y aceptada es la basada en sus diferentes solubilidades en agua con amplios valores de pH, y estas se clasifican en:

- (a) Humina. Fracción insoluble a cualquier pH
- (b) Ácidos húmicos. Fracción insoluble a pH ácido.
- (c) Ácidos fúlvicos. Fracción soluble a cualquier pH²⁹.

Estas sustancias tienen características polianiónicas debido al gran número de grupos funcionales³⁰ que poseen. Aunque hay autores que suelen clasificar a las sustancias húmicas en base a su masa molecular, así, las fracciones de masa molecular baja, se conocen normalmente como ácidos fúlvicos y las de masa molecular alta como ácidos húmicos.

A pesar de numerosos estudios sobre los efectos biológicos de las sustancias húmicas, el mecanismo de su acción aún no está claro. La razón principal parece ser su naturaleza estocástica (aleatoria). En comparación con otras macromoléculas biológicas, que son sintetizadas por un organismo vivo, de acuerdo con la información codificada en el ADN (ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, anticuerpos, etc), las sustancias húmicas, son productos de la síntesis estocástica.

Las sustancias húmicas ofrecen múltiples beneficios tanto a plantas como a animales, así como a los ecosistemas terrestres y acuáticos, en la **Tabla 1**, se resumen algunos de los efectos biológicos observados en distintos organismos.

Tabla 1. Algunos de los principales efectos biológicos de las sustancias húmicas en plantas y animales

| Efectos observados |
|--|
| <i>Plantas</i> |
| Estimulan la germinación y el crecimiento ³¹⁻⁴⁴ |
| Mejora la captación de nitrógeno ⁴⁵⁻⁵⁴ |
| Mejora la absorción de elementos minerales ^{45,55-63} |
| Estimulan la biosíntesis de proteínas y clorofila II ^{31,32,50,55,64} |
| Mejoran la adaptabilidad y tienen efectos desintoxicantes ^{31,32,65-67} |
| <i>Animales</i> |
| Actividad inmunomoduladora ^{66,68} |
| Actividad antimutagénica ⁶⁹⁻⁷¹ |
| Capacidad desintoxicante ⁷²⁻⁷⁵ |

3.3.1. *Huminas*

Son el componente húmico más estable en el suelo y de mayor masa molecular, insolubles a los agentes químicos degradantes y se unen fuertemente a los coloides minerales más finos del suelo (arcillas). Constituyen el 50% ó más de la materia orgánica del suelo, de una gran inercia, están constituidas por ácidos húmicos tan íntimamente unidos a la parte mineral del suelo que no puede separarse de ella; así como también por sustancias húmicas de alta condensación, su contenido de carbono es superior al 60%.

Estas sustancias tienen un tamaño molecular mayor, ya que sus masas moleculares pueden ser alrededor de 300,000 Dalton. El contenido de oxígeno en esta sustancia es el más bajo y cae en el intervalo de 32 - 34%, mientras que el contenido de nitrógeno es el más alto, siendo superior al 4%.

3.3.2. *Ácidos Húmicos (AH)*

El ácido húmico es un componente importante en las sustancias húmicas. Contiene anillos aromáticos, grupos hidróxido fenólico y carboxilo, que actúan como puntos de enlace para los iones metálicos⁷⁶. Por lo tanto, el ácido húmico forma fácilmente complejos con el hierro, cinc, manganeso o cadmio⁷⁷. Los ácidos húmicos regulan el proceso óxido-reducción del medio edáfico, suministrando oxígeno al sistema radicular de las plantas cuando el humus se une químicamente a un catión, lo que forma humatos. Por ejemplo, el humato de calcio se disocia en el suelo liberando oxígeno y calcio al medio. Su masa molecular es de alrededor de 5,000 a 100,000 Dalton. El oxígeno representa un 34 – 36 %, mientras que el nitrógeno representa el 4%. La acidez total del ácido húmico se encuentra entre (400 – 870 mmol/100 g). Su contenido de grupos –COOH y –OH es en promedio 3,6 mol de COOH/kg de materia seca y 3,9 mol de OH/kg de materia seca⁷⁸. La **Figura 2** muestra un modelo teórico TMB (Temple-Northeastern-Birmingham) del ácido húmico.

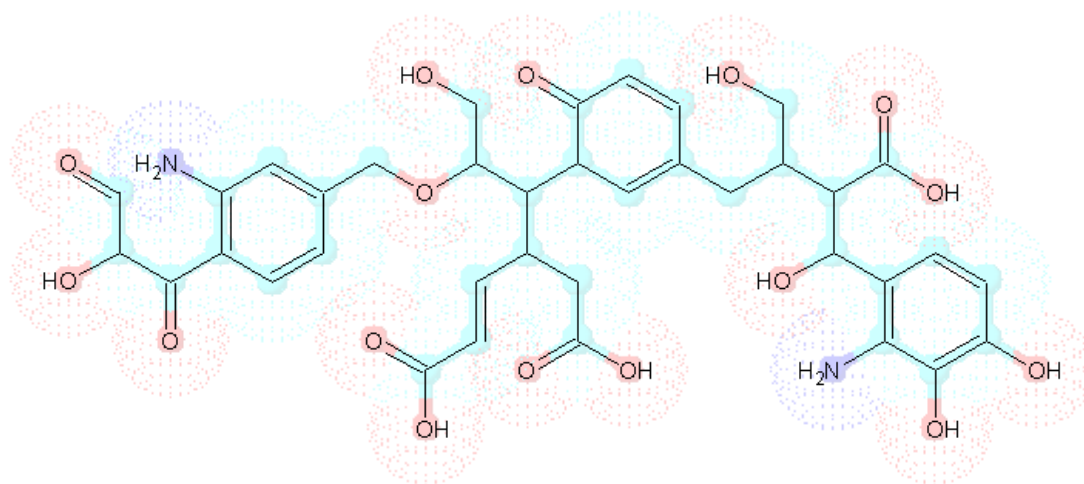


Figura 2. Modelo teórico TMB del ácido húmico⁷⁹

3.3.3. Ácidos fúlvicos (AF)

Los ácidos fúlvicos contienen un mayor número de grupos funcionales de carácter ácido particularmente carboxilos, hidroxilos y fenoles. Además, en los ácidos húmicos la mayor parte del oxígeno se encuentra formando parte del núcleo o estructura central, en uniones éter o éster, mientras que para los ácidos fúlvico se encuentra como -COOH, -OH o C=O. Las **Tablas 2 y 3** resumen las propiedades ácidas y composición elemental respectivamente para los ácidos húmicos y ácidos fúlvico. Comparando los datos de la **Tabla 3**, se puede decir que los ácidos fúlvicos presentan una mayor acidez que los ácidos húmicos, debido al gran número de grupos carboxilo e hidroxilo. Estos ácidos húmicos son la fracción de menor masa molecular, aproximadamente 2,000 Dalton. Son los ácidos con el mayor contenido de oxígeno (45 – 48%) y el menor contenido de nitrógeno (< 4%). La acidez total de los ácidos fúlvicos es más alta que para los ácidos húmicos (900 – 1400 mmol/100 g). El contenido promedio de grupos -COOH y -OH es 8,2 mol COOH/kg de materia seca y 3,0 mol de OH/kg de materia seca³.

Estos ácidos tienen la propiedad de formar quelatos de masa molecular muy baja con iones de carga positiva. Los quelatos de minerales, son altamente absorbibles por las plantas y animales. Este proceso de quelación natural, permite a las plantas almacenar, tanto vitaminas como minerales, y en cuanto a su absorción, los ácidos fúlvicos son más activos biológicamente debido su menor masa molecular. La **Figura 3** muestra un modelo teórico TMB del ácido fúlvico.

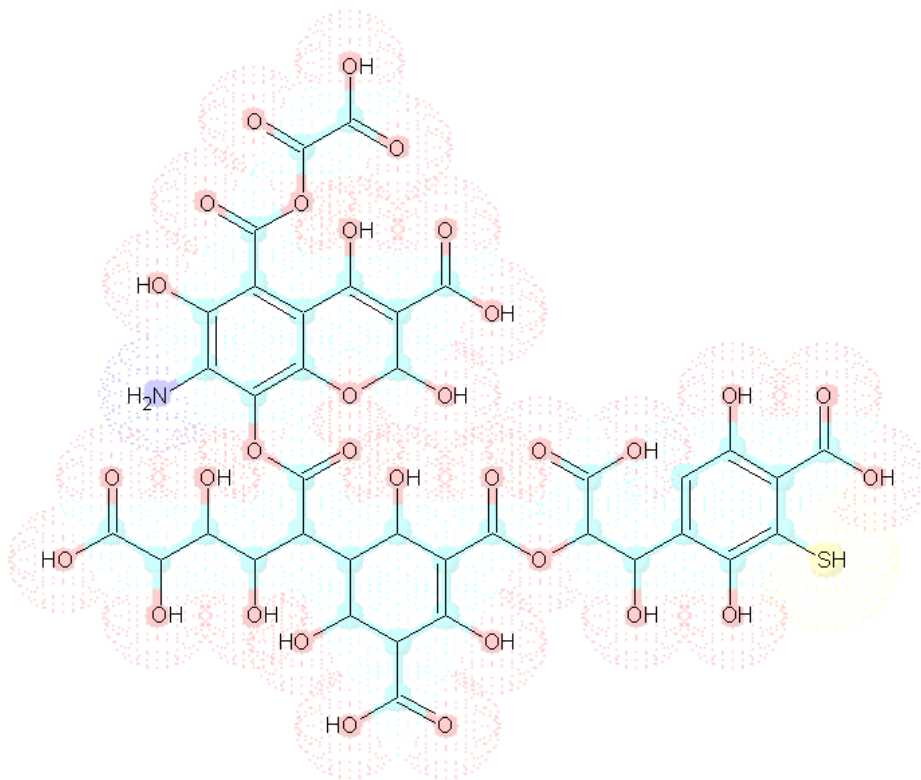


Figura 3. Modelo teórico TMB del ácido fúlvico⁸⁰

Tabla 2. Distribución de grupos funcionales oxigenados en las sustancias húmicas (mEq/100g)⁸¹

| | AH | AF |
|-------------------------------------|-----------|------------|
| Acidez total | 560 – 890 | 640 – 1420 |
| -COOH | 150 – 570 | 520 – 1120 |
| -OH ácidos | 210 – 570 | 30 – 570 |
| -OH alcohólicos y débilmente ácidos | 20 – 490 | 260 – 950 |
| -C=O cetónicos y de quinonas | 30 – 140 | 120 – 420 |
| -OCH3 | 30 – 80 | 30 – 120 |

Tabla 3. Intervalos usuales para la composición elemental de las sustancias húmicas⁸¹

| Elemento | AH | AF |
|----------|-------------|-------------|
| % C | 53,8 – 58,7 | 40,7 – 50,6 |
| % O | 32,8 – 38,3 | 39,7 – 49,8 |
| % H | 3,2 – 6,2 | 3,8 – 7 |
| % N | 0,8 – 4,3 | 0,9 – 3,3 |
| % S | 0,1 – 1,5 | 0,1 – 3,6 |

Dada la naturaleza estocástica de las sustancias húmicas, es de esperarse que, las fracciones de ácidos húmicos y ácidos fúlvicos obtenidas de ellas, también difieran en su composición elemental y masa molecular. De una manera muy particular, Álvarez y colaboradores⁸⁰ lograron caracterizar un tipo de ácido fúlvico proveniente de una sustancia húmica comercial. Los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

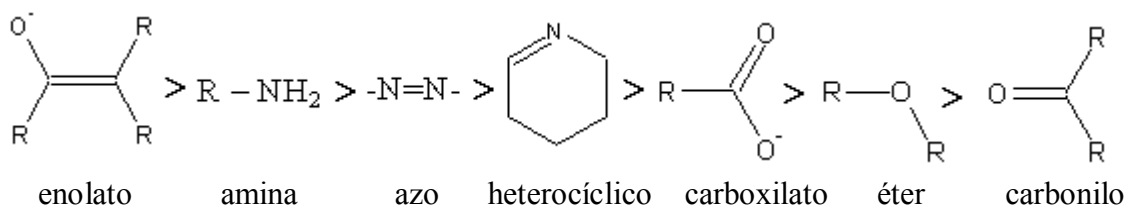
Tabla 4. Composición elemental, masa molecular y fórmula de un ácido fúlvico.

| | Datos experimentales | Datos teóricos |
|------------------------|---|---|
| (%) C | 40,1 | 42,26 |
| (%) H | 3,57 | 3,16 |
| (%) N | 0,67 | 1,33 |
| (%) S | 0,65 | 3,05 |
| (%) O | 55 | 50,2 |
| Fórmula | C ₃₅ H ₃₈ NS _{0,3} O ₃₆ | C ₃₇ H ₃₃ NSO ₃₃ |
| Grupo carboxilo | 6 | 6 |
| Grupo fenol | 3 | 4 |
| Masa molecular (g/mol) | 1 058 | 1 051 |

3.4. Propiedades de las sustancias húmicas

Como se observó anteriormente en la **Tabla 1**, las sustancias húmicas ofrecen múltiples beneficios atribuidos a las siguientes propiedades.

- 1- Forman complejos organometálicos. Los grupos funcionales con pares de electrones no compartidos son capaces de formar vínculos de coordinación con iones metálicos como se muestran a continuación en orden decreciente de afinidad por iones metálicos⁸²:



- 2- Tienen una estructura similar a los surfactantes⁸³⁻⁹⁰. Ya que cuentan con dos dominios, uno hidrofílico y otro lipofílico. Es decir, son de carácter anfílico y pueden ser adsorbidas en diferentes superficies naturales incluyendo las

membranas biológicas. Debido a sus propiedades tensoactivas, pueden modificar la estructura, fluidez y permeabilidad de dichas membranas. Se han publicado varias analogías entre las sustancias húmicas y los surfactantes ya que ambos han mostrado efectos en el crecimiento de las plantas superiores^{91,92} al mejorar la permeabilidad de la membrana celular^{93,94}.

Estas propiedades pueden ser las responsables de algunos efectos observados como son:

- a) Refuerzan al sistema inmunológico^{95,96}. Incrementan los polisacáridos y la abundancia de estos azúcares complejos, le permiten al organismo sintetizar glucoproteínas que forman parte de las de las células asesinas y células T
- b) Actúan como antiinflamatorios⁹⁷⁻⁹⁹ y antibacterianos.
- c) Ofrecen protección contra radiaciones ionizantes¹⁰⁰.

3.5. Metabolismo de los minerales.

Los elementos minerales presentes en el cuerpo pueden ser clasificados como elementos principales o macronutrientes y como oligoelementos. Dentro de los elementos minerales principales encontramos al calcio, magnesio, sodio, potasio, fósforo, azufre y cloro. Ellos constituyen del 60 – 80% de todo el material inorgánico del cuerpo. Por el contrario, los oligoelementos se encuentran en los tejidos vivos en pequeñas cantidades y pueden dividirse en tres grupos de un modo general en orden de importancia en:

- 1- Esenciales (micronutrientes). Hierro, yodo, cobre, zinc, manganeso, cobalto, molibdeno, selenio, cromo y flúor.
- 2- Posiblemente esenciales. Níquel, estaño, vanadio y silicio
- 3- No esenciales. Aluminio, boro, germanio, cadmio, arsénico, plomo y mercurio.

3.5.1. Yodo

El yodo es un material de construcción de las hormonas tiroideas que son esenciales para el crecimiento, el sistema nervioso y el metabolismo. En los mamíferos superiores el yodo se concentra en la glándula tiroidea, allí se convierte en aminoácidos yodados (principalmente tiroxina y yodotirosinas). Éstos se encuentran almacenados en la tiroidea como tiroglobulina y, aparentemente, la tiroxina es secretada por ésta glándula.

El yoduro se absorbe de forma rápida y segura en el tubo digestivo y es poca la cantidad que se pierde con las heces. En el cuerpo el yoduro está confinado en su mayor parte en el líquido extracelular, normalmente la concentración de yoduro en este líquido es muy baja, de unos 0,2 a 0,3 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$.

La eliminación del yoduro del líquido extracelular se realiza principalmente en dos puntos. A través del aire espirado y de la piel, se pierden pequeñas cantidades de yoduro, pero la eliminación del mismo se efectúa fundamentalmente por medio de la glándula tiroidea y del riñón. Normalmente se elimina por la orina unos 100 μg de yodo diarios, casi por completo en forma inorgánica. Esta cantidad es tan sólo ligeramente inferior al aporte medio diario de la dieta, lo que indica cuán escasa es la pérdida de yodo a través de otras vías. La más importante de éstas es la digestiva; con las heces se pierden aproximadamente 10 μg de yodo al día principalmente en forma orgánica¹⁰¹. Las pérdidas fecales de yodo orgánico pueden ser excesivas cuando está alterada la

absorción digestiva¹⁰², como los estados diarreicos crónicos. Finalmente, pueden producirse pérdidas notables de yodo orgánico e inorgánico a través de la lactación.

El segundo punto principal de eliminación de yoduro del líquido extracelular es la glándula tiroidea. El yoduro extraído del plasma por la tiroides no se pierde de modo irreversible, puesto que, finalmente, es secretado a la circulación en forma de tironinas yodadas T₄ y T₃ que juegan un papel importante para el desarrollo, el crecimiento y el metabolismo¹⁰³⁻¹⁰⁶ o de yoduro inorgánico. La glándula tiroidea contiene la mayor cantidad de yodo del cuerpo, unos 5 a 7 mg en circunstancias normales, la mayor parte del mismo en forma de aminoácidos yodados. El yoduro que se pierde en la tiroides, así como el liberado por los tejidos periféricos durante la degradación de las hormonas tiroideas, vuelven a entrar al líquido extracelular, donde su destino es indiferenciable del yoduro de origen dietético.

3.5.2. Hierro

El hierro se encuentra presente en el organismo en cantidades que van de 3 a 5 g y más de la mitad de esta cantidad se encuentra unido a la hemoglobina de los eritrocitos, posteriormente los eritrocitos senescentes (viejos) son fagocitados por el sistema retículo-endotelial¹⁰⁷. Cada día, se necesitan entre 20 y 25 mg de hierro para la síntesis de hemoglobina en los reticulocitos.

Las propiedades químicas del hierro lo convierten en un elemento muy beneficioso pero también éstas propiedades dan lugar a la formación de hierro libre, que a su vez produce radicales libres a través de la serie de reacciones de Fenton. Como resultado, los organismos han desarrollado complejos mecanismos bioquímicos para mantener un equilibrio entre el hierro como elemento esencial y hierro como agente citotóxico. El hierro hemático se encuentra en la hemoglobina, la mioglobina y en las enzimas como citocromos y catalasas. El hierro no hemático se encuentra en la ferritina, la hemosiderina y la transferrina.

Los tejidos que lo contienen son la sangre, la médula ósea, el hígado, el bazo y la mucosa intestinal. Aproximadamente el 70% de hierro en el organismo está unido a la hemoglobina, mientras que alrededor del 10% se encuentra en las enzimas dependientes de hierro y aproximadamente el 20% se almacena en la ferritina, principalmente en el hígado¹⁰⁸. Con todo, la mayor parte del hierro orgánico está en la hemoglobina como se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Distribución del hierro en el organismo humano¹⁰⁹

| Moléculas de almacenamiento | Cantidad | |
|-----------------------------|------------|--------|
| | Porcentaje | Gramos |
| Hemoglobina | 75 | 3 |
| Ferritina y hemosiderina | 20 | 0,8 |
| Mioglobina | 3 | 0,13 |
| Enzimas hem | 0,2 | 0,08 |
| Transferrina | 0,1 | 0,004 |

Una vez que se degradan las moléculas fijadoras de hierro, éste se utiliza una y otra vez por el organismo, pues su eliminación es muy escasa, hecho que explica su cantidad total aparentemente pequeña. La excreción del hierro se lleva a cabo principalmente por el intestino delgado y, en las mujeres, además, por el sangrado menstrual. La pérdida diaria promedio en varones y mujeres adultos es de 1 y 1,8 mg respectivamente.

En los alimentos, el hierro se encuentra en dos formas básicas: hierro inorgánico (como Fe^{2+} y Fe^{3+}) y hierro hemático en el grupo hemo que forma un complejo con la protoporfirina IX. En una dieta promedio, el hierro inorgánico forma parte del 90% aproximadamente del contenido total de hierro, mientras que el hierro hemático representa el 10% restante^{110,111}. El hierro hemático se absorbe de 5 a 10 veces más fácilmente que el hierro no hemático¹⁶⁹. Como la carne contiene grandes cantidades de hemoglobina, mioglobina y citocromos, esta diferencia tiene significado desde el punto de vista nutricional. El hierro hemático se encuentra en los alimentos de origen animal y el segundo en los cereales y vegetales.

La absorción de hierro varía significativamente con la composición de la dieta y la biodisponibilidad de las diferentes formas de hierro. Se ha estimado que en el mundo desarrollado, donde el consumo de carne es relativamente alta, más de la mitad de todo el hierro que se absorbe proviene de una dieta con hierro hemático de la hemoglobina o la mioglobina de las carnes, mientras que en el resto del mundo, el hierro se obtiene principalmente como Fe^{3+} de origen vegetal^{110,111,113-115}. Una fuente de hierro alternativa en algunas dietas proviene de los suplementos de hierro farmacéuticos como el Fe^{2+} ^{114,115}. Entre todas las fuentes naturales de hierro, el hierro hemático es el más biodisponible y su nivel de absorción no se ve afectado, independientemente del tipo de dieta. En contraste, la biodisponibilidad del hierro inorgánico si depende del tipo de dieta. Potenciadores, como el ácido ascórbico, aumentan la biodisponibilidad del hierro

inorgánico mediante la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} soluble. Algunos inhibidores como los fitatos (ácido fítico que forma parte de la fibra insoluble de los cereales) y los polifenoles en las plantas forman complejos insolubles con el hierro inorgánico y por lo tanto reducen su absorción^{111,116}. Además, la absorción del hierro inorgánico se ve influenciada por la secreción del ácido gástrico en el estómago con la acidez incrementa la solubilidad del hierro inorgánico¹¹³.

3.5.2.1 Absorción del hierro no hemático o inorgánico

3.5.2.1.1 Absorción del hierro férrico (Fe^{3+}).

Todo el tubo digestivo tiene capacidad para absorber hierro, pero la actividad máxima se halla en el duodeno parte alta del yeyuno, probablemente por la presencia de condiciones óptimas de pH y potencial redox. La absorción tiene lugar en forma ferrosa, el ion férrico, que forma hidróxidos solubles con valores de pH neutros y alcalinos, primero debe reducirse antes de ser absorbido. Para que haya reducción eficiente es indispensable un jugo gástrico ácido. Esta reducción también se lleva a cabo por la reductasa férrica¹¹⁸ de las células epiteliales del intestino delgado y la absorción del Fe^{2+} en los enterocitos se produce a través de un transportador de metal divalente (DMT1). El hierro en estado ferroso se absorbe con mayor facilidad que el que está en estado férrico. Por ello un ambiente intestinal ácido (reductor) favorece por lo general la absorción. El hierro ferroso se une a glucoproteínas de superficie (o receptores específicos de la mucosa intestinal para el hierro), situadas en las células intestinales. Luego se dirige al retículo endoplasmático rugoso y a los ribosomas libres donde forma ferritina.

3.5.2.1.2 Absorción del hierro ferroso (Fe^{2+}).

La presencia predominante del hierro en los alimentos es como hierro ferroso. La absorción del hierro se lleva a cabo en la primera parte del intestino delgado y es facilitado por la vitamina C, el cobre¹¹⁹, la HAH1 (proteína de unión de Cu) y el HCl; éste último libera hierro férrico de los alimentos, el cual después forma quelatos con el ácido ascórbico y otras sustancias.

Esto garantiza la solubilidad de los iones férricos en el duodeno y el yeyuno, la cual es necesaria para que sean fijados por la apoferritina, el receptor presente en la mucosa intestinal. La quelación con compuestos de masa molecular baja, como fructosa y aminoácidos, también puede estimular la solubilidad preparatoria para la absorción. Está

en discusión si el propio jugo gástrico contiene sustancias especiales quelantes del hierro de masa molecular alta ó baja. Por otro lado, la ceruloplasmina, una proteína que contiene cobre, oxida el hierro ferroso a su forma férrica y promueve su utilización una vez que ha abandonado la célula de la mucosa y hace posible su incorporación a la apotrasferrina. Una visión general de la absorción de hierro en la dieta en el intestino humano se muestra en la **Figura 4**.

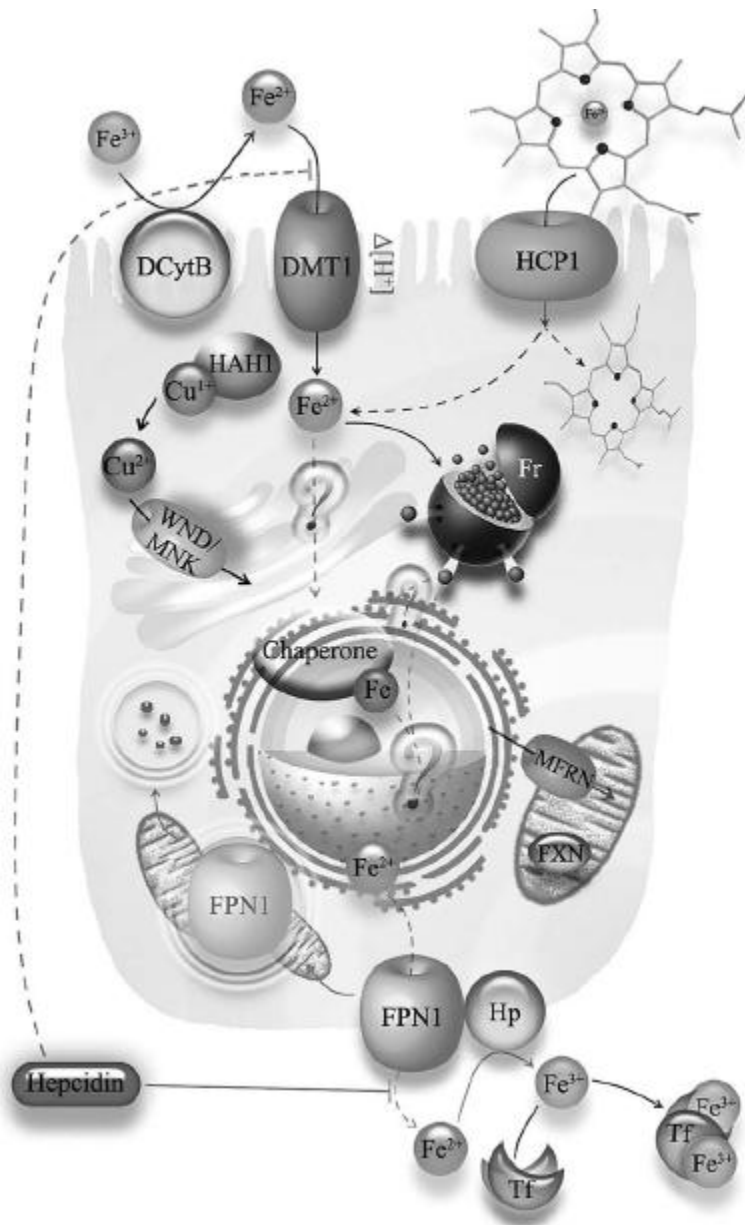


Figura 4. Absorción de hierro en un enterocito duodenal humano.

Los enterocitos son células epiteliales polarizadas con un polo luminal o apical cuya superficie está en contacto con el exterior del cuerpo o con la luz del conducto o cavidad, cubierto por vellosidades y un polo basal cuya superficie está en contacto y paralela a la lámina basal sobre la que se apoya la célula en la parte inferior. Dentro de la célula, los orgánulos que rodean el

núcleo se componen de 2 mitocondrias, un endosoma de reciclaje y el aparato de Golgi. La participación de una chaperona intracelular es marcada con un signo de interrogación. La absorción de Fe^{3+} implica la Dcytb (reductasa férrica) y el transportador DMT1 junto con un gradiente de protones ($\Delta[\text{H}^+]$). La absorción de hierro hemo implica a la HCP1 (proteína transportadora del grupo hemo). Dentro de la célula, las reservas de hierro se presentan en forma de ferritina (Fr). Las funciones de la ferroportina FPN1 o proteína transportadora hierro-reguladora y la Hp (hefaestina que facilita la salida del hierro desde los enterocitos) se indican por su suministro de Fe^{3+} a la apotransferrina (Tf). Mientras que la hormona peptídica hepcidina que es producida en el hígado regula el metabolismo del hierro¹²⁰.

3.6. Sistema inmunológico¹²¹

Los vertebrados (animales con espina dorsal) han desarrollado tres formas principales de protección contra las enfermedades: *barreras externas no específicas*, *defensas internas no específicas* y *defensas internas específicas*, también conocidas con el nombre de respuesta inmunitaria.

Primero, el cuerpo se defiende con barreras externas no específicas que impiden la entrada a la mayoría de los microbios. Estas barreras son estructuras anatómicas como la piel, cabello, cilios y secreciones como lagrimas, saliva y moco.

Segundo, si las barreras externas son traspasadas, una variedad de defensas internas no específicas entran en acción. Algunos glóbulos blancos fagocitan las partículas extrañas o destruyen las células infectadas.

La tercera y última línea de defensa consiste en defensas internas específicas o respuesta inmunitaria, en la que las células inmunitarias destruyen selectivamente la toxina o el microbio en particular y luego “recuerdan” al invasor, lo que permite una respuesta más rápida si éste reaparece en el futuro.

3.6.1. Defensas internas no específicas.

Estas defensas internas, atacan a una amplia variedad de microbios en vez de poner la mira en invasores específicos. Las defensas no específicas pertenecen a una de las tres categorías principales. *Primero*, el cuerpo cuenta con un ejército permanente de glóbulos blancos o leucocitos, algunos de los cuales se especializan en atacar y destruir células extrañas. *Segundo*, una lesión, con su combinación de tejidos dañados e invasión relativamente masiva de microbios, provoca una respuesta inflamatoria que hace entrar a los leucocitos en escena. *Tercero*, si ocurre una infección importante, el cuerpo puede generar fiebre, es decir, una temperatura elevada que frene la reproducción microbiana y, al mismo tiempo, aumente la capacidad del cuerpo para combatirla. En los humanos, el “termostato” está fijado a unos 37°C. Ciertos macrófagos, al responder a la infección, liberan unas citocinas llamadas *pirógenos endógenos* (“productores de fuego generado internamente”). Estas citocinas viajan por el torrente sanguíneo al hipotálamo y elevan el punto fijo del termostato, lo que origina respuestas que elevan la temperatura del cuerpo. Las citocinas también hacen que otras células reduzcan la concentración de hierro en la sangre. Al mismo tiempo, la elevada temperatura del cuerpo obliga a muchas bacterias a reproducirse con mayor lentitud y a utilizar más hierro; así, la fiebre

y la reducción en el hierro de la sangre se combinan para frenar la reproducción bacteriana.

El cuerpo contiene varios tipos de glóbulos blancos, llamados fagocitos, capaces de ingerir a los invasores extraños y desechos celulares por fagocitosis. Dos tipos importantes de leucocitos son los macrófagos y los neutrófilos (ambos viajan por el torrente sanguíneo). Los macrófagos también actúan como vigilantes y comen células muertas o en proceso de muerte y desempeñan un papel crucial en la respuesta inmunitaria al mostrar proteínas de los patógenos que ingirieron en sus membranas plasmáticas, de manera que las células del sistema inmunitario puedan identificar y responder a estos invasores.

Las *células asesinas naturales* son otra clase de glóbulos blancos. En general estas células atacan a las células del propio cuerpo que se han vuelto cancerosas o que han sido invadidas por virus, al reconocerlas por medio de las moléculas anormales en sus superficies. En vez de fagocitar a sus víctimas (como lo hacen los neutrófilos y macrófagos), las células asesinas naturales liberan proteínas que perforan la membrana de las células infectadas o cancerosas y luego secretan enzimas a través de éstos agujeros. Perforadas y luego atacadas por las enzimas, estas células no tardan en morir.

3.6.2. Defensas internas específicas.

La respuesta específica de estas defensas implica un ejército de glóbulos blancos especializados que secretan un conjunto de diferentes sustancias químicas y se comunican de formas complejas. La respuesta inmunitaria es posible gracias al sistema inmunitario, que consta de células y órganos distribuidos por todo el cuerpo. Los actores clave de la respuesta inmunitaria son dos tipos de linfocitos, llamados células B y células T. al igual que todos los glóbulos blancos, las células B y T nacen de precursores linfocíticos de la médula ósea. Algunos de estos precursores linfocíticos se liberan al torrente sanguíneo y viajan al timo, donde terminan de diferenciarse y se convierten en células T (de timo). En contraste las células B se diferencian en la médula ósea.

Las células inmunitarias reconocen a las moléculas extrañas que son específicas del microbio invasor o toxina; estas moléculas sirven como antígenos (“generadores de respuesta de anticuerpos”). En general, sólo las moléculas grandes y complejas como las proteínas, los polisacáridos y las glucoproteínas pueden actuar como antígenos. Los antígenos pueden estar en la superficie de los microbios invasores o las células

cancerígenas, los antígenos virales o bacterianos también están expuestos en las membranas plasmáticas de los macrófagos que los fagocitan.

3.6.3. El sistema inmunitario reconoce al invasor.

Las células del sistema inmunitario generan dos tipos de proteínas que reconocen antígenos específicos, se unen a ellos y ayudan a destruirlos: los anticuerpos, producidos por las células B y sus descendientes (células plasmáticas y células B de memoria), y los receptores de células T, producidos por las células T.

Los anticuerpos son proteínas constituidas por dos pares de cadenas peptídicas; un par de cadenas grandes o cadenas H (pesadas) idénticas y un par de cadenas pequeñas o cadenas L (ligeras) idénticas, unidas entre sí por puentes disulfuro, constituyendo una estructura simétrica en forma de Y (**Figura 5**). Ambos tipos de cadenas tienen dos tipos de regiones:

- 1- Una región constante, que es similar en todos los anticuerpos del mismo tipo y determina la clase de anticuerpo (IgG, IgM, IgD, IgE o IgA), sirve para activar a los fagocitos y al sistema de complemento; a ésta zona también se le conoce como dominio efector.
- 2- Una región variable, que difiere entre anticuerpos individuales y determina que antígeno se unirá al anticuerpo. Representa un plegamiento tridimensional (privativo de cada anticuerpo) que le permite encajar de manera específica con un determinado epítipo (forma más simple del determinante antigénico presente sobre una molécula completa de antígeno); por ello, a esta zona se le llama también dominio de unión.

La combinación de cadenas pesadas y ligeras produce un anticuerpo con dos partes funcionales: los “brazos” y el “tronco” de la Y. Las regiones variables en las puntas de los brazos del anticuerpo forman sitios de unión cuyas formas y cargas eléctricas las hacen específicas para un solo tipo, o unos cuantos tipos de antígenos. Por tanto, cada molécula de anticuerpo posee dos lugares de reconocimiento idénticos (uno en cada región variable) para un tipo concreto y particular de determinante antigénico o epítipo. Debido a ello, se dice que los anticuerpos son bivalentes. Varias piezas de los anticuerpos se unen mediante estructuras químicas llamadas enlaces de bisulfuro.

Hay cinco clases de anticuerpos, distinguidos por ciertas variaciones en la región del tronco. Los anticuerpos en las células B las activan cuando éstas se unen a un antígeno,

lo que provoca su división y produce células plasmáticas que secretan anticuerpos (**Figura 6**). Los anticuerpos secretados se unen a los antígenos y ayudan a desecharlos de varias maneras:

- 1- Algunos hacen a los antígenos más atractivos a los fagocitos o agrupan a los organismos patógenos para que sean fácilmente reconocibles y fagocitados.
- 2- Algunos anticuerpos interfieren con estructuras que permiten a las bacterias adherirse a sus células huésped o bloquean los sitios en los virus que promueven la entrada de estos a sus células huésped.
- 3- Otros anticuerpos se unen a toxinas bacterianas y las vuelven inofensivas
- 4- Los anticuerpos también activan las proteínas de la sangre del sistema de complemento.

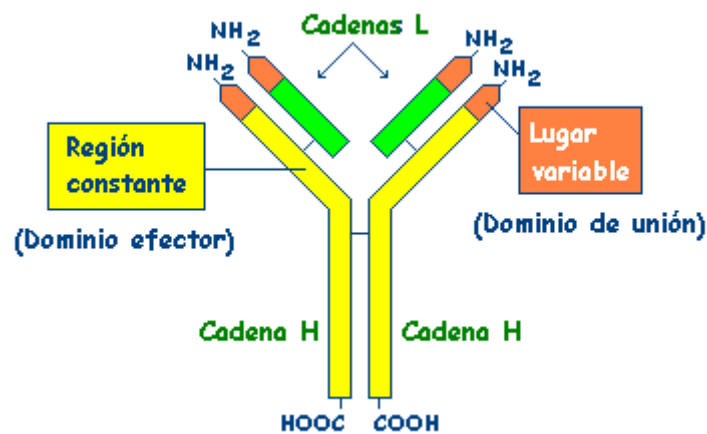


Figura 5. Estructura de los anticuerpos. Los anticuerpos son proteínas formadas por dos pares de cadenas peptídicas (ligeras y pesadas) dispuestas como la letra Y. Las regiones constantes de ambas cadenas constituyen el tronco de la Y; las regiones variables de las dos cadenas forman un sitio de unión específico en el extremo de cada brazo de la Y. Los diferentes anticuerpos tienen regiones variables distintas y forman sitios de unión únicos.

Los receptores de células T presentan diferencias y similitudes respecto a los anticuerpos. A diferencia de los anticuerpos, los receptores de células T no contribuyen directamente a desactivar a los organismos patógenos. En vez de ello, alteran la actividad de las células T a las que están unidas.

El cuerpo humano contiene un “ejército” de quizá 100 millones de anticuerpos distintos (y un número aun mayor de receptores de células T), por lo que los antígenos casi siempre encuentran anticuerpos o receptores capaces de unirse a ellos. Es importante darse cuenta de que el sistema inmunitario no “diseña” anticuerpos ni receptores de

células T en los que encajen los antígenos invasores, tal como un sastre podría diseñar ropa a la medida para un cliente. Más bien, el sistema inmunitario sintetiza al azar millones de anticuerpos y receptores distintos. Al igual que la ropa que se vende en una tienda departamental, el surtido de anticuerpos y receptores simplemente está ahí, esperando.

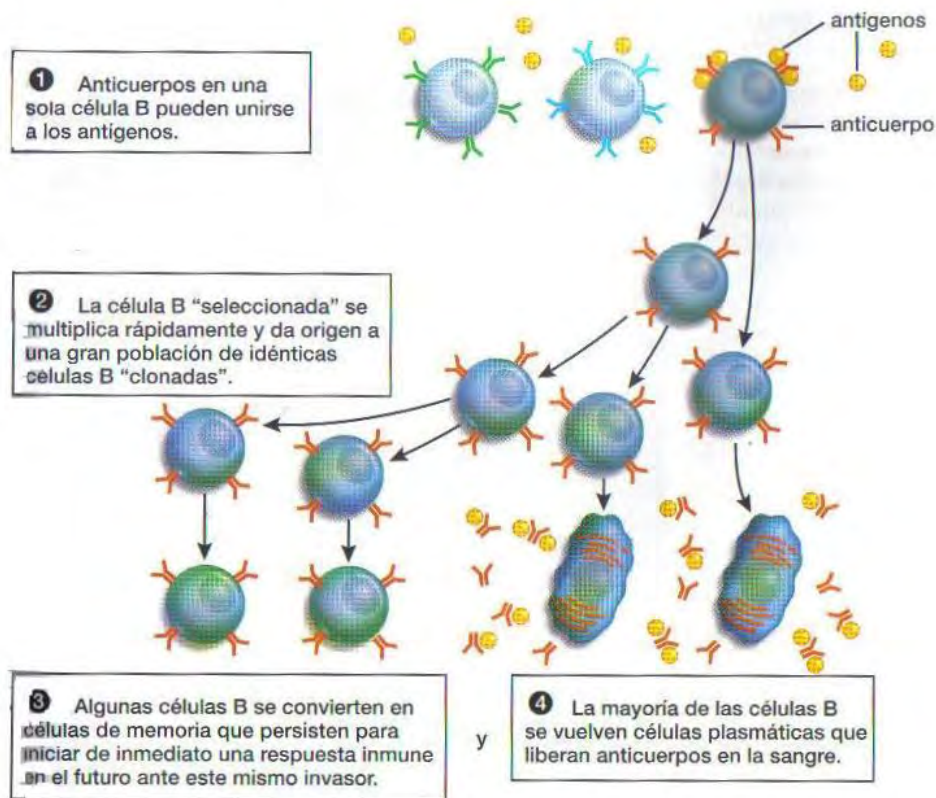


Figura 6. Selección clonal entre células B y producción de células plasmáticas. Los antígenos “seleccionan” una célula B al unirse a su anticuerpo específico haciéndola que se divida y se diferencie en célula plasmática y célula B de memoria.

3.6.4. El sistema de complemento.

El llamado sistema de complemento es un complejo constituido por 18 proteínas presentes en el plasma sanguíneo y otros líquidos corporales. Se denomina así porque complementa o ayuda a los anticuerpos en la lucha contra la infección. En ocasiones a estas proteínas se les llama “factores humorales inespecíficos” porque pueden actuar sobre diferentes agentes patógenos a diferencia de cómo lo hacen los anticuerpos, que reaccionan frente a un único antígeno y por eso se llaman factores humorales específicos.

Las proteínas de complemento actúan de dos modos:

- Uniéndose a los agentes patógenos y provocando su ingestión por macrófagos.
- Destruyendo directamente a las células infecciosas al perforar poros en su membrana plasmática y causar su lisis.

La actuación o intervención del sistema de complemento puede ser también activada por los complejos antígeno-anticuerpo. El sistema de complemento no destruye las células propias del organismo debido a que éstas poseen en su membrana proteínas que lo inactivan.

3.6.5. Anticuerpos

Los anticuerpos, al igual que otras proteínas, son propensos a la inestabilidad física y la degradación química^{122,123}. La inestabilidad física se produce por dos vías principales, la desnaturalización y agregación, siendo este último el tipo más común¹²²⁻¹²⁴. La agregación de las moléculas de anticuerpo es una preocupación, ya que la agregación a menudo resulta en una menor eficacia y pueden inducir una fuerte reacción inmunogénica¹²². Además, se ha demostrado que los agregados de inmunoglobulinas causan la nefropatía en pacientes con concentraciones séricas elevadas de IgM¹²⁵.

Los anticuerpos están formados por proteínas llamadas inmunoglobulinas. Existen cinco tipos o clases de inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE (**Figura 7**).

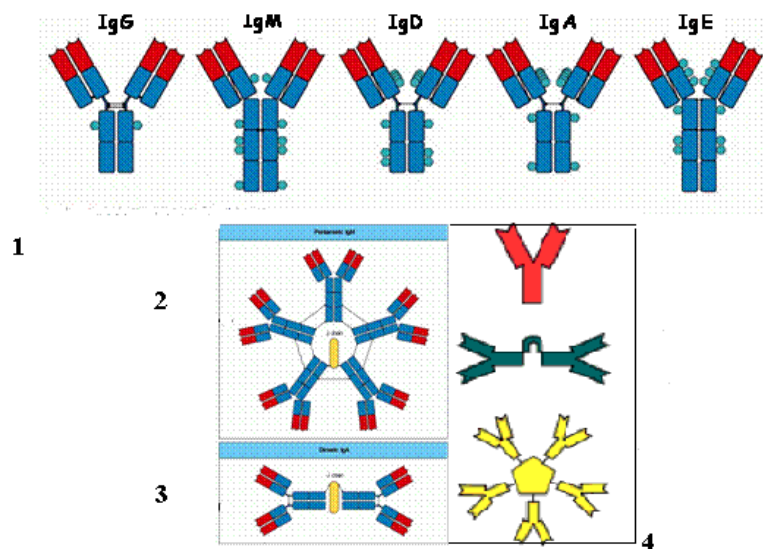


Figura 7. Estructura de las inmunoglobulinas, hay 5 isotipos fundamentales o clases (IgA, IgG, IgM, IgE, IgD), hay isotipos menores o subclases (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2). Los individuos normales producen todos los isotipos. 1- Isotipos determinados por el tipo de cadena pesada. 2- La IgM se secreta en forma pentamérica. 3- La IgA se secreta como monómero, pero puede dimerizarse en células endoteliales y ser secretada al exterior como dímero. 4- Monómero (IgD, IgE, IgG), dímero (IgA) y pentámero (IgM).

3.6.5.1 Inmunoglobulina G (IgG). La mayoría de los anticuerpos en la sangre y el líquido que baña los tejidos y células del cuerpo son de la clase IgG. La clase de anticuerpos IgG se encuentra compuesta por cuatro subtipos diferentes de moléculas llamadas subclases IgG. Estas son designadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La IgG es el isotipo predominante en el cuerpo. En los adultos normales, constituye aproximadamente el 80% del total de las inmunoglobulinas del suero. Dentro de la clase de IgG, las concentraciones relativas de las cuatro subclases son aproximadamente como sigue: IgG1, 60 – 70%; IgG2, 14 – 20%; IgG3, 4 – 8% e IgG4, 2 – 6%. Estas cifras varían algo de individuo a individuo, ya que la capacidad de un determinado individuo para producir anticuerpos de una u otra subclase de IgG puede estar bajo control genético. Otro factor que hace oscilar los valores antes mencionados es la edad. Por ejemplo, la IgG1 e IgG3 alcanzan niveles normales de adulto a los 5-7 años de edad mientras que los niveles de IgG2 e IgG4 aumentan más lentamente, alcanzando los niveles normales de adulto aproximadamente a los 10 años de edad. Algunas de las subclases de IgG pueden atravesar la placenta y entrar al torrente sanguíneo del nonato, mientras que otras no pueden y es la responsable de la protección del recién nacido durante los primeros meses de vida. Las subunidades no están dotadas de igual forma con ésta propiedad, la IgG2 por ejemplo, se transfiere con mayor lentitud que las demás. La IgG tiene la semivida más larga y también es la clase más estudiada de las inmunoglobulinas. Cada subclase de la IgG cumple con diferentes funciones en la protección del cuerpo contra infecciones. Por ejemplo, las subclases IgG1 e IgG3 son ricas en anticuerpos contra proteínas tales como las toxinas producidas por las bacterias de difteria y tétanos, así como anticuerpos contra proteínas virales. En contraste, los anticuerpos contra el revestimiento (cápsula) de polisacáridos (azúcares complejos) de algunas bacterias que causan enfermedades (neumococo y haemophilus influenzae) son predominantemente del tipo IgG2. Los anticuerpos IgG1 e IgG3 son generalmente inducidos en respuesta a antígenos de proteína, mientras que las IgG2 e IgG4 se asocian con antígenos polisacáridos. Los anticuerpos de ciertas subclases de IgG interactúan de manera pronta con el sistema de complemento, mientras que otras lo hacen pobremente, sí es que lo hacen, con las proteínas del complemento. Por lo tanto, la inhabilidad de producir anticuerpos de una subclase específica puede hacer que el individuo sea susceptible a ciertas clases de infecciones pero no a otras.

Los macrófagos portan sobre su superficie receptores que enlazan IgG1 e IgG3 y sus fragmentos Fc (fragmento que se une a varios receptores celulares). El enlace pasivo de

anticuerpos por tales receptores Fc es el responsable del “armamento” de los macrófagos, los cuales entonces ya pueden funcionar como citotóxicos.

3.6.5.2. Inmunoglobulina M (IgM). La IgM es la mayor de las inmunoglobulinas y constituye aproximadamente 10% de las inmunoglobulinas totales, consta de cinco unidades básicas unidas entre sí por el Fc gracias a puentes disulfuro que pertenecen a una cadena de polipéptido (cadena J presente en inmunoglobulinas poliméricas), para formar un pentámero con un peso molecular aproximado de 900 kDa (coeficiente de sedimentación 19S*). Las moléculas de IgM (19S) pueden someterse a una reducción y alquilización parcial, para obtener cinco unidades básicas (7S). La IgM es la primera clase de anticuerpos producidos durante una respuesta primaria¹²⁶, y esto, junto con su elevado potencial de activación del complemento y opsonización, la convierte en la principal defensa contra las infecciones bacterianas. Algunos de estos anticuerpos naturales no sólo participan como primera línea de defensa, sino que también desempeñan un papel en inmunoregulación¹²⁷. Los anticuerpos IgM se asocian con una respuesta inmune primaria y se utilizan con frecuencia para diagnosticar la exposición aguda a un inmunógeno o patógeno. En la circulación, la IgM en suero puede existir en diferentes formas. La forma pentamérica, suele estar compuesta por aproximadamente el 95% del total de IgM que circula. Es muy frecuente que una forma hexamérica, con un peso molecular de 1150 kDa, comprende la parte restante 5%¹²⁸. La IgM (con la IgD) constituye la mayor cantidad de inmunoglobulinas presentes en la superficie de las células B, es también la inmunoglobulina fijadora del complemento más eficiente ya que una sola molécula eslabonada al antígeno basta para iniciar la cascada del complemento.

*El Svedbergs (S) es una unidad usada para medir el coeficiente de sedimentación de una macromolécula y equivale a 10^{-15} s

3.6.5.3. Inmunoglobulina D (IgD). La molécula IgD es un monómero y su peso molecular es de aproximadamente 180 kDa (coeficiente de sedimentación de 7 a 8S) es ligeramente más alto que el de la IgG. Esta inmunoglobulina esta presente de manera normal en el suero en cantidades mínimas (0,2% del total de las inmunoglobulinas séricas), con una vida media corta en suero, que se puede atribuir a la sensibilidad de la molécula a la proteólisis, a las proteínas séricas como la plasmina y a su relativamente

lábil degradación por calor. Existen informes aislados de IgD con actividad de anticuerpo para ciertos antígenos incluyendo la insulina, la penicilina, las proteínas de la leche y los antígenos tiroideos. La función de la IgD circulante no está clara porque no se conoce su participación en los anticuerpos efectores.

3.6.5.4. Inmunoglobulina E (IgE). La IgE tiene una masa molecular aproximada de 190 kDa (coeficiente de sedimentación 8S). Comprende sólo el 0,004% del total de las inmunoglobulinas séricas, pero se liga con gran afinidad a las células cebadas (células de los tejidos que se parecen a un basófilo de la sangre periférica) a través de un sitio en la región Fc. La identificación de los anticuerpos IgE como reagentes (que aparecen en los fenómenos de hipersensibilidad o alergia inmediata tras el primer contacto con un antígeno) y la caracterización de ésta clase de inmunoglobulinas marcó un mayor avance en el estudio de los mecanismos involucrados en las enfermedades alérgicas. Se asocia con reacciones alérgicas y de hipersensibilidad. Al combinarse con ciertos antígenos específicos llamados alérgenos, los anticuerpos IgE desencadenan la liberación, a partir de las células cebadas, de los mediadores farmacológicos responsables de la roncha y de las reacciones de brote urticarial sobre la piel, evocadas por la exposición de los individuos alérgicos a los alérgenos. A pesar de que está presente a una concentración muy baja en el suero y de poseer la vida media más corta, la IgE es una inmunoglobulina muy potente. Recientemente, se han desarrollado anticuerpos anti-IgE para el tratamiento de alergias y asma¹²⁹.

3.6.5.5. Inmunoglobulina A (IgA). Representa la clase principal de las inmunoglobulinas halladas en las secreciones seromucosas, que en su mayor parte son producidas localmente, es fundamental en la protección de las superficies mucosas contra toxinas, virus y bacterias por medio de la neutralización directa o la prevención de la unión a la superficie de la mucosa. Cada molécula de IgA secretoria se compone de dos unidades básicas, no obstante, también aparece en el suero, en forma de una molécula 7S con una masa molecular aproximada de 170 kDa. La IgA normalmente existe en el suero en formas monomérica y polimérica, constituyendo aproximadamente el 15% del total de las inmunoglobulinas séricas. Sin embargo, la IgA secretoria aparece primordialmente en forma de una molécula 11S de peso molecular alrededor de 400 kDa. La IgA secretoria proporciona el mecanismo de defensa primaria contra una infección local debido a su abundancia en la saliva, las lágrimas, las secreciones

bronquiales, la mucosa nasal, el líquido prostático, las secreciones vaginales y las secreciones mucosas del intestino delgado. El predominio de la IgA secretoria en las secreciones de la membrana ha conducido a la especulación de que su principal función puede no ser la destrucción de los antígenos sino mas bien la de impedir el acceso de estas sustancias extrañas al sistema inmunitario general. La IgA intracelular también puede ser importante en la prevención de infecciones bacterianas o virales, su patogenia o ambos casos.

Los niveles séricos de IgA tienden a ser más altos que los niveles de IgM, pero considerablemente más bajos que los niveles de IgG. Por el contrario, los niveles de IgA son mucho mayores que los niveles de IgG en las superficies mucosas y en las secreciones, como la leche materna¹³⁰. En particular, la IgA puede contribuir hasta un 50% de la proteína del calostro, dado a la recién nacido por la madre. Por último, se ha propuesto que la IgA también podría actuar como un potenciador de la respuesta inmune en el tejido intestinal por medio de la captación del antígeno a células dendríticas¹³¹.

CAPITULO 4. ANTECEDENTES

4.1. Aplicaciones de las sustancias húmicas.

Las sustancias húmicas son objeto de estudio por distintas aéreas, entre ellas; la fisicoquímica, biológica, medicina, veterinaria, botánica, ecológica, geológica etc., con el fin de descubrir y comprobar sus beneficios, así como el de desvelar su estructura y mecanismo de acción. Hoy en día, las aplicaciones de las sustancias húmicas se pueden dividir en tres categorías principales: agricultura, medio ambiente y biomedicina.

4.1.1. Agricultura

Las sustancias húmicas juegan un papel importante desde el punto de vista agronómico ya que influyen significativamente en la calidad y la productividad del suelo. El efecto promotor del crecimiento vegetal por las sustancias húmicas ha sido observado por muchos autores. Los beneficios de las sustancias húmicas en las plantas pueden estar relacionados con sus efectos indirectos (incrementan la eficiencia de los fertilizantes) o directos (mejora la biomasa de la planta en general) tales como:

- a) Estimulan la captación de NO_3^- mediante la expresión de proteínas transportadoras de nitrato¹³²
- b) Actúan como sustancias de tipo hormonal¹³³⁻¹³⁵
- c) Mejoran la respiración vegetal¹³²
- d) Mejoran la asimilación de nutrientes y el metabolismo de la planta¹³⁶
- e) Incrementan la permeabilidad de la membrana celular¹³⁷⁻¹⁴¹

4.1.2. Medio ambiente

La principal tarea de las sustancias húmicas en la química del medio ambiente es remover los metales tóxicos, productos químicos orgánicos antropogénicos y otros contaminantes del agua. Como éstas sustancias se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes terrestres y acuáticos, se han realizado numerosos estudios sobre sus efectos descontaminantes, por ejemplo:

- a) Se utilizan en el tratamiento biológico de aguas residuales que contienen metales pesados (Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, As y Zn)¹⁴⁰

- b) Cuentan con un alto potencial para extraer metales del suelo y aguas subterráneas¹⁴¹
- c) Eliminan elementos radiactivos procedentes de las descargas de agua de las plantas de energía nuclear ya que influyen en la absorción de los radionúclidos y por lo tanto en su migración a las aguas superficiales y subterráneas^{142,143}
- d) Son auxiliares en la descontaminación de hidrocarburos presentes en suelos¹⁴⁴⁻¹⁴⁷
- e) Se utilizan filtros a base de humus para la purificación de aguas residuales, en la eliminación de gases de escape de algunas industrias¹⁴⁸

4.1.3. Biomedicina

Las sustancias húmicas se producen a escala comercial y se utilizan en medicina y en la práctica veterinaria. Al parecer, las sales de estas sustancias, son más activas dentro de las aplicaciones médicas, por ejemplo, los humatos (HU) son las sales de los ácidos húmicos. Algunas de las aplicaciones que se les dan tanto a las sustancias húmicas como a sus sales son las siguientes:

- a) *Actividad antiviral.* Desde hace tiempo se sabe que las sustancias húmicas tienen propiedades antivirales contra los rinovirus^{149,150}, virus A9 Coxsackie¹⁵¹, herpes simple tipo 1 (HSV-1) y 2 (HSV-2)¹⁵²⁻¹⁵⁸, inmunodeficiencia humana (VIH-1)¹⁵⁹⁻¹⁶⁴, influenza tipo A y B^{149,150,160,165}, así como otras infecciones del tracto respiratorio. Lo mismo sucede con el ácido húmico sintético derivado de compuestos polifenólicos y humatos, que en parte, su efecto es superior en comparación con los ácidos húmicos naturales¹⁶⁶⁻¹⁷⁰. El ácido húmico tiene una dosis letal media (LD₅₀) de 0,536 g/kg¹⁷¹, la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de algunos ácidos húmicos sintéticos y de algunos humatos se muestran en la **Tabla 6**. El efecto inhibitorio del ácido húmico y el ácido húmico sintético se dirige específicamente contra una etapa temprana de la replicación viral, es decir, antes del acoplamiento virus-célula¹⁷²⁻¹⁷⁴. Es probable que el ácido húmico polianiónico ocupe los dominios positivos de las glucoproteínas de la envoltura viral que son necesarias para el acoplamiento en la superficie celular¹⁷⁴.

Tabla 6. Concentración inhibitoria media antiviral de ácidos húmicos sintéticos y humatos¹⁶⁸

| Compuesto | Masa molecular (Da) | IC ₅₀ (µg/mL) |
|---------------------------------------|---------------------|--------------------------|
| Humato de sodio | 7500 | 18,2 |
| Humato de amonio | 7900 | 17,8 |
| HS-1500 (hidroquinona como precursor) | 5200 | 3,7 |
| KOP (ácido caféico como precursor) | 6000 | 2,3 |

- b) *Disminución del daño gástrico.* Se encontró que los ácidos húmicos administrados como profilaxis en ratas, redujo significativamente la extensión del daño gástrico inducido por etanol administrado a ratas con úlceras gástricas y duodenales acelerado significativamente el proceso de curación¹⁷⁵.
- c) *Actividad estrogénica.* Estudios realizados en el Instituto de Investigación de Cáncer en EU los ratones mostraron resultados positivo a la prueba Allen-Doisy tanto en los ácidos húmicos naturales como los ácidos húmicos sintéticos¹⁷⁶. La actividad estrogénica del humato de sodio se encontró que es 1/3000 de la preparación estándar de estriol. Aunque los componentes responsables de la actividad estrogénica de las sustancias húmicas sigue siendo objeto de debate, los resultados sugieren que el ácido húmico (siempre y cuando pueda penetrar la piel) puede contribuir sustancialmente al efecto estrogénico. Estos resultados pueden tener implicaciones dermatológicas y cosméticas en el uso de las sustancias húmicas.
- d) *Otros estudios.* Los estudios médicos muestran que enfermedades respiratorias virales comunes en los niños son fáciles de resolver con suplementos dietéticos de ácido fúlvico y también han mostrado tener un poder protector contra el cáncer que causan ciertos virus¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. El ácido fúlvico se ha utilizado también para el tratamiento clínico de las enfermedades inducidas por el daño de los radicales libres de oxígeno y algunas otras, tales como la artritis, cáncer, úlceras y reumatismo¹⁸⁰. Recientemente se ha estudiado la acción fisiológica de los ácidos fúlvicos en el cuerpo humano. Por ejemplo, la posible aplicación del ácido fúlvico como antimicrobiano¹⁸¹ y sus propiedades anti-inflamatorias¹⁸². Además, el ácido fúlvico extraído de la turba¹⁸³ mostró una actividad antioxidante y el ácido fúlvico extraído de la turba Sphagnum de Canadá¹⁸⁴ tuvo

un efecto inhibitor en la liberación de los mediadores químicos (basófilos) en ratas con leucemia.

- e) *Medico-veterinaria*. En veterinaria, las sustancias húmicas han sido aplicadas con éxito como fármacos profilácticos (preventivos) y terapias de enfermedades gastrointestinales en animales pequeños. Además, las sustancias húmicas son utilizadas como antídotos para prevenir intoxicaciones¹⁸⁵. Se observó que una concentración de ácido húmico del 0,1% es suficiente para reducir significativamente la incorporación de plomo y cadmio, minimizando así el riesgo de intoxicación por metales pesados¹⁸⁶. Experimentos en ratones mostraron que una administración oral de humato de plomo es menos tóxico que el acetato de plomo¹⁸⁷. Se han obtenido resultados opuestos siguiendo una aplicación parenteral usando los mismos compuestos. Claramente, la ruta de aplicación es un factor importante para decidir si la unión de un metal a las sustancias húmicas es tóxico o no. En otro experimente se encontró que altas concentraciones de sustancias húmicas (500 µg/kg) afectan la distribución de Cd en ratones¹⁸⁸. Ésto es muy importante debido a la naturaleza cancerígena y tóxica del Cd.

Los efectos de las sustancias húmicas (ácidos húmicos) en la respuesta regenerativa del tejido hepático se practico en ratones sometidos a hepatectomía de dos tercios de la masa de éste órgano. El consumo de estas sustancias por un largo periodo resultó en la estimulación de la ornitina descarboxilasa, un aumento en la actividad de la histamina y espermidina así como de los niveles de ADN y ARN y la masa total del hígado¹⁸⁹. Estas sustancias húmicas estimulan la respiración en las mitocondrias del hígado de rata cuando están presentes en concentraciones de 40 – 360 µg/mL, también aumentó la fosforilacion oxidativa en las mitocondrias *in vitro*, después de una hora de incubación¹⁹⁰.

El ácido húmico se ha utilizado como un agente antidiarreico, analgésico, inmunoestimulante y agente antimicrobial en la practica veterinaria en Europa¹⁹¹. El ácido húmico estabiliza la flora intestinal y asegura una mejor utilización de los nutrientes en la alimentación animal. Ésto conduce a un incremento de masa sin aumentar la cantidad de alimento ingerido, además de mejorar la digestibilidad en la dieta como resultado del mantenimiento de un pH óptimo en el intestino, lo que resulta en menores niveles de excreción de

nitrógeno y menos olor¹⁹². La estructura macrocoloidal del ácido húmico asegura una buena protección en la membrana mucosa del estómago, el intestino y los capilares periféricos. Como resultado de este proceso, la reabsorción de los metabolitos tóxicos se reduce o impide totalmente, sobre todo después de las infecciones, en el caso de residuos de sustancias nocivas en la alimentación animal.

4.2. Toxicidad de las sustancias húmicas

A pesar de los múltiples beneficios que estas sustancias ofrecen tanto en plantas como en animales, hay publicaciones que señalan todo lo contrario y esto puede atribuirse a su naturaleza estocástica por lo que algunas pueden ofrecer efectos positivos mientras que otras, pueden tener efectos adversos como los siguientes.

El ácido húmico es tóxico para muchas células mamíferas como las células endoteliales¹⁹³ y condrocitos^{194,195}. El consumo diario de 400 mg del ácido húmico afecta a la salud humana¹⁹⁶⁻¹⁹⁸.

La exposición al ácido húmico daña los tejidos y las células¹⁹⁹⁻²⁰³. Se ha encontrado que el ácido húmico produce un daño en el tejido pulmonar conduciendo a un enfisema y fibrosis pulmonar en fumadores y mineros^{204,205}. Tanto el ácido húmico como el ácido fúlvico se encuentran implicados en la enfermedad de pies negros, un padecimiento vascular endémico de la costa del suroeste de Taiwán^{206,207-209,197}. Se ha asociado al ácido húmico y al ácido fúlvico con la enfermedad de Kashin-Beck, un desorden osteoarttrítico crónico con necrosis de los condrocitos, que prevalecía en China²¹⁰⁻²¹². El ácido húmico también está asociado al bocio y cáncer, se ha demostrado que causa daño a las células endoteliales humanas^{213,198,201-203} y produce anomalías cromosómicas en células intestinales¹⁹⁹. Los mecanismos responsables de los efectos tóxicos del ácido húmico siguen siendo confusos, aunque muchos de ellos se encuentran acompañados por un aumento del estrés oxidativo²⁰⁰ y especies reactivas del oxígeno.

CAPITULO 5. METODOLOGÍA

5.1. Espectrometría gamma²¹⁴

La espectrometría gamma consiste en la obtención del espectro de las radiaciones gamma emitidas por los radionúclidos. La gran mayoría de los radionúclidos emiten partículas alfa o beta seguida de radiación gamma con energías discretas específicas. La técnica analítica llamada espectrometría gamma está basada en la medición de esa energía discreta para identificar a los radionúclidos presentes en una muestra sin necesidad de separaciones químicas, ni preparación previa de la muestra. Los espectrómetros gamma consisten en un detector de radiación gamma rodeado de un blindaje adecuado que permita obtener un bajo fondo de radiación y alta estabilidad para efectuar conteos de larga duración a muestras de muy baja actividad. Los componentes de un espectrómetro gamma son:

- 1- Detector
- 2- Preamplificador (de retroalimentación óptica en el caso de los detectores de centelleo)
- 3- Amplificador
- 4- Analizador

5.1.1. Detectores de centelleo

5.1.1.1. Principio

Cuando una partícula cargada, un rayo gamma o un rayo X, atraviesan ciertas sustancias luminiscentes, pierden energía al excitar su luminiscencia, dando lugar a la emisión de luz visible o ultravioleta, después de que en ellas se deposita energía por el paso de la partícula cargada. Ésta luz resultante puede alcanzar el cátodo de una fotocelda suficientemente sensible, resultando en un pulso eléctrico como respuesta a la llegada de cada partícula o fotón. Estos diminutos destellos son llamados centelleos (escintilaciones). Cuando los diferentes tipos de radiación interaccionan con éste material fluorescente, elevan a los electrones a niveles excitados de mayor energía y al regresar a sus estados fundamentales emiten luz. Para muchos cristales y plásticos ésta luz fluorescente es de color azul o violeta, mientras que para otros es ultravioleta ó infrarroja.

El centelleador permite determinar el espectro de energía de una radiación, midiendo la altura de los pulsos. El detector de centelleo consta, de dos partes fundamentales: la sustancia luminiscente y la fotocelda, esta es generalmente un tubo fotomultiplicador.

5.1.1.2. Sustancias luminiscentes

Cuando una partícula, rayo gamma ó X pasan a través del material centelleador, pierden su energía al llevar algunos electrones de valencia a la banda de conducción. Dichos electrones pierden energía al volver a su estado normal por diversos procesos, de los cuales el más importante es aquel que tiene lugar con emisión de luz en forma prácticamente inmediata al paso de la partícula nuclear, fenómeno conocido como fluorescencia. Las características de un material centelleador ideal son:

- 1- El espectro de emisión fotónica debe estar comprendido entre 2000 Å (U.V.) y 6000 Å (amarillo), con una mención favorable para el azul, que es la región de máxima sensibilidad de los fotocátodos.
- 2- Tener una gran rapidez de respuesta para detectar sin confusión cada partícula de alguna radiación nuclear. El tiempo en el que decae la luminiscencia inducida debe ser corto, para que las señales generadas sean rápidas. Una señal, en la cual la gran parte de la energía se emite en 10^{-6} s, es un gran límite para el buen funcionamiento de un centelleador.
- 3- Deben ser sensibles y selectivos para poder detectar e identificar una radiación muy débil y la medida de su energía.
- 4- Debe convertir la energía cinética de la partícula cargada o radiación electromagnética, en luz detectable con alta eficiencia de centelleo
- 5- La conversión debe ser lineal; esto es, la cantidad de luz emitida debe ser proporcional a la energía depositada.
- 6- Su índice de refracción debe ser cercano al del vidrio ($n = 1.5$), para emitir un paso eficiente de la luz del centelleador al tubo fotomultiplicador.

Las sustancias luminiscentes son muy numerosas y se pueden dividir en tres clases:

- a) Los cristales orgánicos, como antraceno, naftaleno, terfenilo etc. Los centelleadores orgánicos son usados para la detección directa de electrones rápidos y partículas cargadas pesadas. Tienen baja sección eficaz fotoeléctrica para los rayos gamma, ya que sus constituyentes (H, C, O) tienen un número atómico bajo.

- b) Las soluciones de sustancias orgánicas como xilol, xileno o un sólido plástico (polímeros). Estos centelleadores son empleados para muestras con muy baja actividad (beta), donde se requiere tener una eficiencia cercana al 100%.
- c) Los cristales inorgánicos como el sulfuro de zinc activado con plata ZnS(Ag), fluoruro de cesio activados con talio CsF(Tl), yoduro de sodio activado con talio NaI(Tl). El NaI con algunas impurezas de Tl es el centelleador más utilizado, debido al hecho de que más del 80% de su masa está constituida por átomos de yodo ($Z = 53$) ya que presenta una gran sección eficaz para la interacción fotónica con la radiación gamma.

La función que desarrollan los elementos activadores es ajustar la distribución espectral de la luz emitida, a la sensibilidad espectral del fotocátodo.

Cuando una partícula cargada atraviesa un cristal de centelleo lo hace en un tiempo muy corto, del orden de 10^{-10} s, dejando átomos y moléculas excitados en su trayectoria los cuales al desexcitarse emiten fotones. Ésta desexcitación no se realiza instantáneamente en todos los átomos o moléculas, sino que la intensidad total luminosa emitida tras el paso de la partícula decae en una forma exponencial dada por $\frac{I}{I_0} = e^{-t/\tau}$ donde

I_0 = intensidad luminosa alcanzada tras el paso de la partícula, I = intensidad luminosa al tiempo t , τ = constante de tiempo del orden de 10^{-9} para gases, 10^{-6} para cristales inorgánicos y 10^{-8} para orgánicos.

5.2. Enzimoanálisis (EIA)²¹⁵

El inmunoensayo es una técnica analítica que se basa en la reacción de conjugación antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). Su gran sensibilidad y especificidad permite la cuantificación de compuestos presentes en líquidos orgánicos en concentración reducida, del orden de ng/mL ó pg/mL. El desarrollo del inmunoensayo ha tenido gran impacto en el campo de la química clínica y de la endocrinología.

Los inmunoanálisis con reactivos marcados utilizan moléculas llamadas indicadoras o trazadoras que, unidas al reactivo antígeno (Ag) o anticuerpo (Ac), muestran que han tenido lugar una reacción inmunitaria Ag-Ac. Este tipo de inmunoanálisis consta de dos fases: una en que se produce la reacción inmunológica entre el antígeno y su anticuerpo específico, y otra en la que se determina el marcaje. Los principales marcajes son los isótopos radiactivos, las enzimas, los compuestos fluorescentes y los compuestos luminiscentes. Todos los inmunoensayos requieren el uso de material marcado para medir la concentración de antígeno o anticuerpo presente. Una marca es una molécula que reacciona como parte del ensayo, por lo tanto un cambio en la señal puede medirse en la muestra.

Para poder utilizar la reacción Ag-Ac en un inmunoensayo, siempre debe buscarse una forma de hacer evidente esa reacción (revelado). Los inmunoensayos son técnicas inmunológicas de cuantificación de antígeno o anticuerpo. Emplean marcadores de antígeno o de los anticuerpos, y los más utilizados son:

- Los radioinmunoanálisis son técnicas muy sensibles, ya que la emisión radiactiva se detecta con gran eficiencia, a pesar de que durante el recuento sólo se emite una pequeña fracción del isótopo radiactivo.
- Los enzimoanálisis son técnicas muy versátiles en muchos aspectos, aunque la detección de las enzimas, o mejor dicho, de sus productos, es muchas veces poco eficaz. Su particularidad radica en el empleo de enzimas como marcadores inmunoquímicos que permiten valorar las uniones Ag-Ac que se producen tras un periodo de incubación, con la adición posterior de un sustrato. En estos ensayos hay tres piezas constantes que hay que tener siempre en mente, y que originan distintos tipos de EIA en función de como se combinen; son el analito (antígeno ó anticuerpo), el conjugado (de antígeno ó de anticuerpo) y el sustrato.
- En los fluorinmunoanálisis, todas las moléculas fluorescentes marcadoras se excitan y además pueden hacerlo repetidamente, por lo que se produce una

amplificación. Por este motivo, estas técnicas son muy sensibles, si bien pueden haber interferencias por la fluorescencia propia del espécimen.

En los inmunoensayos, se marca el anticuerpo o antígeno con el fin de obtener una señal perceptible que corresponda a la concentración del analito.

5.2.1. Inmunoensayos homogéneos y heterogéneos

De acuerdo con la necesidad de separar las fracciones ligada y libre, los inmunoanálisis con reactivos marcados se clasifican en homogéneos y heterogéneos (**Figura 8**).

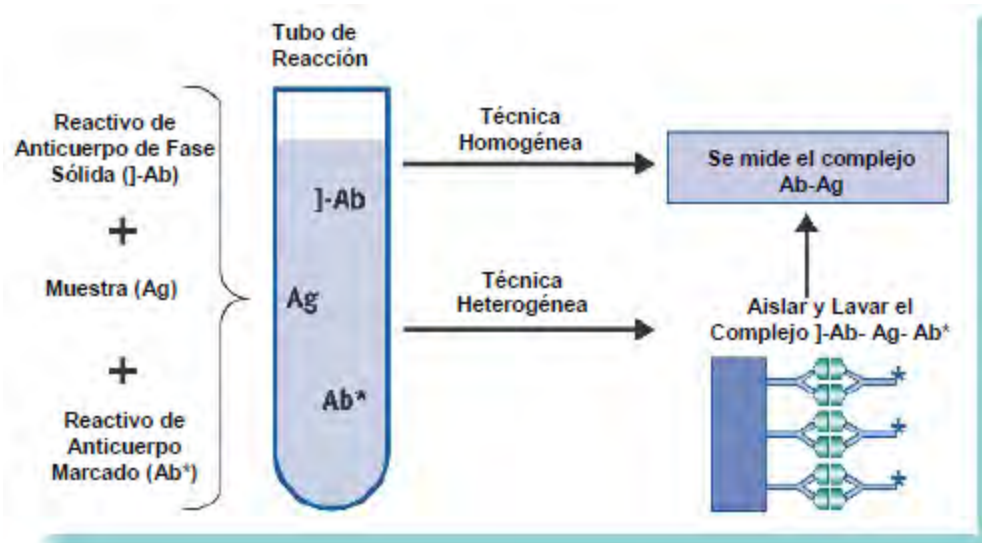


Figura 8. Inmunoensayos homogéneos y heterogéneos

5.2.1.1. Homogéneo

Los inmunoanálisis homogéneos son aquellos en los que el compuesto marcado se comporta de forma diferente según este o no unido a su contrapuesto inmunitario, por lo que no requiere la separación física de las sustancias reaccionantes en dos fracciones, la ligada y la libre. Los inmunoanálisis homogéneos ideales necesitan que la unión entre el antígeno y el anticuerpo afecte la modulación de la señal de marcaje al 100%. En la práctica, esto es difícil de conseguir y el resultado es que los análisis que no requieran la separación son generalmente menos sensibles que los inmunoanálisis con separación.

Las técnicas homogéneas generalmente se han aplicado a la medición de pequeños analitos como por ejemplo las drogas de abuso y terapéuticas. Debido a que las técnicas homogéneas no requieren la separación de la unión Ac-Ag* del Ag* libre, generalmente

son más fáciles y más rápidas de realizar. Por lo que se concluye que no se requiere la separación del antígeno unido del antígeno libre y de ahí que sea más rápido y más fácil de llevar a cabo que los inmunoensayos heterogéneos e implican solamente la mezcla de la muestra con los reactivos y la detección

5.2.1.2 Heterogéneo

Los inmunoanálisis heterogéneos son aquellos en los que el compuesto marcado se comporta de forma análoga, esté o no unido a su parte contraria en la reacción inmunológica, y por tanto exigen la separación de las fracciones ligada y libre.

Los principales métodos para separar estas fracciones son la adsorción, la precipitación, el uso de anticuerpos y los soportes sólidos.

- a) Adsorción: los primeros inmunoanálisis con reactivos marcados utilizaban la adsorción sobre materiales insolubles, como el carbón activado, el silicato magnésico y las resinas de intercambio iónico, a los que se une la fracción libre. La adsorción es dependiente del pH, temperatura y tiempo de contacto. La separación de ambas fases se produce por centrifugación, posteriormente, el material insoluble sedimenta en el fondo del tubo con la fase no ligada mientras que la fase ligada queda en el sobrenadante.
- b) Posteriormente, se emplearon las técnicas de precipitación, que utilizaban precipitantes que alteran la solubilidad de las proteínas, como las sales inorgánicas (sulfato de amonio NH_4SO_4 , sulfato de sodio Na_2SO_4) etanol, propilenglicol y el ácido perclórico, que precipitaban la fracción ligada. A elevadas concentraciones estos compuestos que son hidrofílicos atrapan las moléculas de agua de la solución, insolubilizando el complejo que precipita. La separación es sensible a variaciones en la molaridad de la sal y de los solventes. Tras la centrifugación, quedan los complejos ligados en el sedimento y la fracción libre en el sobrenadante.
- c) En la precipitación inmunológica se utiliza un segundo anticuerpo contra el anticuerpo del sistema. La unión del segundo anticuerpo al complejo Ag-Ac da lugar a un complejo de gran tamaño, generalmente insoluble y fácilmente precipitable. Tras incubación y centrifugación, la fase libre queda en el sobrenadante.

d) Soportes sólidos. Consiste en inmovilizar al anticuerpo a un soporte sólido, que puede ser la propia pared del tubo, bolitas de vidrio o un polímero. Éste método permite una simple separación entre las fases ligada y libre, ya que el anticuerpo es adsorbido o ligado químicamente a una matriz sólida insoluble, con lo que la separación de las fases ligada y libre no requiere centrifugación. Los sistemas más utilizados son los tubos de poliestireno revestidos de anticuerpo (tubos coated) y los anticuerpos adsorbidos a esferas o discos. Éste método tiende cada vez más a utilizarse por ser sencillo, práctico y requiere menos manipulación, e incluso permite su automatización.

5.2.2. Inmunoensayos con reactivos marcados

La medición del analito en un inmunoensayo se logra usando tanto un formato competitivo como uno no competitivo (**Figura 9**).

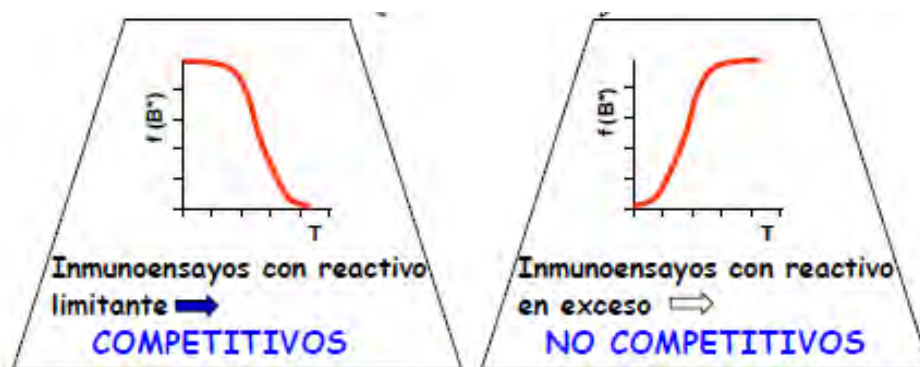
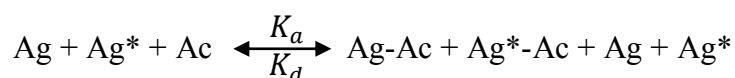


Figura 9. Diseño de inmunoensayos

5.2.2.1 Competitivo

El antígeno de la muestra y el antígeno marcado (Ag^*) se ponen en contacto con un anticuerpo específico en concentración limitante, compitiendo por los sitios de unión del anticuerpo (**Figura 10**). El antígeno sin marcar bloquea la capacidad del Ag^* de unirse puesto que ese punto de unión en el anticuerpo ya se encuentra ocupado. Cuanto más antígeno haya en la muestra, menos Ag^* se unirá al anticuerpo, por lo que la medida de la marca de la fracción ligada es inversamente proporcional a la concentración del analito.



Siendo Ag el analito, Ag* el antígeno marcado (cantidad constante), Ac, el anticuerpo específico en concentración limitante, K_a la constante de asociación y K_d la constante de disociación.

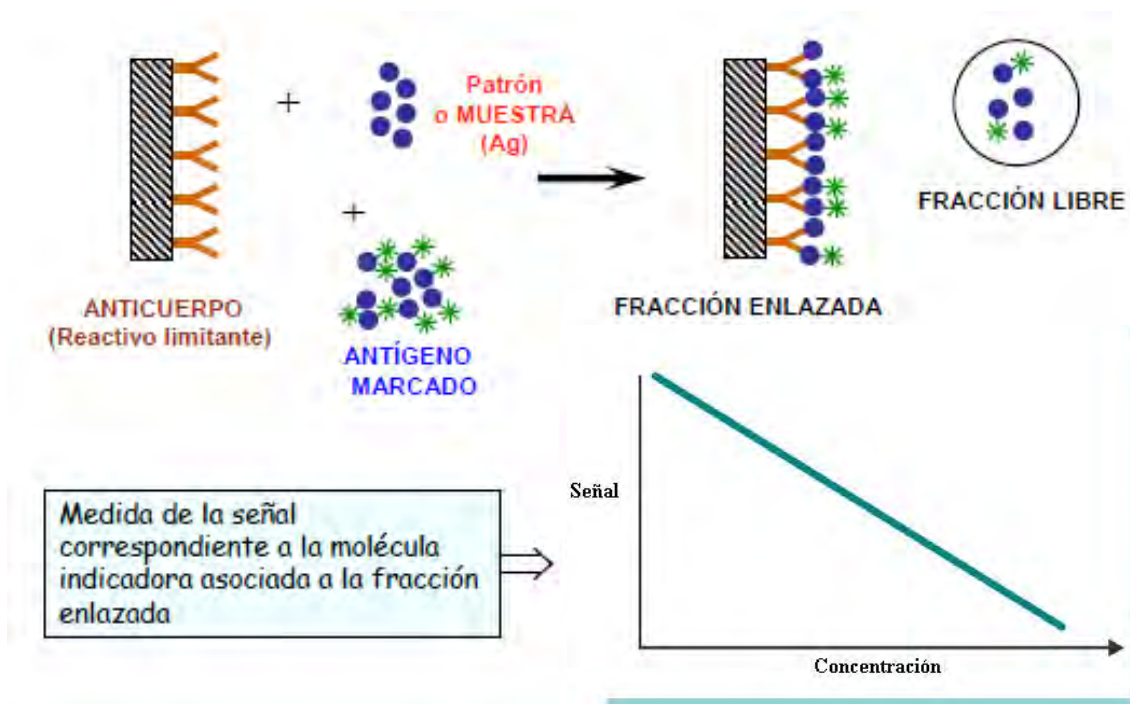
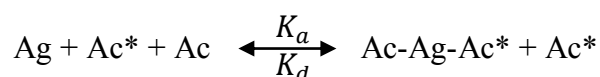


Figura 10. La concentración de antígeno está inversamente relacionada a la concentración de marca (señal) en formatos competitivos.

5.2.2.2. *No competitivo*

Los formatos de ensayo no competitivos generalmente proporcionan el nivel más alto de sensibilidad y especificidad del ensayo. Se marca el anticuerpo que, además se añade en exceso al medio de reacción.



El antígeno de la muestra reacciona con dos anticuerpos (doble reconocimiento y por lo tanto mayor sensibilidad). Uno de los anticuerpos generalmente está en un soporte sólido para facilitar la separación de la fracción ligada. Y el otro anticuerpo lleva la marca (**Figura 11**).

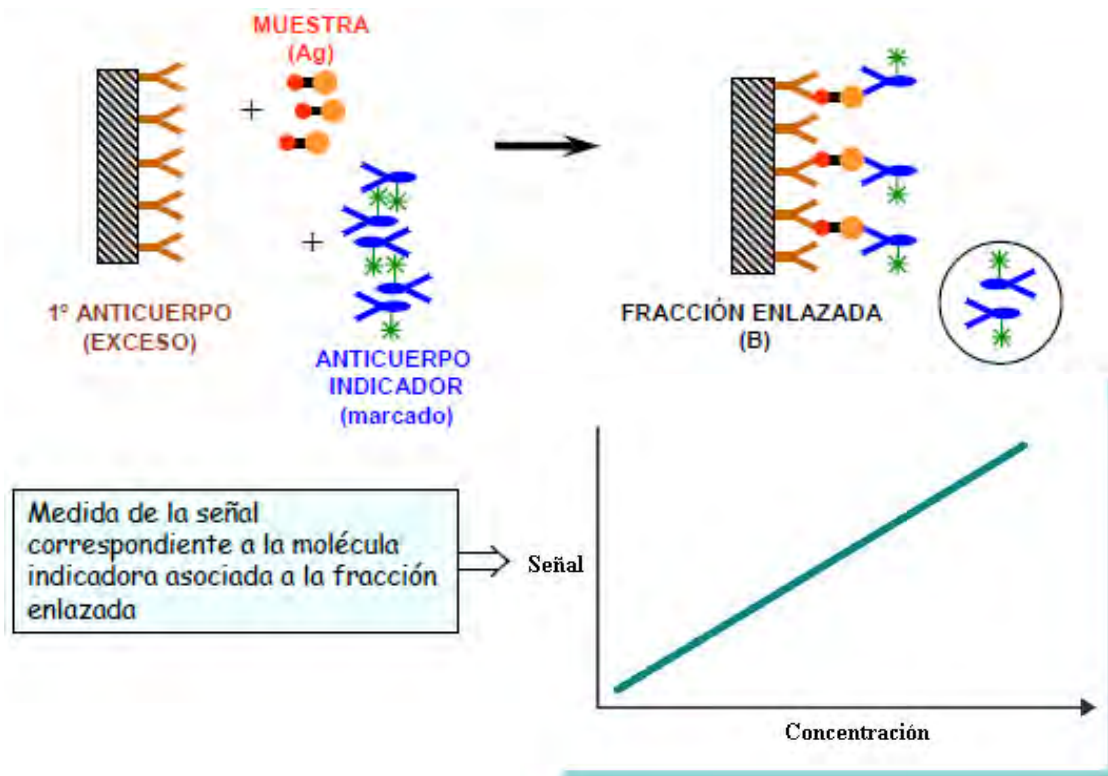


Figura 11. La concentración de antígeno es directamente proporcional a la concentración de marca (señal) en formatos no competitivos.

5.2.3. ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay).

La particularidad del análisis inmunoabsorbente con enzima ligada (ELISA) radica en el empleo de enzimas como marcadores inmunoquímicos que permiten valorar las uniones Ag-Ac que se producen tras un periodo de incubación, con la adición posterior de un sustrato. Se emplea para la detección/cuantificación de componentes que se encuentran a muy baja concentración en líquidos biológicos.

La sensibilidad de los EIA puede incrementarse mucho amplificando la actividad enzimática. En su forma más simple, el producto de la enzima marcadora es el sustrato de una segunda enzima que genera gran cantidad de producto. Así, el producto de la primera enzima actúa catalíticamente con la segunda enzima.

La técnica ELISA se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante un anticuerpo que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo es un colorante, el cual puede ser medido espectrofotométricamente (**Figura 12**).

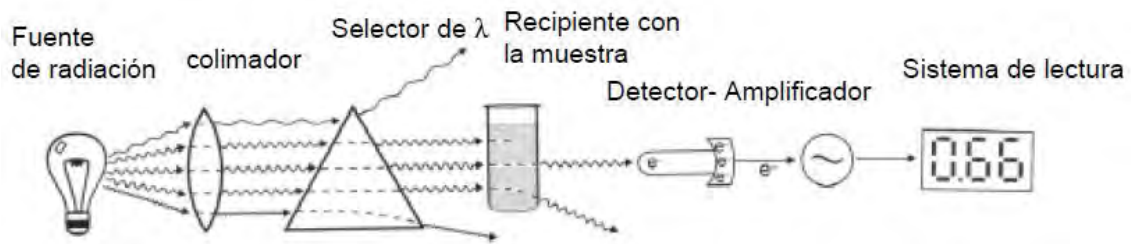


Figura 12. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

Éste principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal, como por ejemplo la capacidad de ser versátil, simple en su realización, emplea reactivos económicos y además consigue, mediante el uso de la fase sólida, una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre.

5.2.4.1. ELISA indirecto.

El sistema de detección emplea dos anticuerpos, uno primario contra el antígeno, y otro secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada anticuerpo primario. Los tipos de mercaje son diversos y variados, entre ellos se encuentra la biotina, las sondas fluorescentes como la fluoresceína o la rodamina y los conjugados con enzimas como la peroxidasa de rábano (HRP) o la fosfatasa alcalina (**Figura 13**).

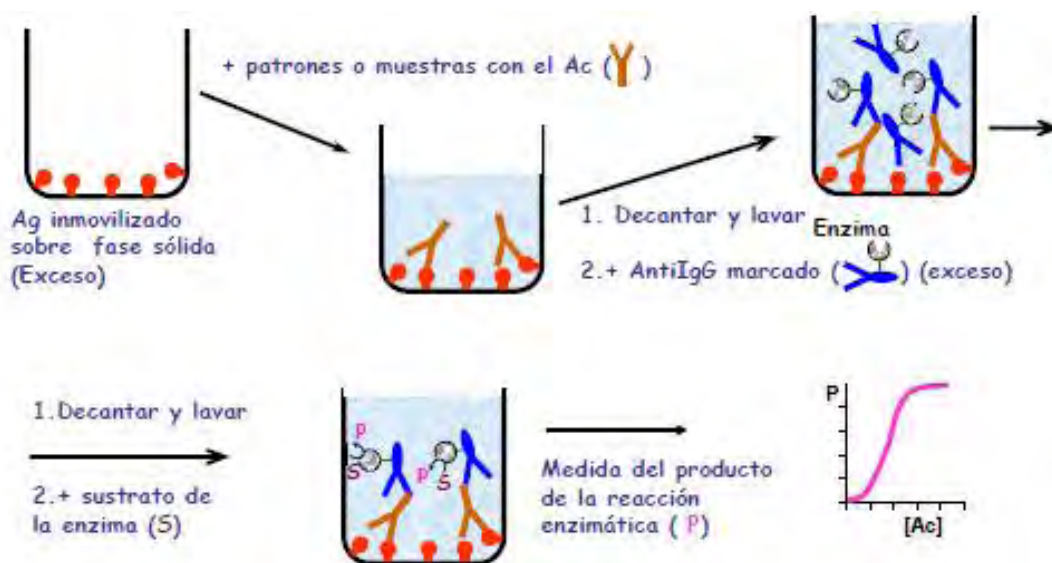


Figura 13. El ensayo ELISA indirecto emplea dos anticuerpos, uno de ellos marcado con la enzima el cual produce un doble reconocimiento y una mayor sensibilidad

5.3. Refractometría²¹⁶

Un rayo de luz que pasa oblicuamente desde un medio hacia otro de diferente densidad, cambia su dirección cuando traspasa la superficie. Éste cambio en la dirección se denomina *refracción*.

El ángulo formado entre el rayo en el primer medio y la perpendicular se llama *ángulo de incidencia*, i , mientras que el correspondiente ángulo en el segundo medio se denomina *ángulo de refracción*, r (**Figura 14**). La ley de Snell representa el índice de refracción, n , como la razón de los senos de los ángulos de incidencia y refracción

Se denomina refractometría, al método utilizado en el cálculo del [índice de refracción](#) de una muestra para, por ejemplo, conocer su composición o pureza. Los refractómetros son los instrumentos empleados para determinar este [índice de refracción](#).

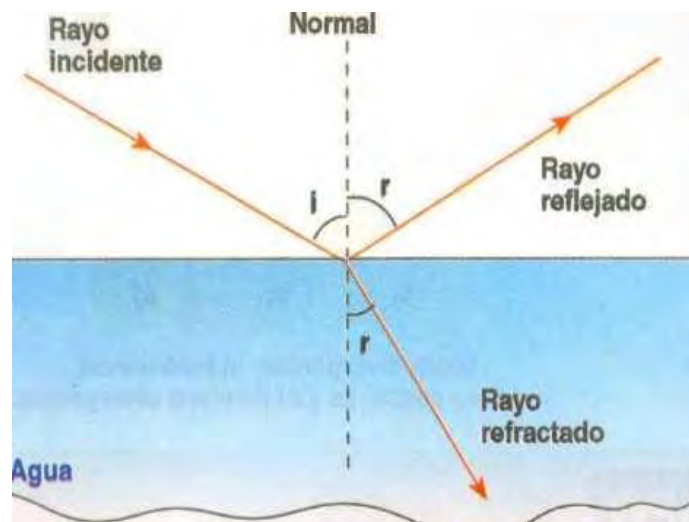


Figura 14. Índice de refracción de la luz

5.3.1. Refractómetros de ángulo límite

En estos aparatos se observa el campo del ocular dividido en una zona oscura y otra clara. La separación entre ambas corresponde al rayo límite. El rayo límite se puede visualizar en el esquema siguiente. La luz pasa a través de una capa delgada de muestra (0,1 mm) y entra en el prisma de difracción P_2 . El prisma P_1 es de difusión, de manera que muestra una superficie rugosa y actúa como fuente de un número infinito de rayos que entran en la muestra en todas direcciones. La radiación que únicamente roza la superficie del prisma P_2 penetra en él formando un ángulo ϕ_c llamado ángulo límite o crítico y su valor depende de la longitud de onda y de los índices de refracción de la

muestra y del prisma. Ningún rayo puede formar un ángulo superior al límite ya que la fuente de tales rayos no penetra en el prisma y todos los demás rayos que penetran en el prisma se refractan según ángulos menores (a la derecha), que el ángulo límite, e iluminarán la parte derecha del ocular. La zona de la izquierda permanece oscura ya que no se refractan rayos a ángulos superiores al límite. La medida de éste ángulo permite medir el índice de refracción de la muestra (Figura 15).

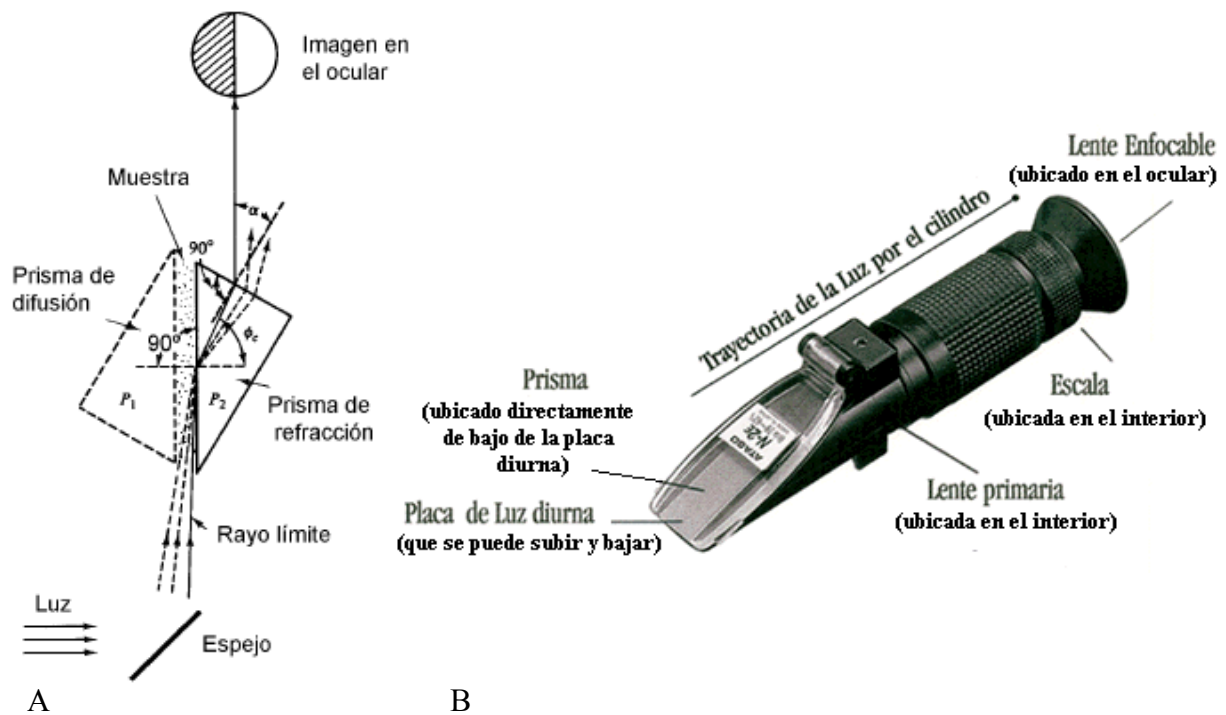


Figura 15. Esquema de un refractómetro de ángulo límite A (izquierda). Partes de un refractómetro de ángulo límite portátil B (derecha).

CAPITULO 6. PARTE EXPERIMENTAL

Éste trabajo cuenta con la aprobación del protocolo emitida por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química UNAM, así como el certificado de salud de los animales que fueron proporcionados por Harlan Laboratorios S. A de C. V. (ver apéndice A y B).

Para el desarrollo de esta investigación se usaron los siguientes equipos y métodos.

Equipo

- a) Espectrofotómetro U.V. visible (**Figura 16**).
- b) Refractómetro (**Figura 17**).
- c) Detector de centelleo sólido (**Figura 18**).

Método

- a) ELISA (heterogéneo tipo sándwich no competitivo).
- a) Refracción de la luz
- b) Espectrometría gamma.



Figura 16. Espectrofotómetro U. V. Lab System Multiskan M. S.



Figura 17. Refractómetro de mano portátil ATC modelo SNA-91340



Figura 18. Detector de centelleo sólido de NaI activado con Tl. Modelo Bicon LS6500 de 3x3 pulgadas conectado a una PC cargada con el programa Maestro para detección radiactiva.

6.1. Extracción del ácido fúlvico

El ácido fúlvico empleado se comercializa como suplemento alimenticio preparado por la compañía Mexicana Fitochem (**Figura 19**) con una solubilidad de 750 g/L. En términos generales se trata de una extracción que parte de un extracto vegetal con una metodología similar a la realizada por Justus Von Liebig en 1870 y que se describe brevemente en la **Figura 20**.



Figura 19. Suplemento alimenticio de ácido fúlvico

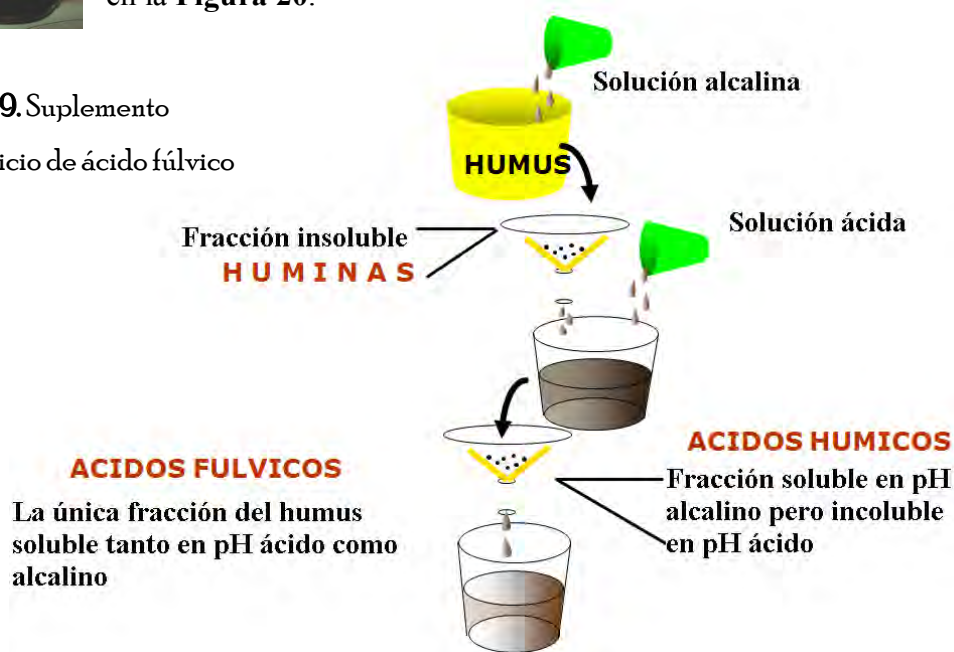


Figura 20. Extracción del ácido fúlvico

La **Figura 21** muestra una micrografía de transmisión electrónica de éste ácido comercialmente producida por Fitochem. La molécula en el eje central esta formada por grupos aromáticos (ácido salicílico, benzoico, benceno y fenoles), las estructuras laterales están constituidas por péptidos de 6 a 11 aminoácidos y la cabeza está formada por azúcares.

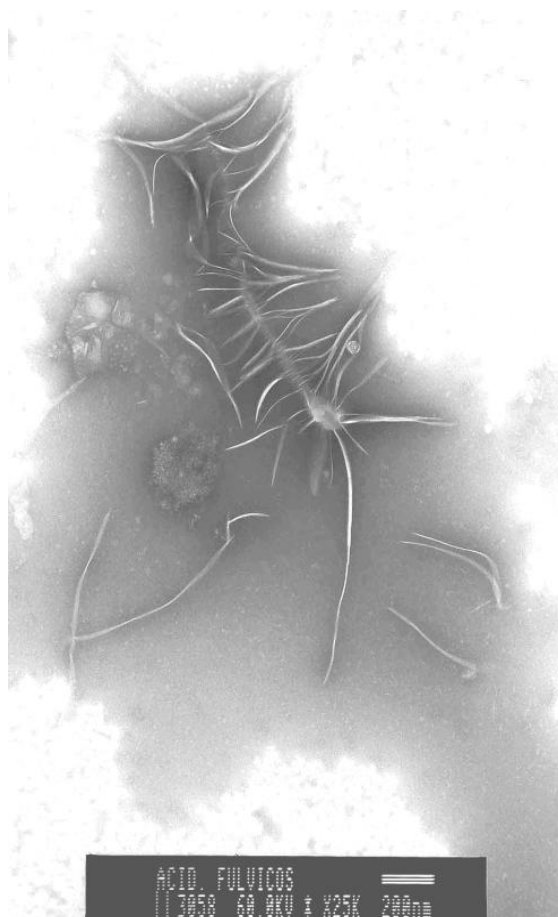


Figura 21. Micrografía de transmisión electrónica (200 000 veces) del ácido fúlvico tomada en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM²¹⁷

6.2. Determinación de iones I^- y Fe^{3+}

Inicio: 07/Septiembre/2009

Cepa: Ratones ICR

Termino: 05/Octubre/2009

Sexo: Machos

Densidad del ácido fúlvico: $1,276 \text{ g/cm}^3$

Edad: 5 Semanas

Dosis de ácido fúlvico: $5,1 \text{ mg/mL}$

Se formaron dos grupos de 5 elementos cada uno, las soluciones que bebió cada grupo se prepararon de la siguiente manera: 1g de $FeCl_3$ y 1 g de NaI fueron disueltos en 1L de agua desionizada junto con 0,5 mCi de ^{59}Fe y 2 mCi de ^{131}I , posteriormente se

hicieron dos tomas (de la solución de 1L) de 5 mL cada una, una de éstas se aforó a 500 mL (solución para el grupo 1), la otra también fue aforada a 500 mL pero además se le agregaron 2 mL de ácido fúlvico (solución para el grupo 2). Al finalizar el periodo de prueba, los animales fueron colocados en un recipiente cerrado con una placa que contenía 0,5 mL de Sulfloran para anestesiarnos y poder primero, desangrarlos y posteriormente obtener sus órganos (tiroides, hígado y riñones), los desechos (orina y heces) fueron recolectados durante este tiempo (**Figura 22**). Una vez obtenida la muestra de sangre de cada uno de los ratones, ésta fue mezclada por grupo, es decir, se mezclaron las cinco muestras de sangre de los elementos del grupo control, para obtener solo una, que representa a todo el grupo 1, se mezclaron las cinco muestras de sangre de los elementos del grupo de prueba, para obtener solo una que representa a todo el grupo 2 y así sucesivamente con cada una de las muestras de órganos (**Figura 23**). Posteriormente las 12 muestras (6 del grupo control y 6 del grupo de prueba) fueron colocadas en el detector de centelleo sólido (**Figura 18**) una por una para determinar las cuentas por segundo de los radionúclidos empleados, con un tiempo de conteo de 10 minutos.



Figura 22. Recolección de desechos (orina y heces) del grupo control (izquierda) y el grupo de prueba (derecha) durante el periodo de ensayo.



Figura 23. Muestras de los órganos (riñones, hígado y tiroides), desechos (heces y orina) y fluidos (sangre), del grupo de prueba (letras negras) y del grupo control (letras rojas)

6.3. Determinación de inmunoglobulina G de ratón (experimento 1)

Inicio: 14/Mayo/2010

Sexo: machos

Termino: 10/Junio/2010

Cepa: ICR.

Dosis de ácido fúlvico: 0,75mg/mL

Edad: 5 semanas

Se usaron 10 ratones y se formaron 2 grupos de 5 elementos, el grupo 1 que bebió una solución de ácido fúlvico y el grupo 2 asignado como el control (**Figura 24**). Al final del experimento se sacrificaron los ratones para tomar la muestra de sangre, las muestras de cada miembro del grupo se mezclaron en un tubo de ensayo, para así conseguir solo una muestra por grupo. Posteriormente se centrifugo a 3000 rpm por 10 min para obtener el suero. Debido a que son animales muy pequeños, no fue posible tomar una muestra inicial y final de sangre en los todos los ensayos en los que se cuantificó concentración de inmunoglobulina G. La concentración de éste anticuerpo en ratones se determinó por medio del ensayo ELISA (heterogéneo tipo sándwich no competitivo).



Figura 24. Grupo control y grupo de prueba con ácido fúlvico (dosis de 0,75 mg/mL) en ratones

Los reactivos empleados son los siguientes:

- 1- Placa de poliestireno recubierta con anti-IgG de ratón
- 2- Enzima (peroxidasa de rábano) conjugada con anti-IgG de ratón
- 3- IgG estándar
- 4- Solución de lavado (solución buffer al 0,05%)
- 5- Diluyente (solución buffer al 0,5%)
- 6- Sustrato enzimático cromogénico. Un vial que contiene tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno
- 7- Solución que detiene la reacción (HCl 1N)

El procedimiento del ensayo se describe brevemente

Preparación de:

- a) *Diluyente*: 5 mL aforado a 50 mL
- b) *Solución de lavado*: 50 mL aforado a 1 L
- c) *Muestra*: 2 μ L suero + 998 μ L diluyente = 1 mL, tomar 2 μ L del 1 mL anterior y agregar 798 μ L diluyente = 800 μ L = disolución de 200 000 veces. Ésta disolución se realiza con el fin de obtener valores dentro de la curva estándar.
- d) *Estándar*: IgG + 1mL diluyente = 2,721 μ g/mL
- e) 2,721 μ g/mL + 5,44 mL = 500 ng/mL

Ensayo

- 1- Una vez diluidas 200 000 veces cada una de las muestras, como se indica en el inciso c) del apartado anterior, tomar 100 μL de cada tubo numerado y colocarlos en los pocillos, en estos pocillos se encuentra inmovilizada la IgG de cabra anti-ratón que reaccionará con la IgG de ratón.
- 2- Dejar incubar en un agitador de 100 – 150 rpm por 45 min. Ya que la IgG de ratón tiene poca reactividad con la IgG de bovino, es necesaria la incubación por 45 minutos para garantizar la reacción de los 2 μL de suero de cada muestra.
- 3- Aspirar el contenido, lavar 5 veces con la solución de lavado cada pocillo y secar. Un mal lavado dará como resultado una mala precisión y falsas lecturas de absorbancia.
- 4- Anadir 100 μL de la enzima conjugada a cada pocillo e incubar en el agitador por 45 min. Ésta enzima se encuentra conjugada con un segundo anticuerpo IgG de cabra anti-ratón.
- 5- Aspirar, lavar y secar los pocillos
- 6- Una vez formado el inmunocomplejo, agregar el sustrato enzimático, que genera una reacción colorimétrica y se deja incubar en el agitador por 20 min.
- 7- Detener la reacción con 100 μL de HCl 1N que inhibe la reacción enzimática.
- 8- Leer la densidad óptica a 450 nm en un espectrofotómetro U. V. visible.
- 9- Elaborar una curva estándar

6.4. Determinación de inmunoglobulina G de ratón (experimento 2)

Inicio: 26/Agosto/2010

Sexo: machos

Termino: 26/Octubre/2010

Cepa: ICR.

Dosis de ácido fúlvico: 15mg/mL

Edad: 5 semanas

Se emplearon 20 ratones de los cuales se formaron dos grupos, el primero bebió una solución de ácido fúlvico y el segundo fue el control. El periodo de ensayo fue de 2 meses. Al final del experimento los animales fueron anestesiados con 0,5 mL de Sulfloran y sacrificados posteriormente por decapitación y tomar la muestra de sangre que fue centrifugada a 3000 rpm por 10 min para obtener el suero.

6.5. Determinación de inmunoglobulina G de ratón (experimento 3)

Inicio: 21/Noviembre/2010

Sexo: machos

Termino: 15/Enero/2011

Cepa: ICR.

Dosis de ácido fúlvico: 6,75mg/mL

Edad: 7 semanas

Se usaron 16 ratones machos de 7 semanas, cepa ICR. Se formaron 2 grupos de 8, grupo 1 (control) y grupo 2 solución de ácido fúlvico más minerales (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} y K^+), para ver que efectos puede tener la combinación de estos minerales y el ácido con la concentración de anticuerpos. La concentración de los minerales utilizados se muestra en la **Tabla 7**. Al inicio del ensayo, todos los ratones fueron inmunizados con 0,2 mL de una vacuna triple bacteriana. El periodo de ensayo fue de aproximadamente 2 meses y al final de éste, se tomó la masa final de los ratones y posteriormente fueron anestesiados con 0,5 mL de Sulfloran para ser sacrificados por decapitación y tomar la muestra de sangre que fue centrifugada a 3000 rpm por 10 min.

Tabla 7. Concentración de minerales en 2000 mL

| Sal | Mineral | Masa de la sal (g) | Concentración (mM) |
|---|------------------|--------------------|--------------------|
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | Fe^{2+} | 0,5 | 0,89 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | Mg^{2+} | 0,5 | 1,01 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | Ca^{2+} | 0,5 | 1,7 |
| K_2HPO_4 | K^+ | 0,5 | 2,8 |

6.6. Determinación de inmunoglobulina G de ratón (experimento 4)

Inicio: 15/Febrero/2011

Sexo: machos

Termino: 11/Abril/2011

Cepa: ICR.

Dosis de ácido fúlvico: 6,75mg/mL

Edad: 5 semanas

Se usaron 27 ratones machos de 5 semanas, cepa ICR. Se formaron 3 grupos de 9, grupo 1 (control), grupo 2 (solución de ácido fúlvico), grupo 3 (solución de ácido fúlvico más minerales), la concentración de los minerales empleados se muestra en la **Tabla 8**. En ésta ocasión, además de los minerales utilizados en el tercer ensayo, se agregaron otros como Mn^{2+} , I^- y Se^{6+} , éste último, se añadió ya que interviene en diversos procesos biológicos incluyendo mecanismos inmunitarios. El periodo de ensayo fue de 2 meses. Durante este tiempo se tomó la masa inicial y final de las ratones, posteriormente fueron sacrificados para tomar la muestra de sangre que fue centrifugada a 3000 rpm por 10 min.

Tabla 8. Concentración de minerales en 2700 mL

| Sal | Mineral | Masa de la sal (g) | Concentración (mM) |
|---------------------------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| FeSO ₄ * 7H ₂ O | Fe ²⁺ | 0,5 | 0,66 |
| MgSO ₄ * 7H ₂ O | Mg ²⁺ | 0,5 | 0,75 |
| CaCl ₂ * 2H ₂ O | Ca ²⁺ | 0,5 | 1,25 |
| K ₂ HPO ₄ | K ⁺ | 0,5 | 2,1 |
| MnCl ₂ * 4H ₂ O | Mn ²⁺ | 0,0022 | 0,004 |
| Na ₂ SeO ₄ | Se ⁶⁺ | 0,0025 | 0,005 |
| KI | I ⁻ | 0,5 | 1,1 |

6.7. Determinación de inmunoglobulinas totales (ratas)

Inicio: 9/Marzo/2011

Sexo: machos

Termino: 17/Mayo/2011

Cepa: Sprague Dawley

Dosis de ácido fúlvico: 10,2mg/mL

Masa: 300 g

Se emplearon 20 ratas macho de 300 g de la cepa Sprague Dawley, se formaron 2 grupos de 10, grupo 1 (control), grupo 2 (solución de ácido fúlvico), **Figura 25**. Durante los dos meses del experimento se tomó la masa inicial y final de las ratas así como una muestra inicial y final de sangre (que fue tomada por vía ocular, anestesiados previamente con Sulfloran) la cual se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y posteriormente se cuantificaron las inmunoglobulinas totales del suero en el refractómetro.



Figura 25. Grupo control (izquierda) y grupo de prueba con ácido fúlvico (derecha)

La prueba refractométrica para la cuantificación de inmunoglobulinas totales se realizó tomando una muestra de 3 gotas del suero sanguíneo colocadas en la placa de luz diurna para medir su refracción, se lavó la placa con agua destilada y se colocó la siguiente muestra, así sucesivamente con cada una.

CAPITULO 7. RESULTADOS

7.1. Determinación de iones I^- y Fe^{+3}

Las **Tablas 9 y 10** muestran las cuentas por segundo (cps) de las seis muestras obtenidas de cada uno de los grupos 1 y 2 respectivamente, en la cual se puede observar que el número de cps de las muestras del grupo 2 (solución con ácido fúlvico) incrementaron con respecto a las muestras del grupo 1 (control). En la **Tabla 11** se da la relación de las cps/(masa ó volumen) de las muestras del grupo 2 con respecto a las del grupo 1. El aumento de estos iones en algunos órganos incluso llegó a ser más del doble con ácido fúlvico como se muestra en la **Figura 26** (incremento en la absorción de ^{131}I) y **Figura 27** (incremento en la absorción de ^{59}Fe)

Tabla 9. Cuentas por segundo y cuentas por segundo/(masa ó volumen) para el ^{59}Fe y ^{131}I de las muestras tratadas sin ácido fúlvico (grupo 1).

| Muestra | Masa ó volumen de la muestra | Hierro ^{59}Fe | Yodo ^{131}I |
|----------|------------------------------|------------------|----------------|
| | | cps | cps |
| Hígado | 8,9 g | 5500 ± 195 | |
| Riñones | 2,5 g | 979 ± 93 | |
| Tiroides | 4,5 mg | | 1250 ± 183 |
| Sangre | 4 mL | 9664 ± 230 | 1314 ± 325 |
| Orina | 10 mL | | 296139 ± 1034 |
| Heces | 4,4 g | 39719 ± 441 | 27483 ± 636 |

Los espectros obtenidos para cada una de las muestras de ambos grupos, se ilustran en las **Figuras 28** (hígado), **29** (heces), **30** (orina), **31** (riñones), **32** (sangre) y **33** (tiroides).

Tabla 10. Cuentas por segundo y cuentas por segundo/(masa ó volumen) para el ^{59}Fe y ^{131}I de las muestras tratadas con ácido fúlvico (grupo 2).

| Muestra | Masa ó volumen de la muestra | Hierro ^{59}Fe | Yodo ^{131}I |
|----------|------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | | cps | cps |
| Hígado | 9,3 g | 8444 ± 226 | |
| Riñones | 2,8 g | 1571 ± 117 | |
| Tiroides | 5,3 mg | | 3531 ± 186 |
| Sangre | 3,2 mL | 17435 ± 284 | 1620 ± 397 |
| Orina | 10 mL | | 289313 ± 1176 |
| Heces | 4,6 g | 63365 ± 566 | 33257 ± 798 |

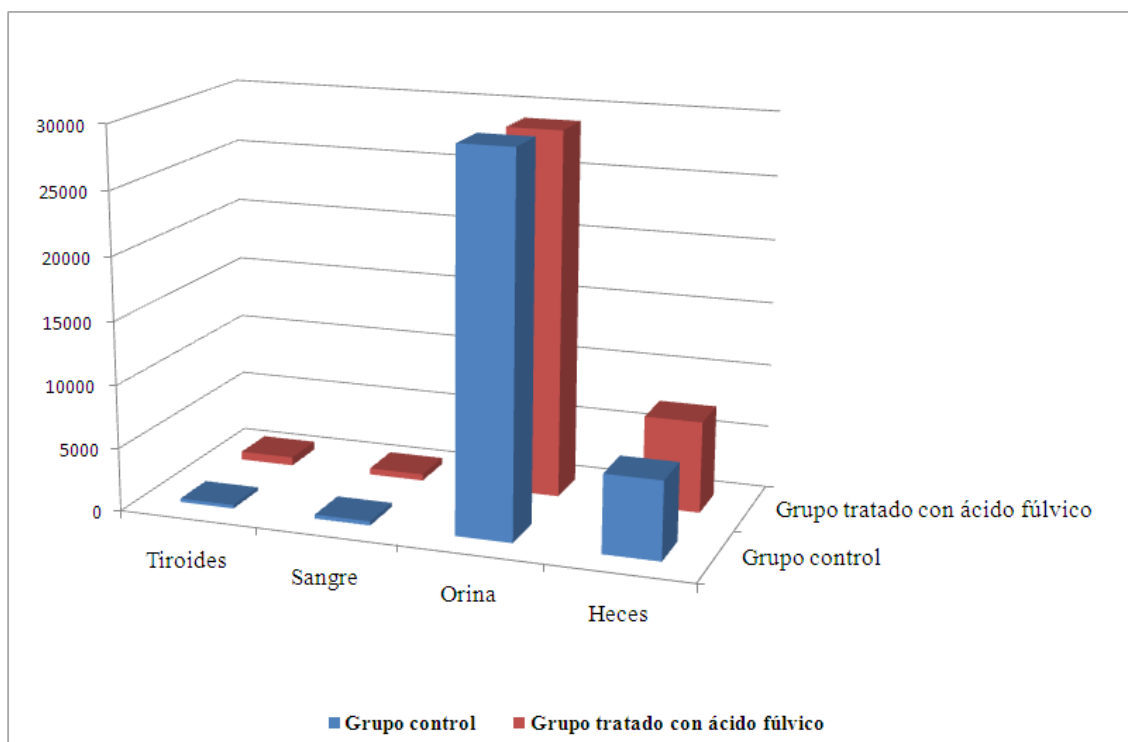


Figura 26. Gráfica de barras para el incremento en la absorción de ^{131}I en los diferentes órganos y fluidos

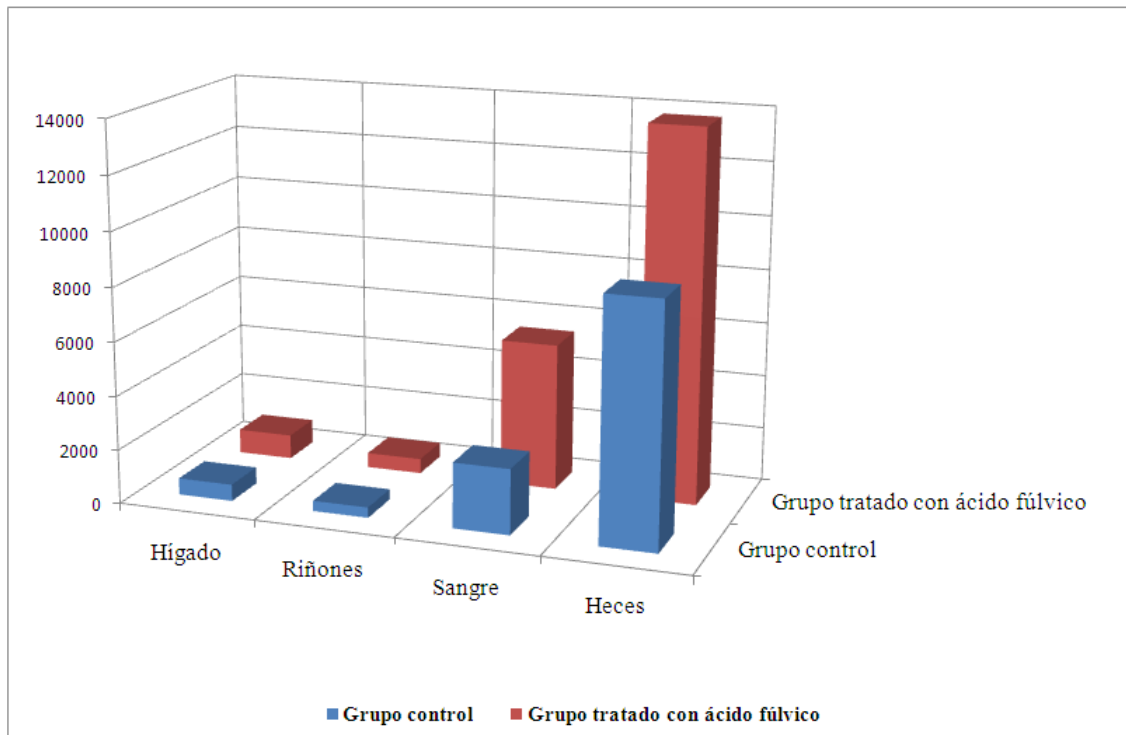


Figura 27. Gráfica de barras para el incremento en la absorción de ^{59}Fe en los diferentes órganos y fluidos

Tabla 11. Incremento en la absorción de I^- y Fe^{3+} con suplemento de ácido fúlvico.

| Muestra | Hierro | | Yodo | |
|----------|----------------------|-----------------|----------------------|-----------------|
| | Factor de incremento | % de incremento | Factor de incremento | % de incremento |
| Sangre | 2,25 | 125 | 1,54 | 54 |
| Orina | 0 | 0 ^a | 0,98 | -2 ^b |
| Heces | 1,55 | 55 | 1,17 | 17 |
| Hígado | 1,46 | 46 | 0 | 0 ^c |
| Riñones | 1,43 | 43 | 0 | 0 ^c |
| Tiroides | 0 | 0 ^c | 2,4 | 140 |

^a No se detectaron cuentas por segundo en la muestra no tratada con ácido fúlvico. Pequeño pico en la muestra con ácido fúlvico. La variación estadística es del 15%

^b Cuentas con un 2% más en la muestra sin ácido fúlvico, probablemente debido a la variación estadística.

^c No hay cuentas en las muestras con y sin ácido fúlvico.

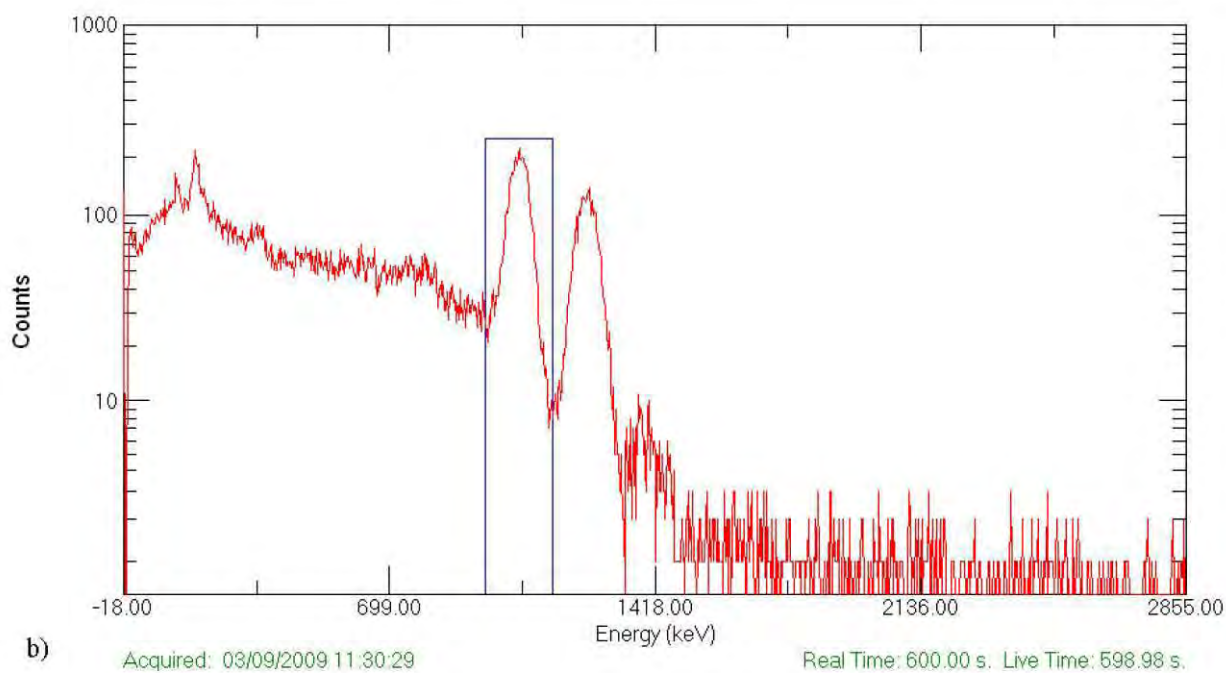
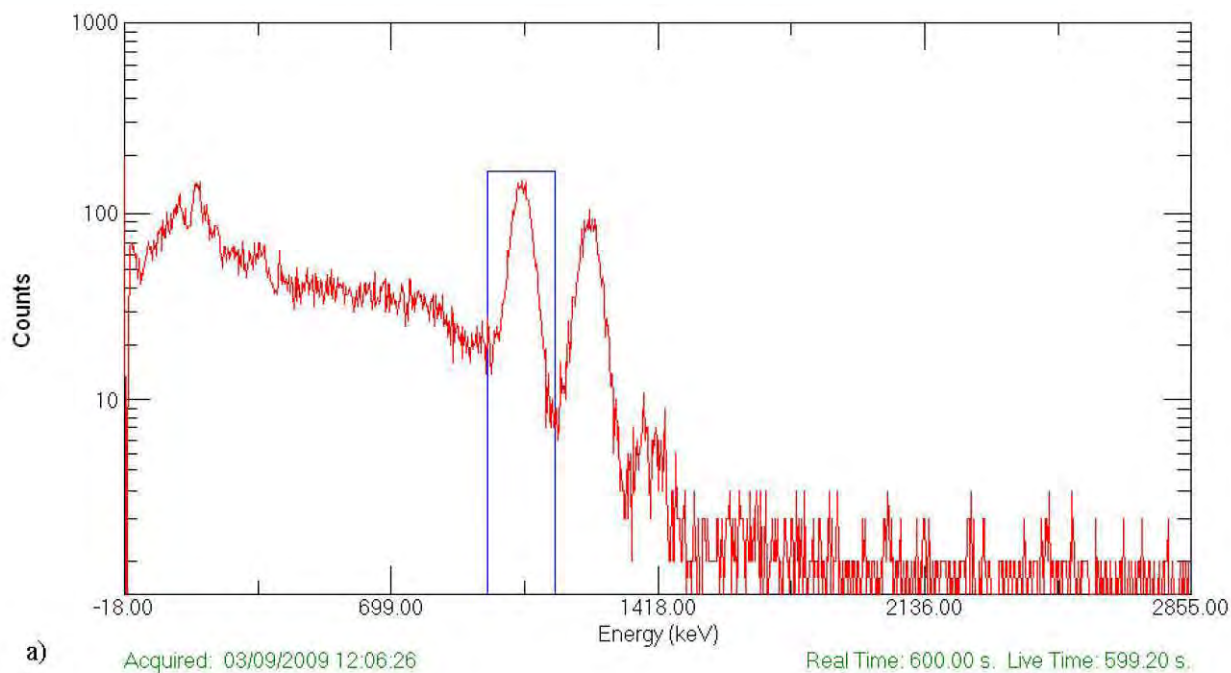


Figura 28. Espectros del ^{59}Fe con un pico de energía gamma de 1099 keV, obtenidos en las muestras de hígado. Grupo control a) y grupo tratado con ácido fúlvico b)

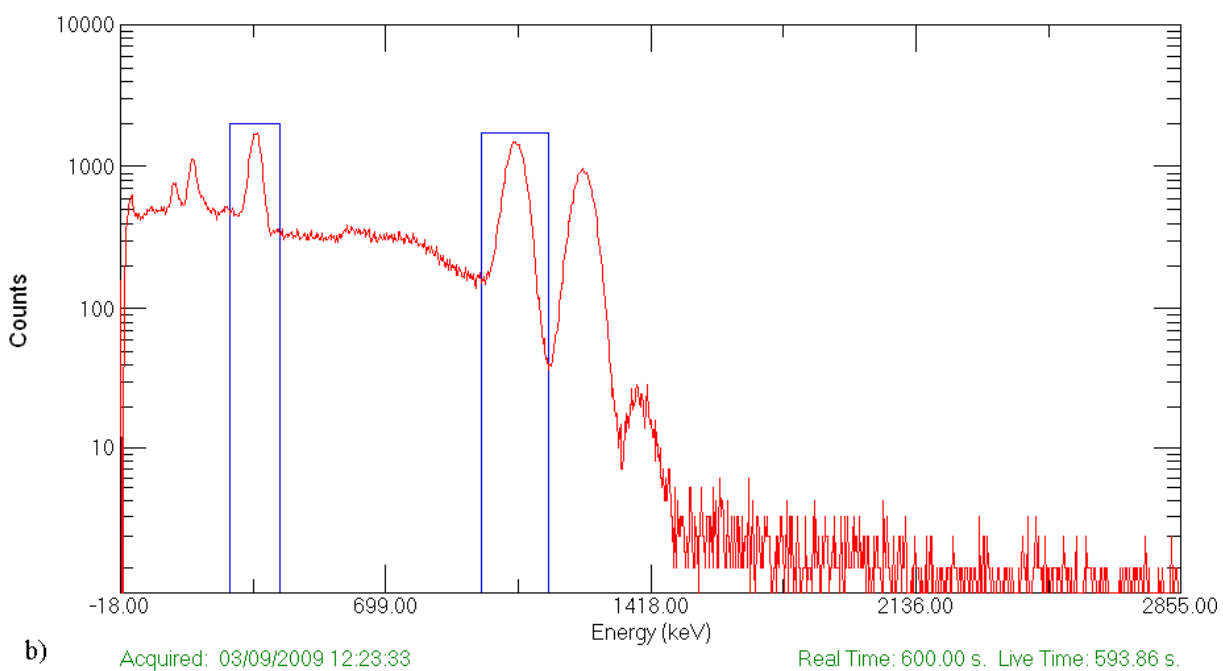
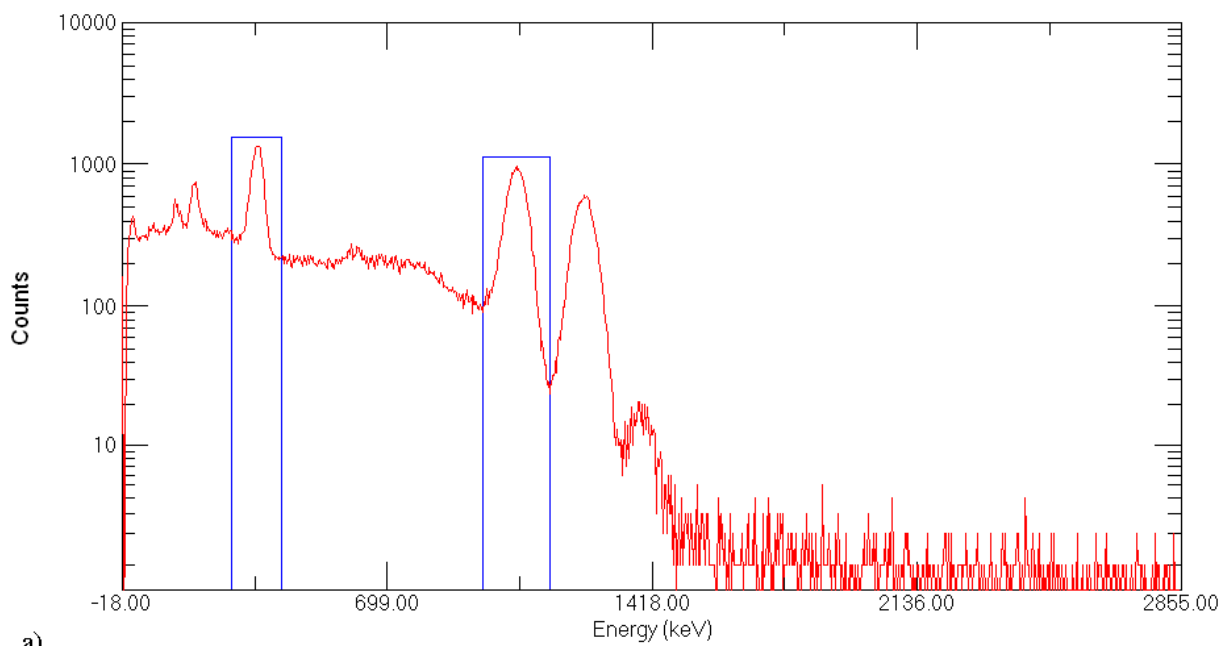


Figura 29. Espectros del ^{59}Fe y ^{131}I con picos de energía gamma de 1099 y 364,5 keV respectivamente, obtenidos en las muestras de heces. Grupo control a) y grupo tratado con ácido fúlvico b)

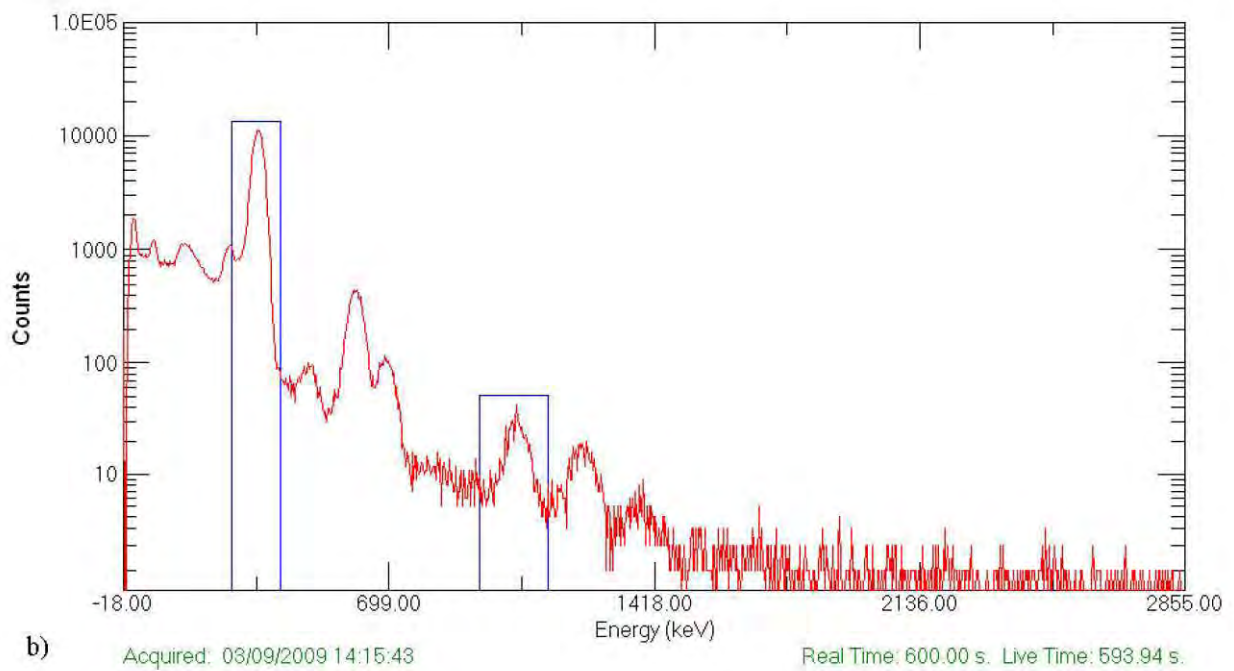
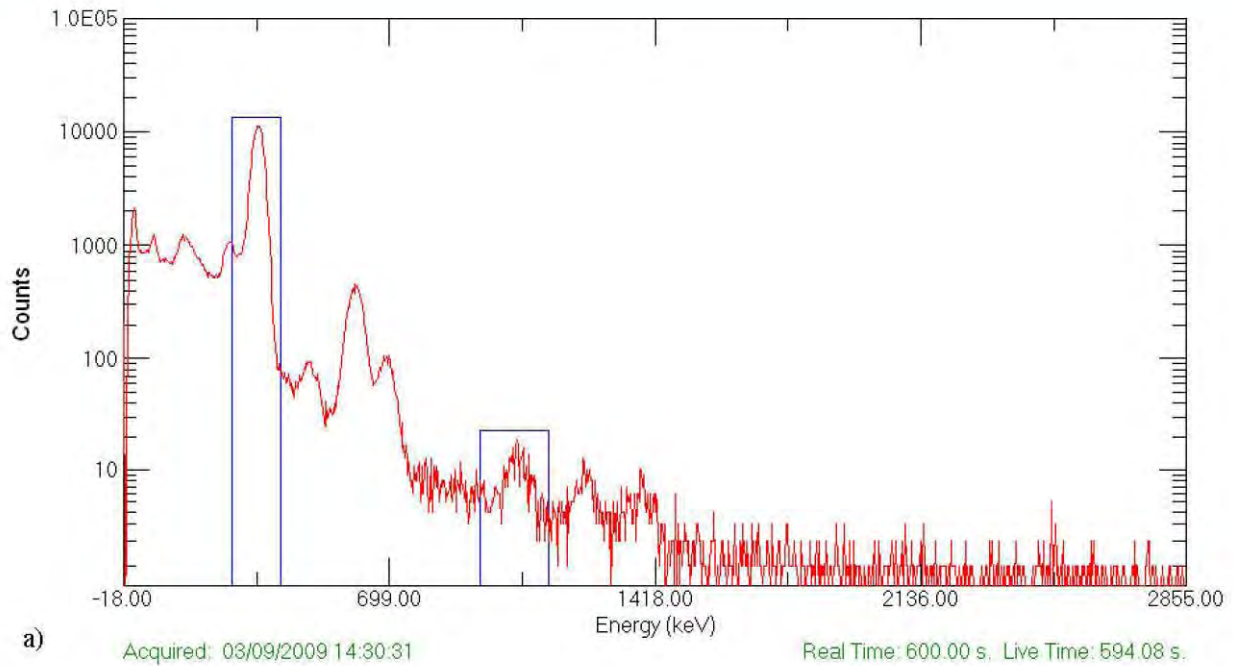


Figura 30. Espectros del ^{59}Fe y ^{131}I con picos de energía gamma de 1099 y 364,5 keV respectivamente, obtenidos en las muestras de orina. Grupo control a) y grupo tratado con ácido fúlvico b)

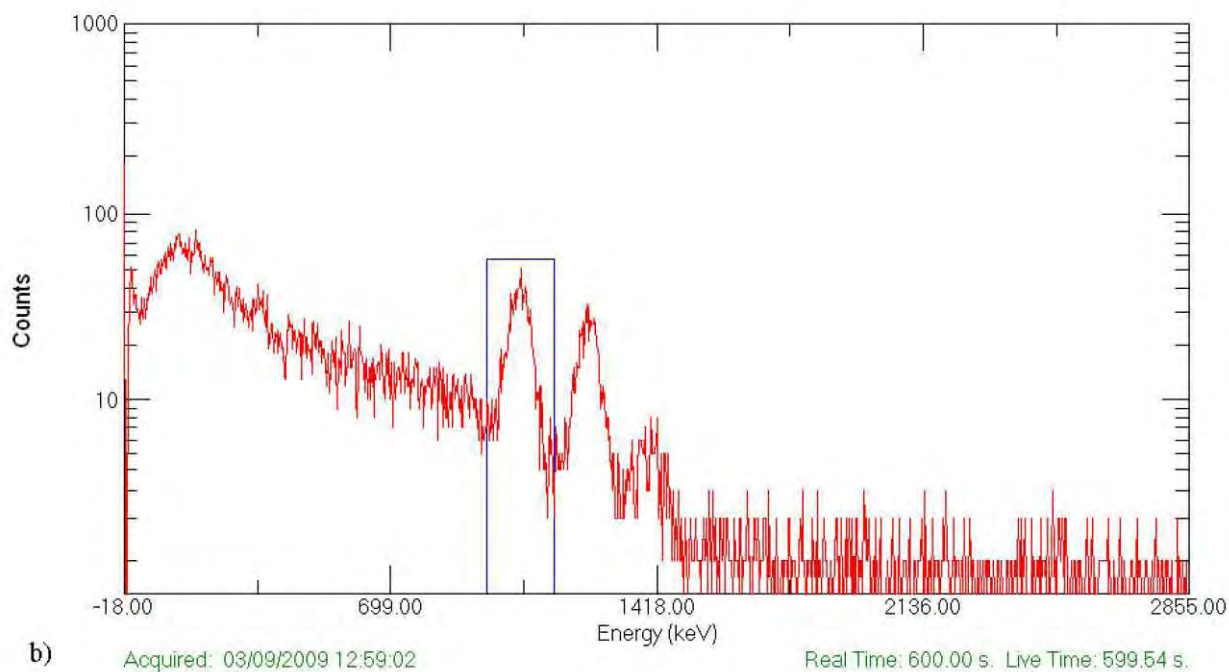
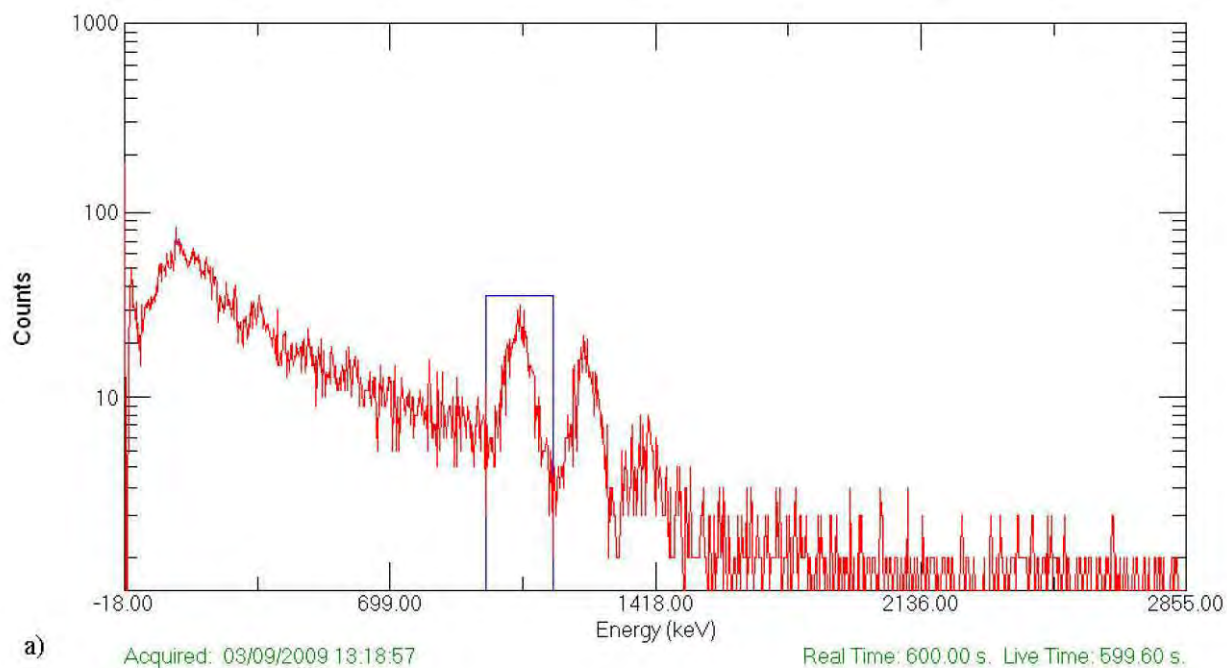


Figura 31. Espectros del ^{59}Fe con un pico de energía gamma de 1099 keV, obtenidos en las muestras de riñones. Grupo control a) y grupo tratado con ácido fúlvico b)

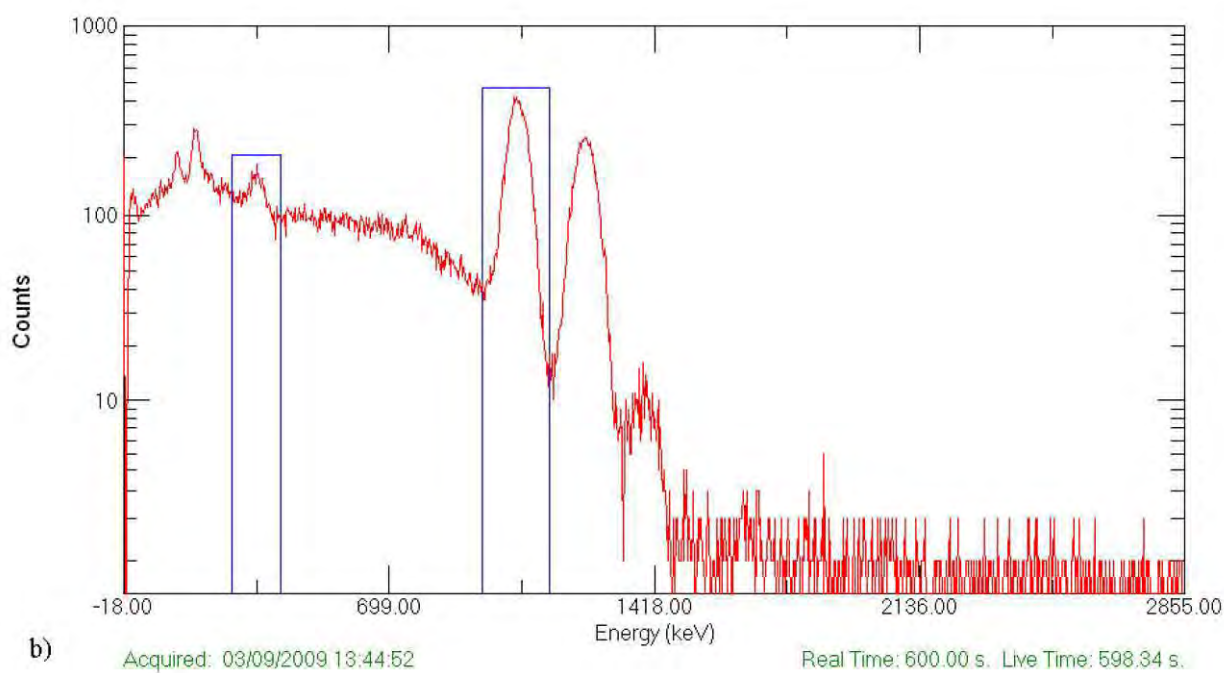
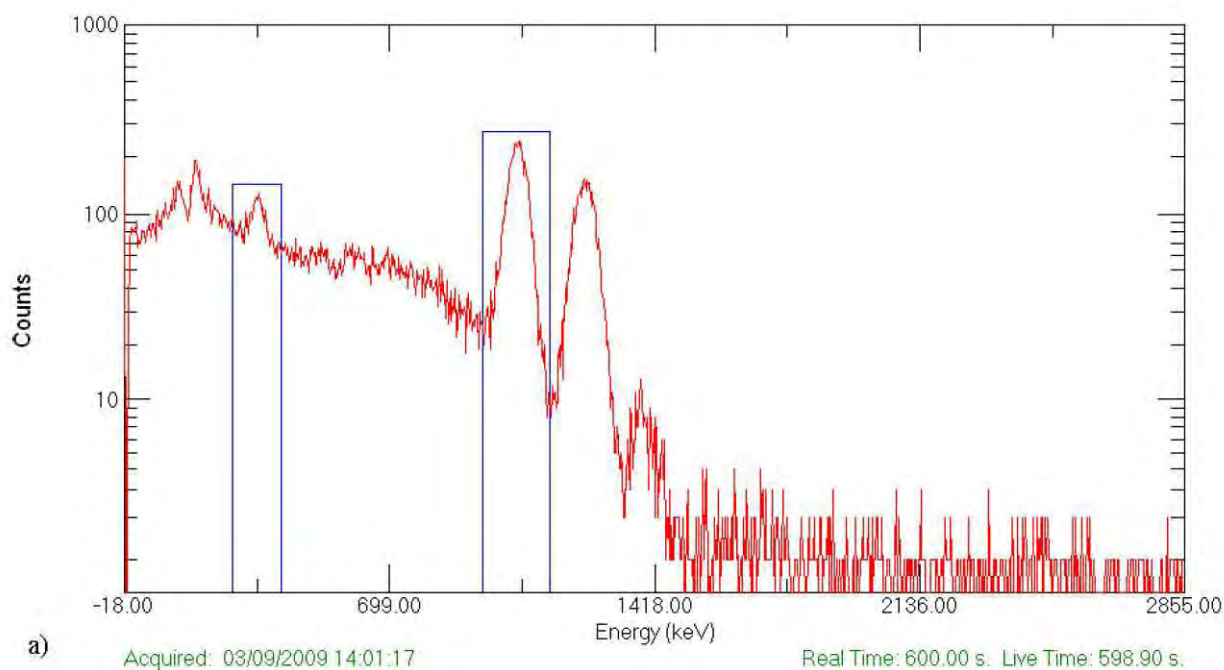


Figura 32. Espectros del ^{59}Fe y ^{131}I con picos de energía gamma de 1099 y 364,5 keV respectivamente, obtenidos en las muestras de sangre. Grupo control a) y grupo tratado con ácido fúlvico b)

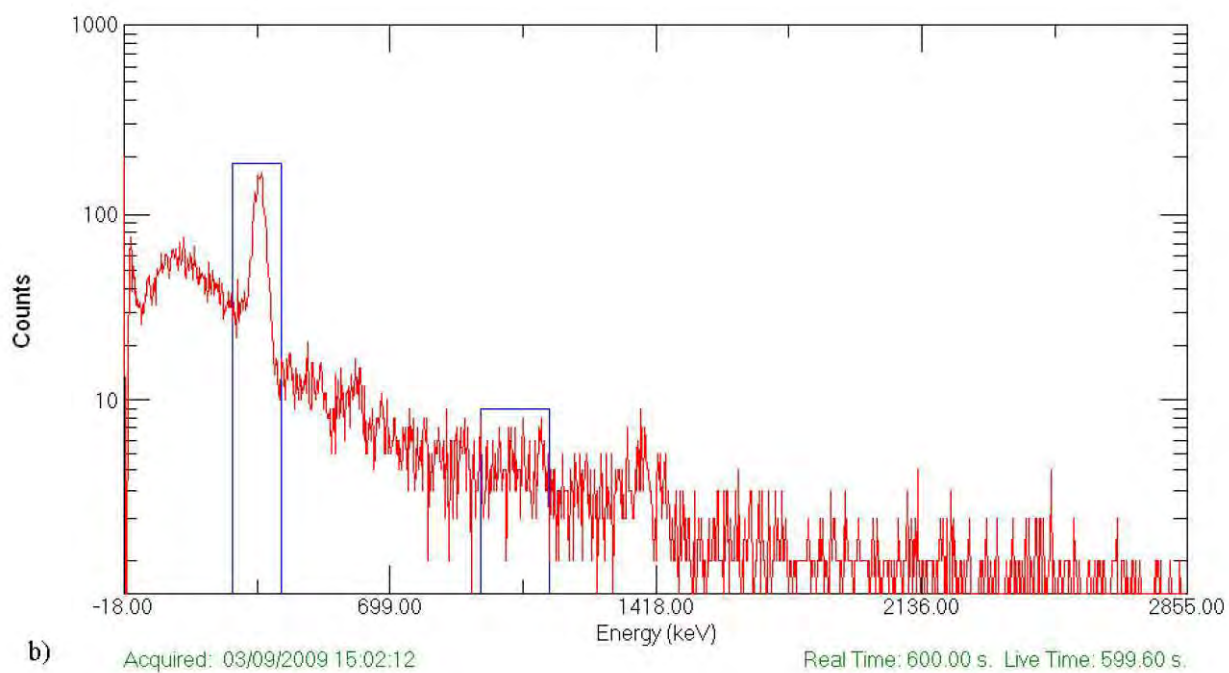
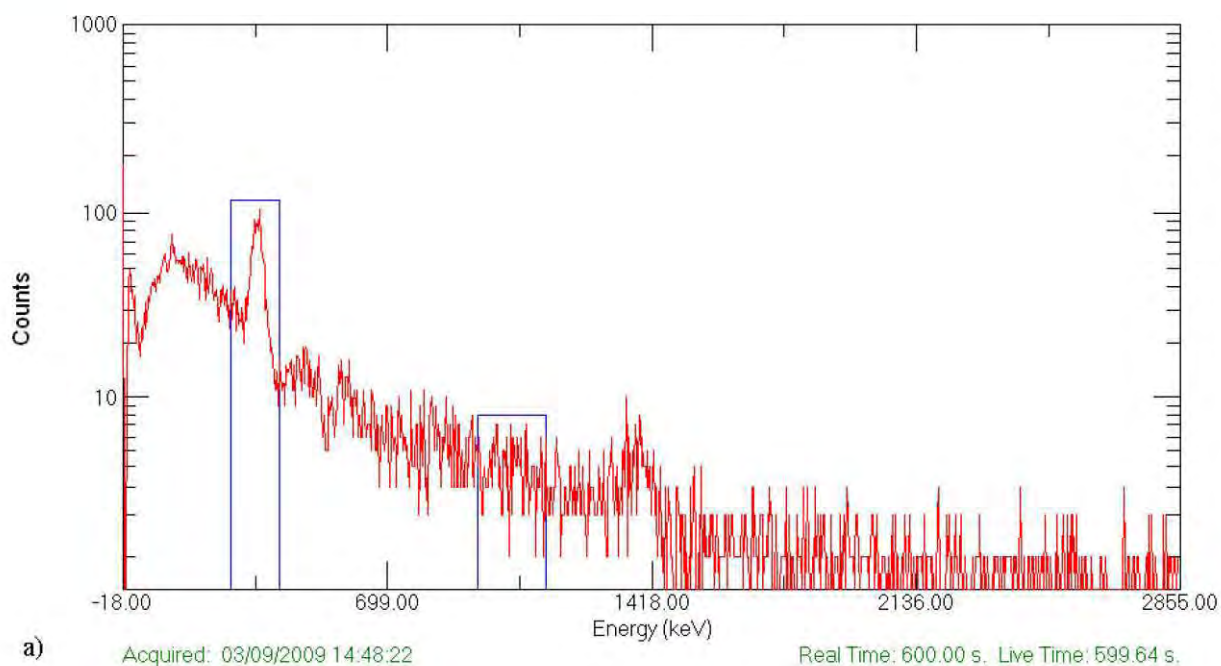


Figura 33. Espectros del ^{131}I con un pico de energía gamma de 364,5 keV, obtenidos en las muestras de tiroides. Grupo control a) y grupo tratado con ácido fúlvico b)

7.2 Concentración de inmunoglobulina G (IgG) e inmunoglobulinas totales de ratón (experimento 1).

La **Figura 34** ilustra la curva estándar de inmunoglobulina G obtenida mientras que en la **Tabla 12** se muestran los resultados de la concentración de inmunoglobulina G e inmunoglobulinas totales para el grupo 1 (tratamiento con ácido fúlvico) y el grupo 2 (control).

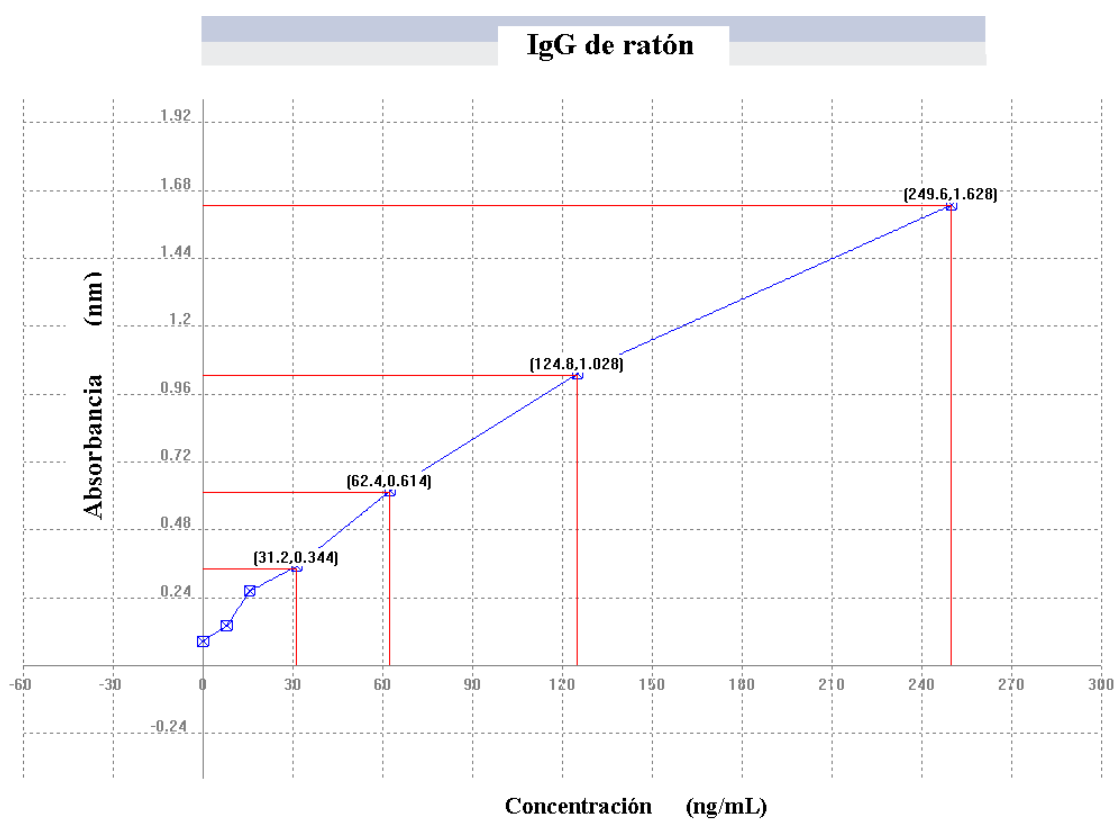


Figura 34. Curva estándar de inmunoglobulina G de ratón

Tabla 12. Concentración de inmunoglobulina G e inmunoglobulinas totales para los grupos 1 (ácido fúlvico) y 2 (control). Dosis de ácido fúlvico 0,75 mg/mL

| Muestra | Aborbancia (450 nm) | IgG (mg/mL) | Ig totales (mg/mL) |
|---------------|---------------------|-------------|--------------------|
| 1 (con ácido) | 0,72 | 15,5 | 52 |
| 2 (sin ácido) | 0,70 | 14,8 | 52 |

7.3 Concentración de inmunoglobulina G (IgG) e inmunoglobulinas totales de ratón (experimento 2)

La **Tabla 13** muestra los resultados de la concentración promedio de IgG e Ig totales en los grupos 1 (tratamiento con ácido fúlvico) y grupo 2 (control) mientras que en la **Tabla 14** se presentan los resultados de la masa de los ratones medida al final del periodo de ensayo. En las **Figuras 35, 36 y 37** se ilustran los histogramas de la distribución de frecuencias para la concentración de IgG, inmunoglobulinas totales y la masa final de los ratones respectivamente.

Tabla 13. Concentración de inmunoglobulina G e inmunoglobulinas totales para los grupos 1 (prueba) y 2 (control). Dosis de ácido fúlvico 15 mg/mL

| | IgG Grupo 1 | | IgG Grupo 2 | | Ig Totales | |
|------------|------------------------|------------------|------------------------|----------------|-----------------|-------------------|
| | Absorbancia | IgG | Absorbancia | IgG | Grupo 1 | Grupo 2 |
| Muestra | (450 nm) nanómetros | (mg/mL) | (450 nm) nanómetros | (mg/mL) | (mg/mL) | (mg/mL) |
| 1 | 0,467 | 8,3 | 0,219 | 2,8 | 62 | 58 |
| 2 | 0,746 | 16,3 | 0,165 | 1,8 | 60 | 54 |
| 3 | 0,664 | 13,7 | 0,635 | 12,9 | 70 | 52 |
| 4 | 0,193 | 2,3 | 0,228 | 2,9 | 74 | 64 |
| 5 | 0,327 | 4,9 | 0,344 | 5,3 | 60 | 70 |
| 6 | 0,335 | 5,1 | 0,174 | 2,1 | 72 | 70 |
| 7 | 0,340 | 5,3 | 0,455 | 7,9 | 76 | 68 |
| 8 | 0,276 | 3,9 | 0,377 | 6,1 | 70 | 70 |
| 9 | | | 0,898 | 21,2 | | 72 |
| 10 | | | 0,414 | 6,9 | | 60 |
| MA* | | 7,5 ± 4,2 | | 7 ± 4,3 | 68 ± 5,4 | 63,8 ± 5,2 |
| DE* | | 4,98 | | 6,04 | 6,41 | 7,33 |

*MA, media aritmética

*DE, desviación estándar

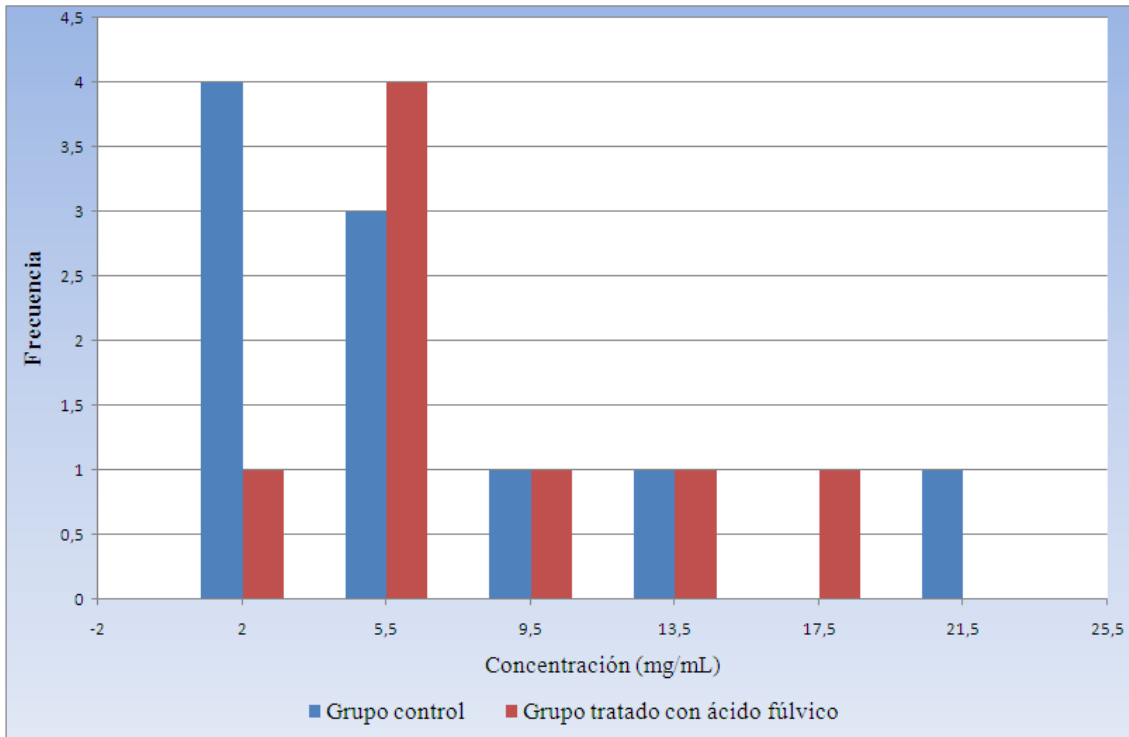


Figura 35. Histograma para la concentración de inmunoglobulina G en ambos grupos

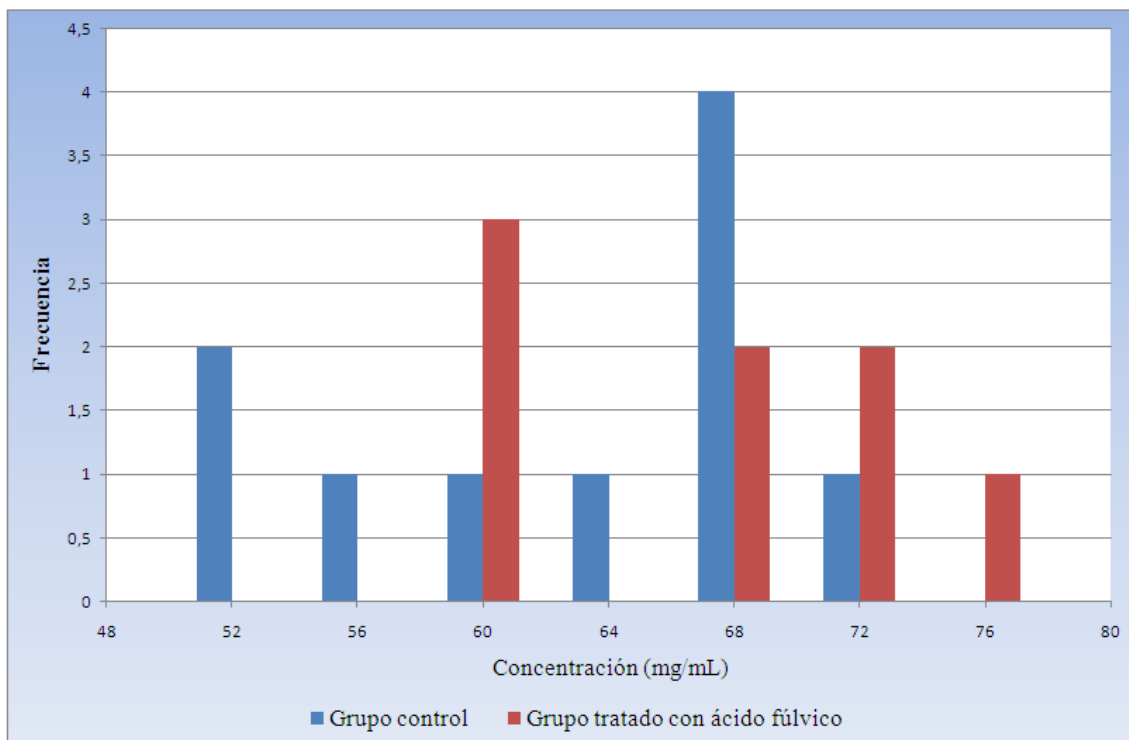


Figura 36. Histograma para la concentración de inmunoglobulinas totales en ambos grupos

Tabla 14. Masa final en los grupos 1 (prueba) y 2 (control).

| | Grupo 1 | Grupo 2 |
|-----------|----------------------------------|----------------------------------|
| Muestra | Masa (g) | Masa (g) |
| 1 | 44 | 43 |
| 2 | 40 | 42 |
| 3 | 44 | 53 |
| 4 | 44 | 44 |
| 5 | 41 | 41 |
| 6 | 38 | 45 |
| 7 | 45 | 40 |
| 8 | 46 | 45 |
| 9 | | 45 |
| 10 | | 44 |
| MA | $42,5 \pm 2,1$ | $44,1 \pm 2,5$ |
| DE | 2,53 | 3,43 |

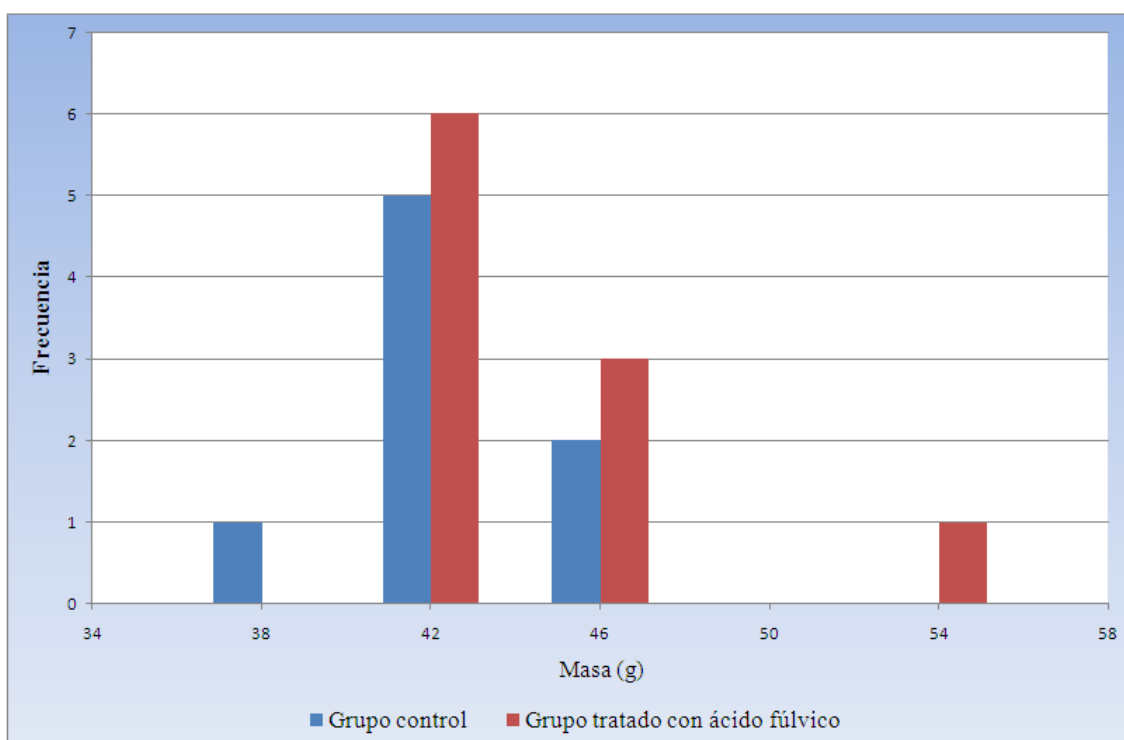


Figura 37. Histograma para la masa final en ambos grupos

Es necesario someter a un tratamiento estadístico de análisis de varianza (prueba de Levene), estadística de contraste de las medias muestrales (prueba de t) y prueba de hipótesis, a los resultados obtenidos en ambos grupos para hacer una comparación y poder afirmar o negar si el ácido fúlvico tiene efectos significativos en el incremento de inmunoglobulina G y totales.

7.3.1. Análisis estadístico (concentración de inmunoglobulina G)

7.3.1.1. Prueba de Hipótesis

Una hipótesis estadística es una aseveración sobre un modelo probabilístico y una prueba de hipótesis es un método para dictaminar sobre la plausibilidad de esa aseveración, usando la muestra como guía. A toda hipótesis confirmatoria corresponde otra hipótesis complementaria que es su negación. En este caso las dos hipótesis son:

Ho: Cuando no existen diferencias entre ambos grupos (hipótesis nula)

Ha: Cuando si existen diferencias entre ambos grupos (hipótesis alternativa)

Situación real (desconocida)

| | | | |
|-----------------|-------------|---------------------------|---------------------------|
| | | Ho es cierta | Ho es falsa |
| Decisión tomada | Rechazar Ho | Error tipo I (α) | Decisión correcta |
| | Aceptar Ho | Decisión correcta | Error tipo II (β) |

La prueba de hipótesis calcula la probabilidad de que los resultados obtenidos en una investigación puedan ser debidos al azar en el supuesto de que la hipótesis nula sea cierta. Cuando se rechaza la hipótesis nula siempre existe el riesgo de equivocarnos, esto es, cuando se concluye que hay diferencias entre ambos grupos cuando no las hay, a este error se le conoce como *Error tipo I*. por otro lado, existe también el riesgo de aceptar la hipótesis nula cuando es falsa y debería de ser rechazada, es decir, cuando se concluye que no existen diferencias entre grupos debido a la ausencia de significación estadística, este error es conocido como *Error tipo II*. Por lo tanto:

α : Es la probabilidad de cometer el *Error tipo I*

β : Es la probabilidad de cometer el *Error tipo II*

Si dicha probabilidad es menor que un valor de p fijado (habitualmente se toma $p = 0,05$), la hipótesis nula se rechazara ($p < 0,05$). Así, cuando un valor de p este por debajo de 0,05 se dirá que el resultado es estadísticamente significativo y no será significativo cuando $p \geq 0,05$.

7.3.1.2. Análisis de varianza

La **Tabla 15** muestra únicamente los resultados de inmunoglobulina G en ambos grupos, así como el cuadrado de cada valor.

Tabla 15. Concentración de inmunoglobulina G en ambos grupos y suma de los cuadrados para cada valor

| Grupo control X ₁ | Grupo de prueba X ₂ | Grupo control | Grupo de prueba |
|--|---|--|--|
| Concentración de X ₁ | Concentración de X ₂ | (X ₁) ² | (X ₂) ² |
| 2,8 | 8,3 | 7,8 | 69,2 |
| 1,8 | 16,3 | 3,5 | 264,9 |
| 12,9 | 13,7 | 166,9 | 189,7 |
| 2,9 | 2,3 | 8,8 | 5,4 |
| 5,3 | 4,9 | 28,8 | 24,8 |
| 2,1 | 5,1 | 4,1 | 26,5 |
| 7,9 | 5,3 | 63,9 | 27,6 |
| 6,1 | 3,9 | 37,3 | 15,3 |
| 21,2 | | 452,4 | |
| 6,9 | | 48,9 | |
| ∑ X₁ = 70,3 n = 10 | ∑ X₂ = 60 n = 8 | ∑ (X₁)² = 822,5 | ∑ (X₂)² = 623,6 |

El cálculo de análisis de varianza, lo dividiremos en 4 pasos:

1- Suma total de cuadrados

$$\sum x_T^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = (822,5 + 623,6) - \frac{(70,3 + 60)^2}{10 + 8} = 502,8$$

2- Suma de cuadrados entre grupos

$$\sum x_E^2 = \left[\sum \frac{(\sum X)^2}{n} \right] - \frac{(\sum X_T)^2}{N} = \left[\frac{(70,3)^2}{10} + \frac{(60)^2}{8} \right] - \frac{(70,3 + 60)^2}{18} = 0,98$$

3- Suma de cuadrados dentro de los grupos

$$\sum x_D^2 = \sum x_T^2 - \sum x_E^2 = 502,8 - 0,98 = 501,7$$

4- Grados de libertad (gl)

- a) Entre grupos $(K - 1)$ $K =$ numero de grupos
 $(2 - 1) = 1$
- b) Dentro de los grupos $(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots (n_i - 1)$
 $(10 - 1) + (8 - 1) = 16$
- c) Total $(n_1 + n_2 + \dots n_i) - 1$
 $(10 + 8) - 1 = 17$

5- Tabulador y resultados

| Origen de la variación | Grados de libertad (gl) | Suma de cuadrados (SC) | Suma de cuadrados medios (SCM) $\frac{SC}{gl}$ | F de Snedecor $\frac{SCM \text{ entre grupos}}{SCM \text{ dentro de grupos}}$ |
|------------------------|-------------------------|------------------------|---|--|
| “Entre” grupos | 1 | 0,98 | 0,98 | $\frac{0,98}{31,4} = 0,03$ |
| “Dentro” de los grupos | 16 | 501,7 | $\frac{501,7}{16} = 31,4$ | |
| Total | 17 | | | |

Para finalizar buscamos en las tablas el valor de F_n^m con m grados de libertad en el numerador y n grados de libertad en el denominador con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ que para nuestro caso particular $m = 1$ y $n = 16$ por lo tanto el valor de $F_{16}^1 = 4,5$ Como la F calculada es menor a la F de tablas ($0,03 < 4,5$) acepto la hipótesis nula. La probabilidad asociada al análisis de varianza es de $p = 0,62 > 0,05$ por lo que también se acepta la hipótesis nula.

7.3.1.3. Estadística de contraste de las medias muestrales

Para el grupo control (X_1)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 822,5 - \frac{(70,3)^2}{10} = 328,3$$

Para el grupo de prueba (X_2)

$$\sum x_2^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 623,6 - \frac{(60)^2}{8} = 173,5$$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} = \frac{|7 - 7,5|}{\sqrt{\frac{328,3 + 173,5}{10 + 8 - 2} \left(\frac{1}{10} + \frac{1}{8} \right)}} = 0,17$$

La probabilidad asociada al resultado en ésta estadística de contraste es $p = 0,86 > 0,05$ por lo que se acepta la hipótesis nula.

7.3.1.4. Potencia de la prueba ($1 - \beta$)

El error β obtenido con el programa G-Power 3.1.2 es $\beta = 0,90$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 90% como lo ilustra la **Figura 38** en el área bajo la curva de color azul, entre mayor sea esta área para el error β , mayor será la probabilidad de aceptar la hipótesis nula, lo que significa, que no hay diferencia estadística significativa entre ambos grupos.

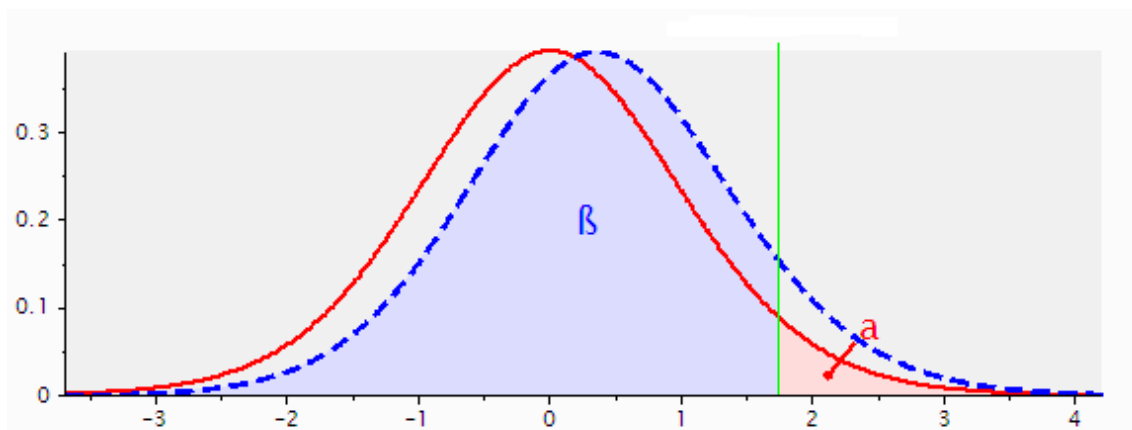


Figura 38. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética entre la concentración de IgG de ambos grupos). Las curvas discontinua corresponde al error β y la continua al error α , ambas curvas se encuentran casi superpuestas y la línea divisoria nos marca el área bajo la curva para cada error, por lo que el area bajo la curva discontinua es de 0,9 esto es, que hay una probabilidad muy alta de aceptar la hipótesis nula.

7.3.2. Análisis estadístico (concentración de inmunoglobulinas totales)

La **Tabla 16** muestra únicamente los resultados de inmunoglobulinas totales en ambos grupos, así como el cuadrado de cada valor.

Tabla 16. Concentración de inmunoglobulinas totales en ambos grupos y suma de los cuadrados para cada valor

| Grupo control X ₁ | Grupo de prueba X ₂ | Grupo control | Grupo de prueba |
|---|--|--|--|
| Concentración de X ₁ | Concentración de X ₂ | (X ₁) ² | (X ₂) ² |
| 58 | 62 | 3364 | 3844 |
| 54 | 60 | 2916 | 3600 |
| 52 | 70 | 2704 | 4900 |
| 64 | 74 | 4096 | 5476 |
| 70 | 60 | 4900 | 3600 |
| 70 | 72 | 4900 | 5184 |
| 68 | 76 | 4624 | 5776 |
| 70 | 70 | 4900 | 4900 |
| 72 | | 5184 | |
| 60 | | 3600 | |
| Σ X₁ = 638 n = 10 | Σ X₂ = 544 n = 8 | Σ (X₁)² = 41188 | Σ (X₂)² = 37280 |

7.3.2.1. Análisis de varianza

1- Suma total de cuadrados

$$\sum x_T^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = (41188 + 37280) - \frac{(638 + 544)^2}{10 + 8} = 850$$

2- Suma de cuadrados entre grupos

$$\sum x_E^2 = \left[\sum \frac{(\sum X)^2}{n} \right] - \frac{(\sum X_T)^2}{N} = \left[\frac{(638)^2}{10} + \frac{(544)^2}{8} \right] - \frac{(638 + 544)^2}{18} = 78,4$$

3- Suma de cuadrados dentro de los grupos

$$\sum x_D^2 = \sum x_T^2 - \sum x_E^2 = 850 - 78,4 = 771,6$$

4- Grados de libertad (gl)

a) Entre grupos (K - 1) K = número de grupos

$$(2 - 1) = 1$$

b) Dentro de los grupos $(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots (n_i - 1)$

$$(10 - 1) + (8 - 1) = 16$$

c) Total $(n_1 + n_2 + \dots n_i) - 1$

$$(10 + 8) - 1 = 17$$

5- Tabulador y resultados

| Origen de la variación | Grados de libertad (gl) | Suma de cuadrados (SC) | Suma de cuadrados medios (SCM) $\frac{SC}{gl}$ | F de Snedecor $\frac{SCM \text{ entre grupos}}{SCM \text{ dentro de grupos}}$ |
|------------------------|-------------------------|------------------------|---|--|
| “Entre” grupos | 1 | 78,4 | 78,4 | $\frac{78,4}{48,2} = 1,6$ |
| “Dentro” de los grupos | 16 | 771,6 | $\frac{771,6}{16} = 48,2$ | |
| Total | 17 | | | |

Como la F calculada es menor a la F de tablas ($F_{16}^1 = 4,5$) esto es $1,6 < 4,5$ se acepta la hipótesis nula. La probabilidad asociada al análisis de varianza es de $p = 0,74 > 0,05$ por lo que también se acepta la hipótesis nula.

7.3.2.2. Estadística de contraste de las medias muestrales

Para el grupo control (X_1)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 41188 - \frac{(638)^2}{10} = 483,6$$

Para el grupo de prueba (X_2)

$$\sum x_2^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 38280 - \frac{(544)^2}{8} = 288$$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} = \frac{|63,8 - 68|}{\sqrt{\frac{483,6 + 288}{10 + 8 - 2} \left(\frac{1}{10} + \frac{1}{8} \right)}} = 1,3$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 0,22 > 0,05$ por lo que se acepta la hipótesis nula.

7.3.2.3. Potencia de la prueba ($1 - \beta$)

El error β obtenido es $\beta = 0,18$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 18% como lo ilustra la **Figura 39** en el área bajo la curva de color azul.

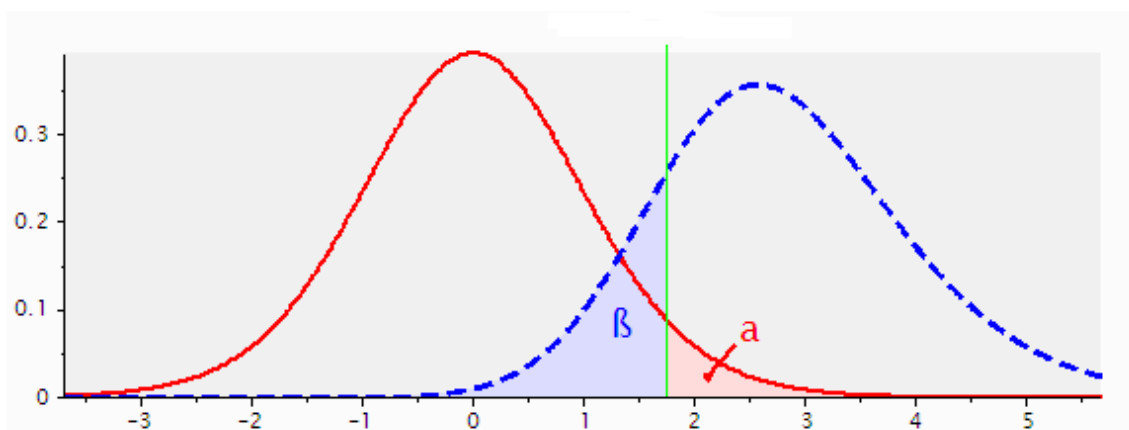


Figura 39. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética entre la concentración de inmunoglobulinas totales de ambos grupos).

7.3.3. Análisis estadístico (masa final en ratones).

La **Tabla 17** muestra los resultados de la masa final en ambos grupos, así como el cuadrado de cada valor.

Tabla 17. Masa final en ambos grupos y suma de los cuadrados para cada valor

| Grupo control | Grupo de prueba | Grupo control | Grupo de prueba |
|------------------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|
| Masa de X_1 | Masa de X_2 | $(X_1)^2$ | $(X_2)^2$ |
| 43 | 44 | 1815 | 1901 |
| 42 | 40 | 1731 | 1616 |
| 53 | 44 | 2767 | 1910 |
| 44 | 44 | 1918 | 1918 |
| 41 | 41 | 1689 | 1665 |
| 45 | 38 | 2043 | 1475 |
| 40 | 45 | 1640 | 2007 |
| 45 | 46 | 1971 | 2088 |
| 45 | | 2061 | |
| 44 | | 1910 | |
| $\sum X_1 = 441$ $n = 10$ | $\sum X_2 = 341$ $n = 8$ | $\sum (X_1)^2 = 19545$ | $\sum (X_2)^2 = 14580$ |

7.3.3.1. Análisis de varianza

1- Suma total de cuadrados

$$\sum x_T^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = (19545 + 14580) - \frac{(441 + 341)^2}{10 + 8} = 160,2$$

2- Suma de cuadrados entre grupos

$$\sum x_E^2 = \left[\sum \frac{(\sum X)^2}{n} \right] - \frac{(\sum X_T)^2}{N} = \left[\frac{(441)^2}{10} + \frac{(341)^2}{8} \right] - \frac{(441 + 341)^2}{18} = 9,5$$

3- Suma de cuadrados dentro de los grupos

$$\sum x_D^2 = \sum x_T^2 - \sum x_E^2 = 160,2 - 9,5 = 150,7$$

4- Grados de libertad (gl)

a) Entre grupos $(K - 1)$ $K =$ número de grupos

$$(2 - 1) = 1$$

b) Dentro de los grupos $(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots + (n_i - 1)$

$$(10 - 1) + (8 - 1) = 16$$

c) Total $(n_1 + n_2 + \dots + n_i) - 1$

$$(10 + 8) - 1 = 17$$

5- Tabulador y resultados

| Origen de la variación | Grados de libertad (gl) | Suma de cuadrados (SC) | Suma de cuadrados medios (SCM) $\frac{SC}{gl}$ | F de Snedecor $\frac{SCM \text{ entre grupos}}{SCM \text{ dentro de grupos}}$ |
|------------------------|-------------------------|------------------------|---|--|
| “Entre” grupos | 1 | 9,5 | 9,5 | $\frac{9,5}{9,4} = 1,01$ |
| “Dentro” de los grupos | 16 | 150,7 | $\frac{150,7}{16} = 9,4$ | |
| Total | 17 | | | |

Como la F calculada es menor a la F de tablas ($F_{16}^1 = 4,5$) esto es $1,01 < 4,5$ se acepta la hipótesis nula. La probabilidad asociada al análisis de varianza es de $p = 0,43 > 0,05$ por lo que también se acepta la hipótesis nula.

7.3.3.2. Estadística de contraste de las medias muestrales

Para el grupo control (X_1)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 19545 - \frac{(441)^2}{10} = 106$$

Para el grupo de prueba (X_2)

$$\sum x_2^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 14580 - \frac{(341)^2}{8} = 45$$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} = \frac{|44,1 - 42,5|}{\sqrt{\frac{106 + 45}{10 + 8 - 2} \left(\frac{1}{10} + \frac{1}{8} \right)}} = 1$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 0,33 > 0,05$ por lo que se acepta la hipótesis nula.

7.3.3.3. Potencia de la prueba ($1 - \beta$)

El error β obtenido es $\beta = 0,28$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 28% como lo ilustra la **Figura 40** en el área bajo la curva de color azul.

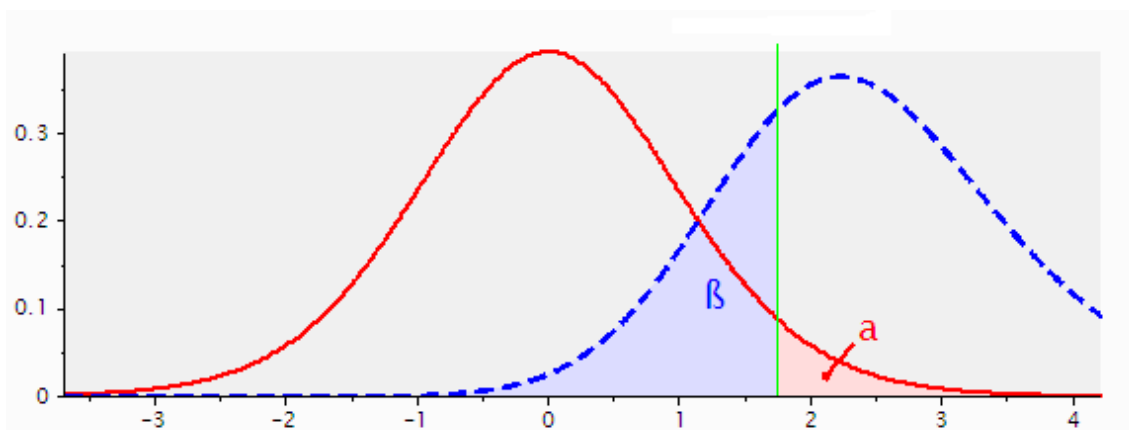


Figura 40. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética entre la masa final de ambos grupos).

7.4. Concentración de inmunoglobulina G (IgG) e inmunoglobulinas totales de ratón (experimento 3)

La **Tabla 18** muestra los resultados de la concentración promedio de IgG e inmunoglobulinas totales en los grupos 1 (control) y grupo 2 (tratamiento con ácido fúlvico más minerales) mientras que en la **Tabla 19** se presentan los resultados de la masa de los ratones tomada al final del periodo de ensayo. En las **Figuras 41 y 42** se presentan los histogramas y polígonos de frecuencia para la concentración de inmunoglobulina G en el grupo 1 y 2 respectivamente, las **Figuras 43 y 44** muestran los histogramas para la concentración de inmunoglobulinas totales y masa final en ambos grupos respectivamente.

Tabla 18. Concentración de inmunoglobulina G e inmunoglobulinas totales para los grupos 1 (control) y 2 (prueba). Dosis de ácido fúlvico 6,75 mg/mL para el grupo 2

| | Grupo 1 | | | Grupo 2 | | |
|-----------|------------------|-----------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|
| Muestra | Absorbancia (nm) | IgG (mg/mL) | Ig totales (mg/mL) | Absorbancia (nm) | IgG (mg/mL) | Ig totales (mg/mL) |
| 1 | 0,368 | 18,5 | 72 | 0,664 | 56,2 | 88 |
| 2 | 0,478 | 30,1 | 70 | 0,557 | 40,2 | 80 |
| 3 | 0,381 | 19,8 | 70 | 0,751 | 71,2 | 78 |
| 4 | 0,299 | 12,8 | 66 | 0,681 | 59,0 | 78 |
| 5 | 0,438 | 25,6 | 70 | 0,798 | 80,1 | 85 |
| 6 | 0,411 | 22,7 | 68 | 0,652 | 54,3 | 84 |
| 7 | 0,488 | 31,3 | 68 | 0,756 | 72,1 | 82 |
| 8 | 0,335 | 15,6 | 70 | 0,643 | 52,8 | 86 |
| MA | | 22 ± 5,5 | 69,2 ± 1,5 | | 60,7±10,8 | 82,6 ± 3,7 |
| DE | | 6,6 | 1,8 | | 12,8 | 3,7 |

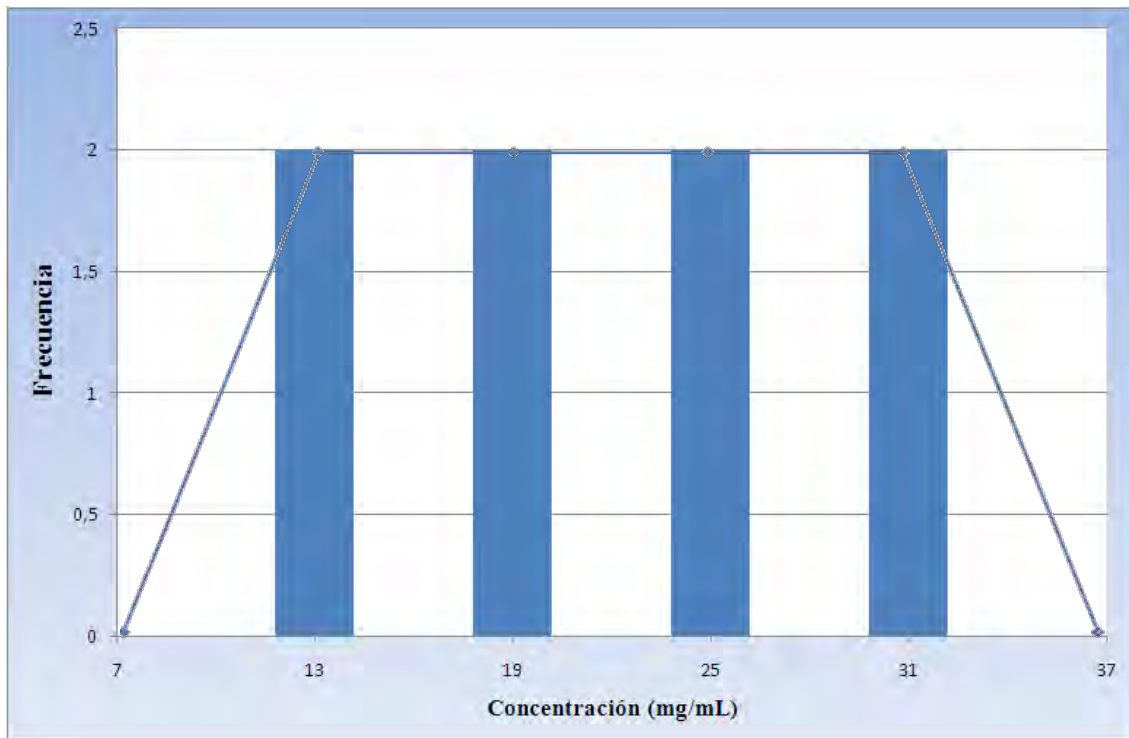


Figura 41. Histograma y polígono de frecuencias para la distribución de concentración de inmunoglobulina G en el grupo control

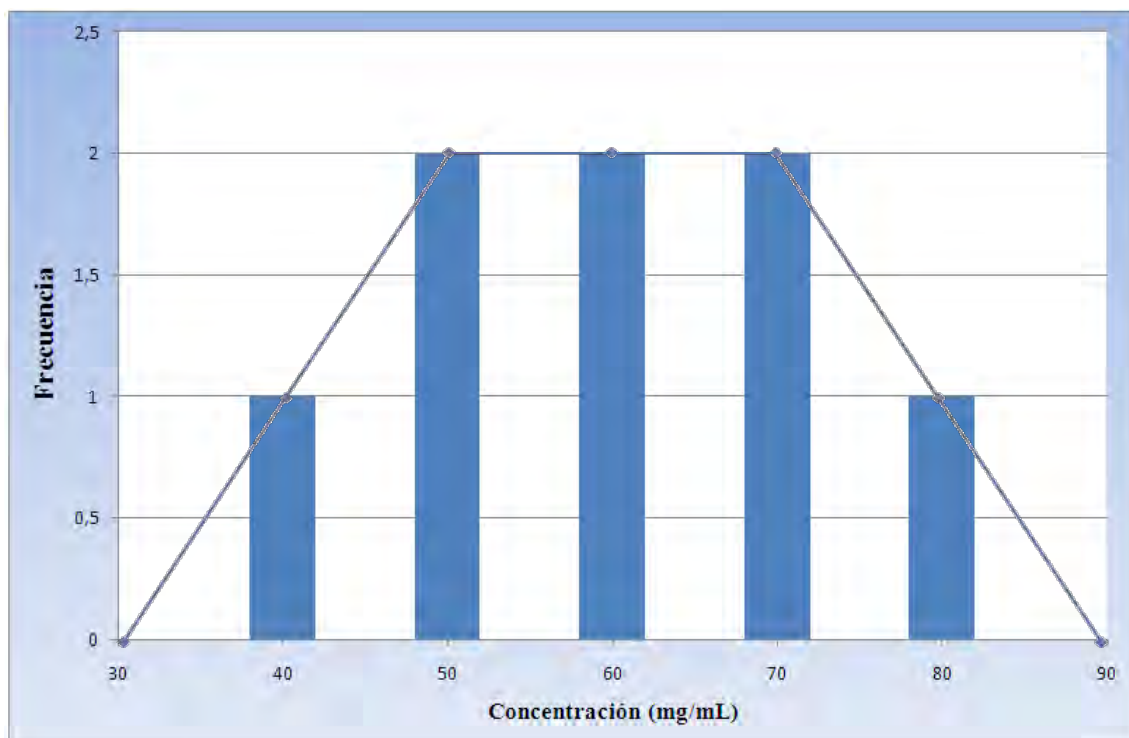


Figura 42. Histograma y polígono de frecuencias para la distribución de concentración de inmunoglobulina G en el grupo tratado con ácido fúlvico más minerales

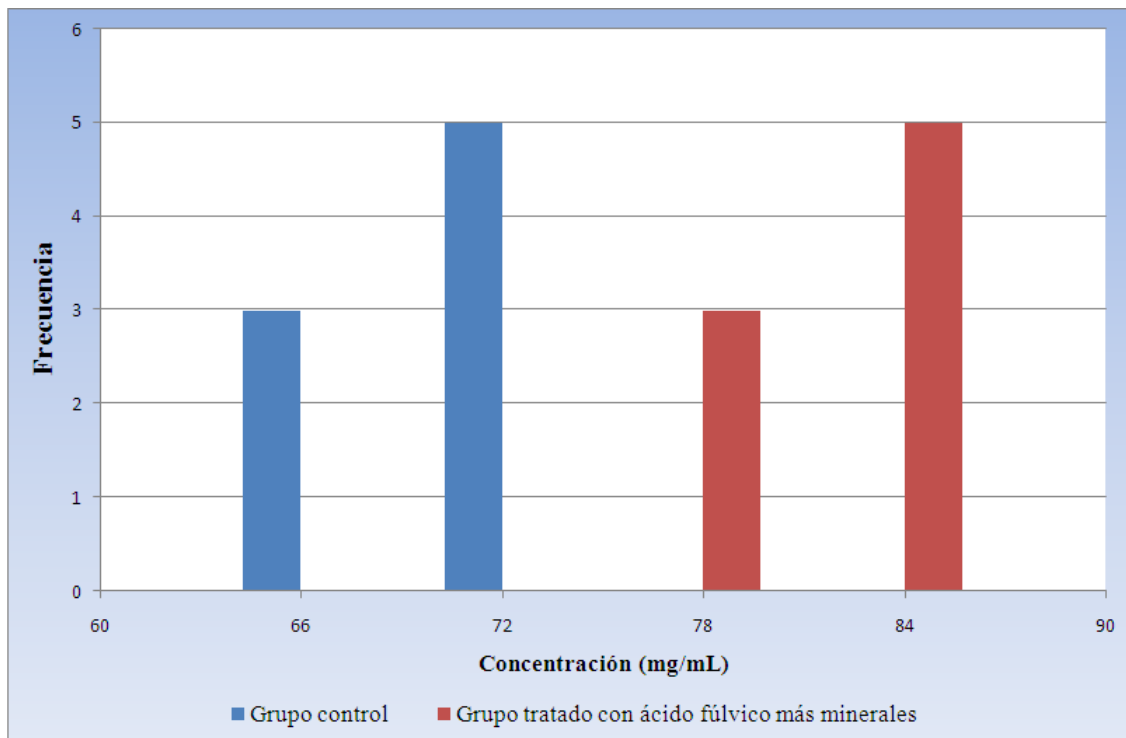


Figura 43. Histograma para la distribución de concentración de inmunoglobulinas totales en ambos grupos.

Tabla 19. Masa final en los grupos 1 (control) y 2 (prueba).

| | Grupo 1 | Grupo 2 |
|-----------|-----------------|-------------------|
| Muestra | Masa (g) | Masa (g) |
| 1 | 39,8 | 30,2 |
| 2 | 40,4 | 33,4 |
| 3 | 37,6 | 32,6 |
| 4 | 38,8 | 35,1 |
| 5 | 39,2 | 30,9 |
| 6 | 41,6 | 31,5 |
| 7 | 40,2 | 33,8 |
| 8 | 39,5 | 34,7 |
| MA | 39,6 ± 1 | 32,7 ± 1,5 |
| DE | 1,2 | 1,8 |

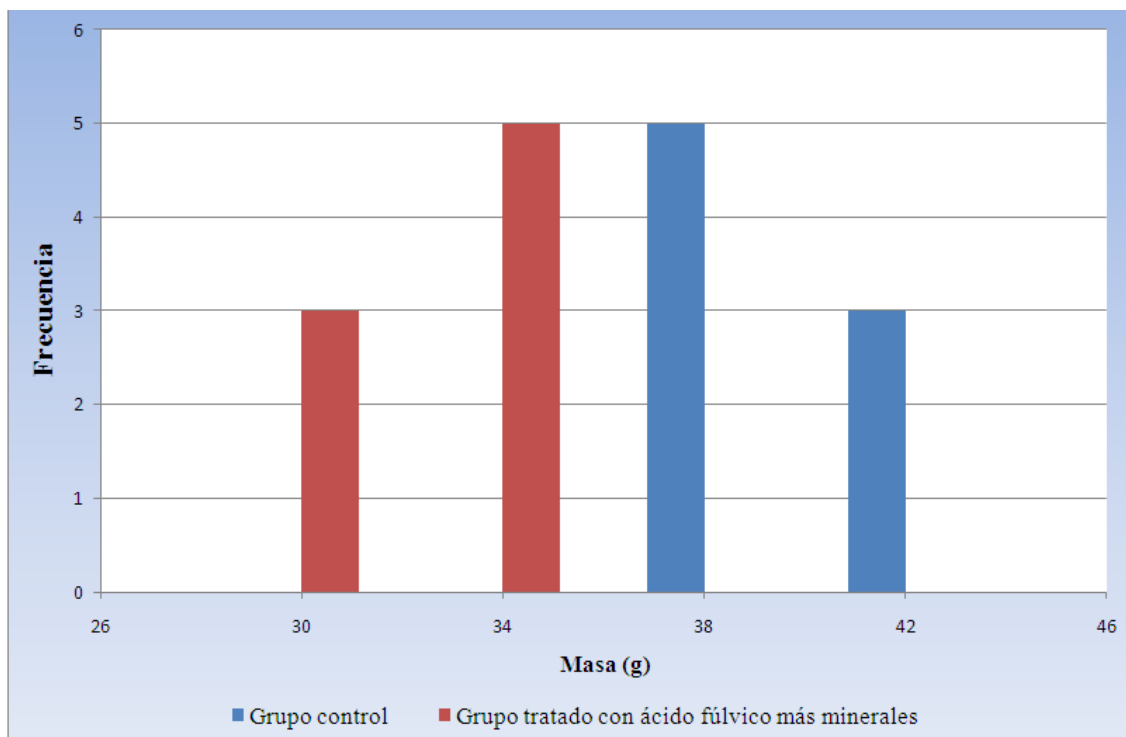


Figura 44. Histograma para la masa final en ambos grupos.

7.4.1. Análisis estadístico (concentración de inmunoglobulina G)

7.4.1.1. Análisis de varianza

La **Tabla 20** muestra únicamente los resultados de inmunoglobulina G en ambos grupos, así como el cuadrado de cada valor.

Tabla 20. Concentración de inmunoglobulina G en ambos grupos y suma de los cuadrados para cada valor.

| Grupo control X_1 | Grupo de prueba X_2 | Grupo control | Grupo de prueba |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Concentración de X_1 | Concentración de X_2 | $(X_1)^2$ | $(X_2)^2$ |
| 18,5 | 56,2 | 343,7 | 3157,4 |
| 30,1 | 40,2 | 906,1 | 1614,3 |
| 19,8 | 71,2 | 390,3 | 5071,3 |
| 12,8 | 59,0 | 162,6 | 3479,2 |
| 25,6 | 80,1 | 653,6 | 6412,3 |
| 22,7 | 54,3 | 516,1 | 2944,1 |
| 31,3 | 72,1 | 979,4 | 5202,9 |
| 15,6 | 52,8 | 244,3 | 2791,4 |
| $\Sigma X_1 = 176,4$ $n = 8$ | $\Sigma X_2 = 485,9$ $n = 8$ | $\Sigma (X_1)^2 = 4196,1$ | $\Sigma (X_2)^2 = 30673$ |

1- Suma total de cuadrados

$$\sum x_T^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = (4196,1 + 30673) - \frac{(176,4 + 485,9)^2}{8 + 8} = 7459,8$$

2- Suma de cuadrados entre grupos

$$\sum x_E^2 = \left[\sum \frac{(\sum X)^2}{n} \right] - \frac{(\sum X_T)^2}{N} = \left[\frac{(176,4)^2}{8} + \frac{(485,9)^2}{8} \right] - \frac{(662,2)^2}{18} = 5987,3$$

3- Suma de cuadrados dentro de los grupos

$$\sum x_D^2 = \sum x_T^2 - \sum x_E^2 = 7459,8 - 5987,3 = 1472,5$$

4- Grados de libertad (gl)

a) Entre grupos (K - 1) K = número de grupos

$$(2 - 1) = 1$$

b) Dentro de los grupos (n₁ - 1) + (n₂ - 1) + ... (n_i - 1)

$$(8 - 1) + (8 - 1) = 14$$

c) Total (n₁ + n₂ + ... n_i) - 1

$$(8 + 8) - 1 = 15$$

5- Tabulador y resultados

| Origen de la variación | Grados de libertad (gl) | Suma de cuadrados (SC) | Suma de cuadrados medios (SCM) $\frac{SC}{gl}$ | F de Snedecor $\frac{SCM \text{ entre grupos}}{SCM \text{ dentro de grupos}}$ |
|------------------------|-------------------------|------------------------|---|--|
| “Entre” grupos | 1 | 5987,3 | 5987,3 | $\frac{5987,3}{105,2} = 56,9$ |
| “Dentro” de los grupos | 14 | 1472,5 | $\frac{1472,5}{14} = 105,2$ | |
| Total | 15 | | | |

Como la F calculada es mayor a la F de tablas ($F_{14}^1 = 4,6$) esto es $56,9 > 4,6$ se rechaza la hipótesis nula. La probabilidad asociada al análisis de varianza es de $p = 2,7 \times 10^{-6} < 0,05$ por lo que también se rechaza la hipótesis nula.

7.4.1.2. Estadística de contraste de las medias muestrales

Primera comparación:

Para el grupo 1 (control)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 4196,1 - \frac{(176,4)^2}{8} = 306,5$$

Para el grupo 2 (ácido fúlvico más minerales)

$$\sum x_2^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 30672,9 - \frac{(485,9)^2}{8} = 1160,6$$

Como $n_1 = n_2$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n(n-1)}}} = \frac{|22 - 60,7|}{\sqrt{\frac{306,5 + 1160,6}{8(8-1)}}} = 7,6$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 2,5 \times 10^{-6} < 0,05$ por lo que se rechaza la hipótesis nula.

7.4.1.3. Potencia de la prueba ($1 - \beta$)

El error β calculado es $\beta = 0,00001$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 0,001% como lo ilustra la **Figura 45**.

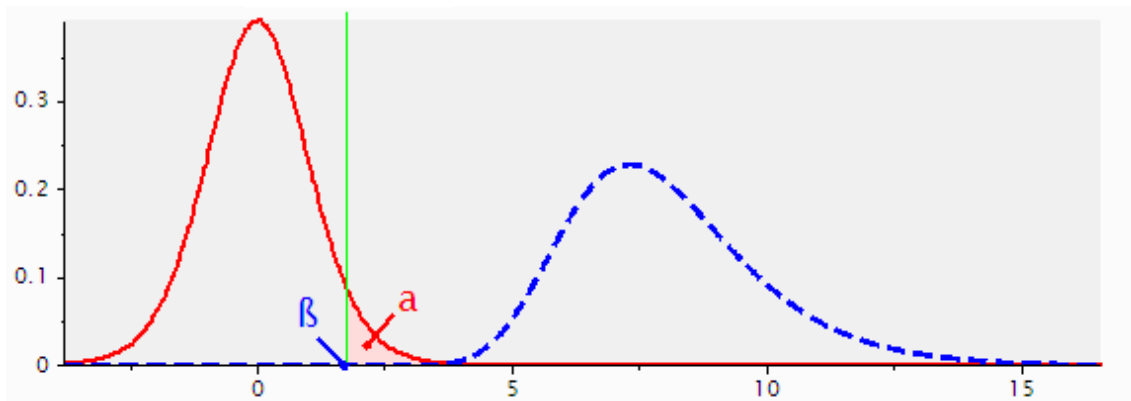


Figura 45. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de IgG entre los grupos 1 y 2).

7.4.1.4. Incremento de inmunoglobulina G

Los resultados del análisis estadístico revelan que existen diferencias significativas entre las medias aritméticas de ambos grupos por lo que se procede a calcular el incremento de inmunoglobulina G del grupo 2 con respecto del grupo 1.

$$\text{Incremento} = \frac{60,7 - 22}{22} (100) = 175,9\%$$

7.4.2. Análisis estadístico (concentración de inmunoglobulinas totales)

7.4.2.1. Análisis de varianza

La **Tabla 21** muestra únicamente los resultados de inmunoglobulinas totales en ambos grupos, así como el cuadrado de cada valor.

Tabla 21. Concentración de inmunoglobulinas totales en ambos grupos y suma de los cuadrados para cada valor.

| Grupo control X_1 | Grupo de prueba X_2 | Grupo control | Grupo de prueba |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|
| Concentración de X_1 | Concentración de X_2 | $(X_1)^2$ | $(X_2)^2$ |
| 72 | 88 | 5184 | 7744 |
| 70 | 80 | 4900 | 6400 |
| 70 | 78 | 4900 | 6084 |
| 66 | 78 | 4356 | 6084 |
| 70 | 85 | 4900 | 7225 |
| 68 | 84 | 4624 | 7056 |
| 68 | 82 | 4624 | 6724 |
| 70 | 86 | 4900 | 7396 |
| $\sum X_1 = 554$ $n = 8$ | $\sum X_2 = 661$ $n = 8$ | $\sum (X_1)^2 = 38388$ | $\sum (X_2)^2 = 54713$ |

1- Suma total de cuadrados

$$\sum x_T^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = (38388 + 54713) - \frac{(554 + 661)^2}{8 + 8} = 836,9$$

2- Suma de cuadrados entre grupos

$$\sum x_E^2 = \left[\sum \frac{(\sum X)^2}{n} \right] - \frac{(\sum X_T)^2}{N} = \left[\frac{(554)^2}{8} + \frac{(661)^2}{8} \right] - \frac{(1215)^2}{18} = 715,6$$

3- Suma de cuadrados dentro de los grupos

$$\sum x_D^2 = \sum x_T^2 - \sum x_E^2 = 836,9 - 715,6 = 121,4$$

4- Grados de libertad (gl)

a) Entre grupos $(K - 1)$ $K =$ numero de grupos

$$(2 - 1) = 1$$

b) Dentro de los grupos $(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots (n_i - 1)$

$$(8 - 1) + (8 - 1) = 14$$

c) Total $(n_1 + n_2 + \dots + n_i) - 1$

$$(8 + 8) - 1 = 15$$

5- Tabulador y resultados

| Origen de la variación | Grados de libertad (gl) | Suma de cuadrados (SC) | Suma de cuadrados medios (SCM) $\frac{SC}{gl}$ | F de Snedecor $\frac{SCM \text{ entre grupos}}{SCM \text{ dentro de grupos}}$ |
|------------------------|-------------------------|------------------------|--|---|
| “Entre” grupos | 1 | 715,6 | 715,6 | $\frac{715,6}{8,6} = 82,5$ |
| “Dentro” de los grupos | 14 | 121,4 | $\frac{121,4}{14} = 8,6$ | |
| Total | 15 | | | |

Como la F calculada es mayor a la F de tablas ($F_{14}^1 = 4,6$) esto es $82,5 > 4,6$ se rechaza la hipótesis nula. La probabilidad asociada al análisis de varianza es de $p = 3 \times 10^{-7} < 0,05$ por lo que también se rechaza la hipótesis nula.

7.4.2.2. Estadística de contraste de las medias muestrales

Primera comparación:

Para el grupo 1 (control)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 38388 - \frac{(554)^2}{8} = 23,5$$

Para el grupo 2 (ácido fúlvico más minerales)

$$\sum x_2^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 54713 - \frac{(661)^2}{8} = 97,9$$

Como $n_1 = n_2$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n(n-1)}}} = \frac{|69,2 - 82,6|}{\sqrt{\frac{23,5 + 97,9}{8(8-1)}}} = 9,1$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 2,9 \times 10^{-7} < 0,05$ por lo que se rechaza la hipótesis nula.

7.4.2.3. Potencia de la prueba ($1 - \beta$)

El error β calculado es $\beta = 0,00001$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 0,001% como lo ilustra la **Figura 46**.

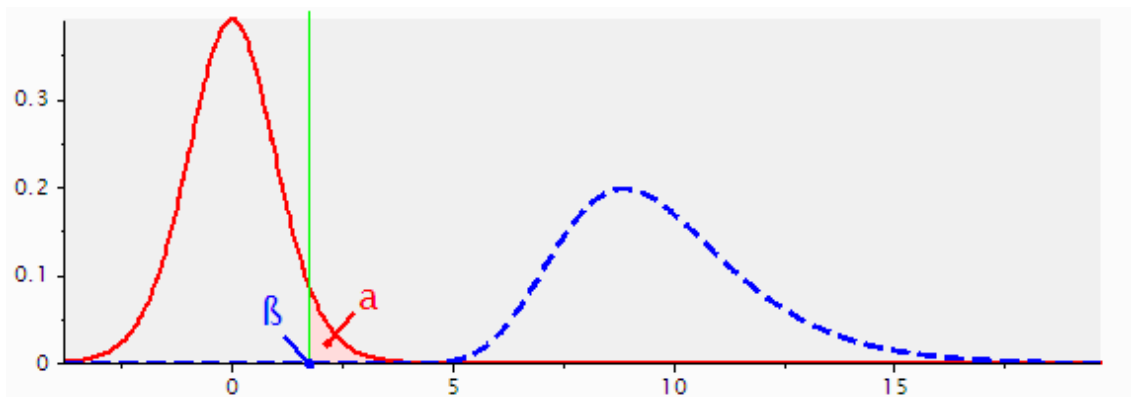


Figura 46. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de inmunoglobulinas totales entre los grupos 1 y 2).

7.4.2.4. Incremento de inmunoglobulinas totales en ratones.

Como lo muestran los resultados estadísticos, la comparación entre las medias aritméticas de ambos grupos es notable, por lo que se afirma que si existe un incremento de anticuerpos totales del grupo 2 con respecto al grupo 1, como se muestra a continuación:

$$\text{Incremento} = \frac{82,6 - 69,2}{69,2} (100) = 19,4\%$$

7.4.3. Análisis estadístico (masa final en ratones)

7.4.3.1. Análisis de varianza

La **Tabla 22** muestra únicamente los resultados de inmunoglobulinas totales en ambos grupos, así como el cuadrado de cada valor.

Tabla 22. Concentración de inmunoglobulinas totales en ambos grupos y suma de los cuadrados para cada valor.

| Grupo control X ₁ | Grupo de prueba X ₂ | Grupo control | Grupo de prueba |
|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Concentración de X ₁ | Concentración de X ₂ | (X ₁) ² | (X ₂) ² |
| 39,8 | 30,2 | 1584 | 912 |
| 40,4 | 33,4 | 1632,2 | 1115,6 |
| 37,6 | 32,6 | 1413,8 | 1062,8 |
| 38,8 | 35,1 | 1505,4 | 1232 |
| 39,2 | 30,9 | 1536,6 | 954,8 |
| 41,6 | 31,5 | 1730,6 | 992,3 |
| 40,2 | 33,8 | 1616 | 1142,4 |
| 39,5 | 34,7 | 1560,3 | 1204,1 |
| $\Sigma X_1 = 317,1$ $n = 8$ | $\Sigma X_2 = 262,2$ $n = 8$ | $\Sigma (X_1)^2 = 12578,9$ | $\Sigma (X_2)^2 = 8616$ |

1- Suma total de cuadrados

$$\sum x_T^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = (12578,9 + 8616) - \frac{(317,1 + 262,2)^2}{8 + 8} = 220,6$$

2- Suma de cuadrados entre grupos

$$\sum x_E^2 = \left[\sum \frac{(\sum X)^2}{n} \right] - \frac{(\sum X_T)^2}{N} = \left[\frac{(317,1)^2}{8} + \frac{(262,2)^2}{8} \right] - \frac{(579,3)^2}{18} = 188,3$$

3- Suma de cuadrados dentro de los grupos

$$\sum x_D^2 = \sum x_T^2 - \sum x_E^2 = 220,6 - 188,3 = 32,2$$

4- Grados de libertad (gl)

a) Entre grupos (K - 1) K = numero de grupos

$$(2 - 1) = 1$$

b) Dentro de los grupos (n₁ - 1) + (n₂ - 1) + ... (n_i - 1)

$$(8 - 1) + (8 - 1) = 14$$

c) Total (n₁ + n₂ + ... n_i) - 1

$$(8 + 8) - 1 = 15$$

5- Tabulador y resultados

| Origen de la variación | Grados de libertad (gl) | Suma de cuadrados (SC) | Suma de cuadrados medios (SCM) $\frac{SC}{gl}$ | F de Snedecor $\frac{SCM \text{ entre grupos}}{SCM \text{ dentro de grupos}}$ |
|------------------------|-------------------------|------------------------|---|--|
| “Entre” grupos | 1 | 188,3 | 188,3 | $\frac{188,3}{2,3} = 81,8$ |
| “Dentro” de los grupos | 14 | 32,2 | $\frac{32,2}{14} = 2,3$ | |
| Total | 15 | | | |

Como la F calculada es mayor a la F de tablas ($F_{14}^1 = 4,6$) esto es $81,8 > 4,6$ se rechaza la hipótesis nula. La probabilidad asociada al análisis de varianza es de $p = 3,2 \times 10^{-7} < 0,05$ por lo que también se rechaza la hipótesis nula.

7.4.3.2. Estadística de contraste de las medias muestrales

Primera comparación:

Para el grupo 1 (control)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 12578,9 - \frac{(317,1)^2}{8} = 9,8$$

Para el grupo 2 (ácido fúlvico más minerales)

$$\sum x_2^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 8615,9 - \frac{(262,2)^2}{8} = 22,3$$

Como $n_1 = n_2$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n(n-1)}}} = \frac{|39,6 - 32,7|}{\sqrt{\frac{9,8 + 22,3}{8(8-1)}}} = 9,1$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 2,9 \times 10^{-7} < 0,05$ por lo que se rechaza la hipótesis nula.

7.4.3.3. Potencia de la prueba (1 - β)

El error β calculado es $\beta = 0,00001$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 0,001% como lo ilustra la **Figura 47**.

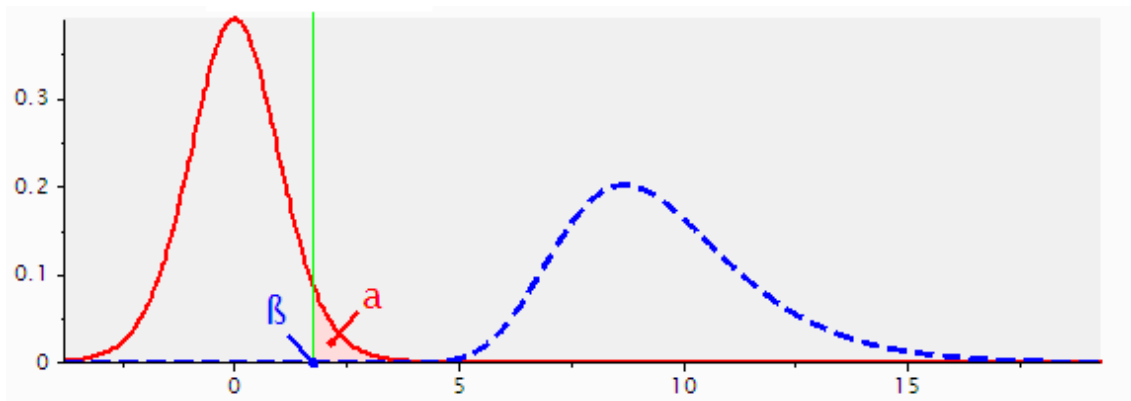


Figura 47. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética de la masa final entre los grupos 1 y 2).

7.4.34. Incremento de masa en ratones.

Una vez más, es evidente la diferencia entre las medias de ambos grupos, pero en ésta ocasión, el incremento de masa no favoreció al grupo en tratamiento con ácido fúlvico, sino al grupo control, siendo éste de:

$$\text{Incremento} = \frac{39,6 - 32,7}{32,7} (100) = 21,1\%$$

7.5. Concentración de inmunoglobulina G (IgG) e inmunoglobulinas totales de ratón (experimento 4)

En la **Tabla 23** se dan los resultados de las concentraciones de inmunoglobulina G para los grupos 1 (control), 2 (tratamiento con ácido fúlvico) y 3 (tratamiento con ácido fúlvico más minerales). Mientras que en las **Figuras 48, 49 y 50** muestran los histogramas y polígonos de frecuencias para la concentración de inmunoglobulina G en los grupos 1, 2 y 3.

Tabla 23. Concentración de IgG de ratón en los tres grupos de ratones. Dosis de ácido fúlvico 6,75 mg/mL para los grupos dos y tres

| Grupo 1 | | Grupo 2 | | Grupo 3 | |
|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Absorbancia (nm) | IgG (mg/mL) | Absorbancia (nm) | IgG (mg/mL) | Absorbancia (nm) | IgG (mg/mL) |
| 0,466 | 8,3 | 0,808 | 18,3 | 0,605 | 11,9 |
| 0,575 | 11,2 | 1,440 | 41,9 | 0,665 | 13,8 |
| 0,439 | 7,6 | 1,144 | 30,1 | 0,839 | 19,3 |
| 0,712 | 15,2 | 0,782 | 17,4 | 1,346 | 38,1 |
| 0,204 | 2,5 | 0,616 | 12,4 | 0,677 | 14,1 |
| 0,210 | 2,6 | 0,735 | 15,9 | 0,939 | 22,6 |
| 0,284 | 4,1 | 1,072 | 27,4 | 0,600 | 11,9 |
| 0,254 | 3,5 | 1,325 | 37,2 | 0,533 | 10,1 |
| 0,207 | 2,6 | 1,382 | 39,5 | | |
| <i>MA</i> | <i>6,4 ± 3,5</i> | | <i>26,6 ± 8,6</i> | | <i>17,7 ± 7,7</i> |
| <i>DE</i> | <i>4,5</i> | | <i>11,2</i> | | <i>9,2</i> |

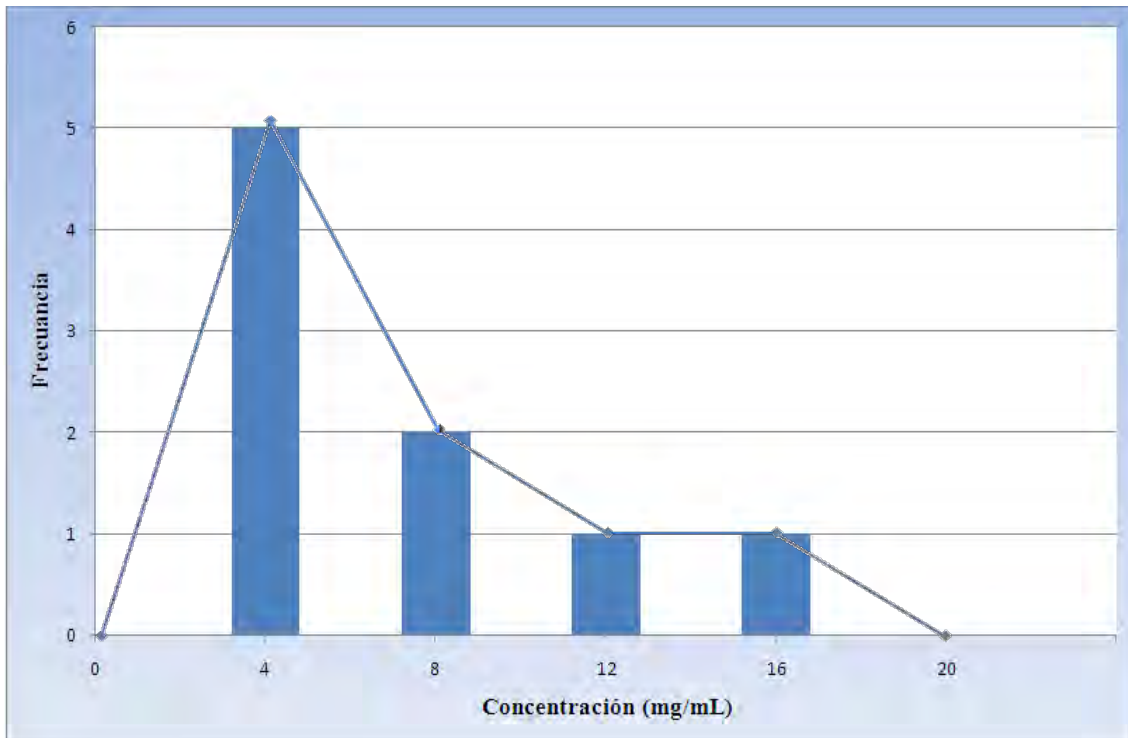


Figura 48. Histograma y polígono de frecuencias para la distribución de concentración de inmunoglobulinas G en el grupo control

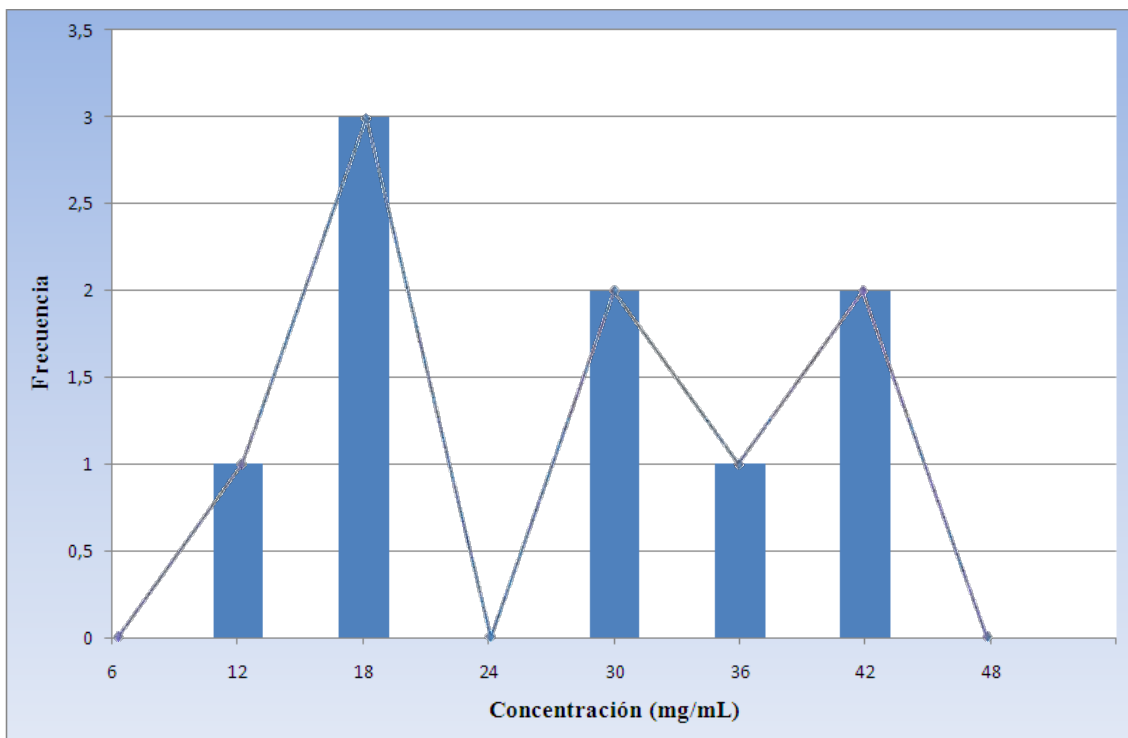


Figura 49. Histograma y polígono de frecuencias para la distribución de concentración de inmunoglobulinas G en el grupo tratado con ácido fúlvico

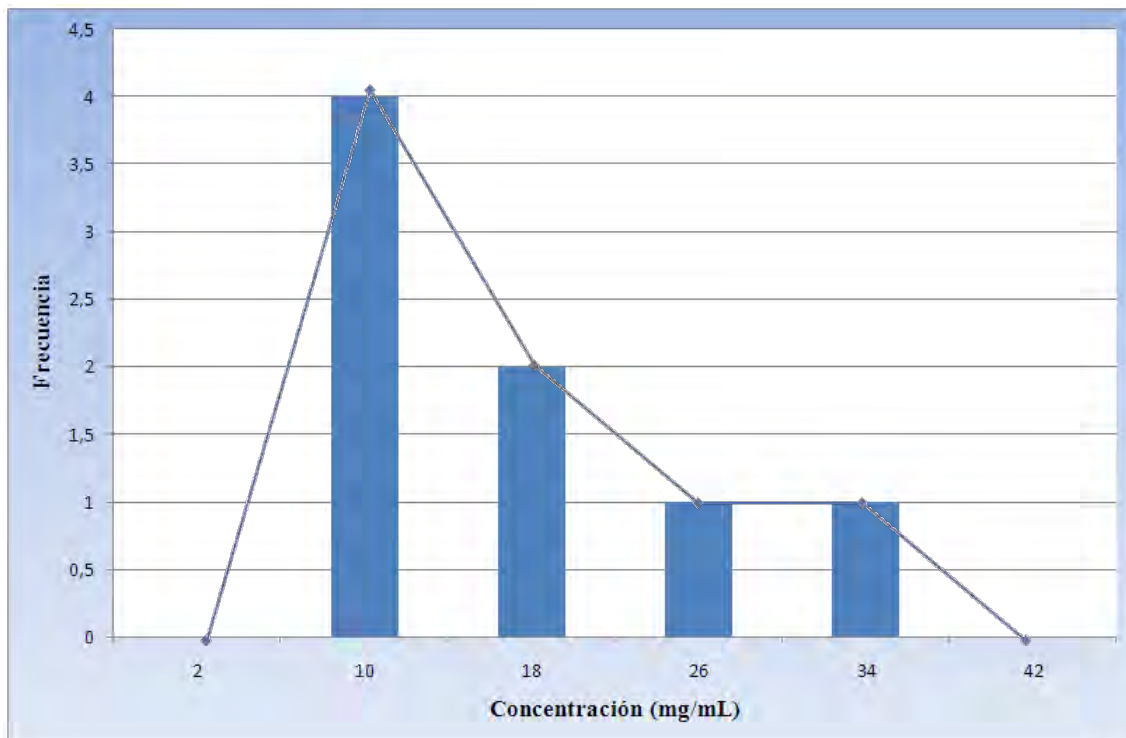


Figura 50. Histograma y polígono de frecuencias para la distribución de concentración de inmunoglobulina G en el grupo tratado con ácido fúlvico más minerales.

En la **Tabla 24** se dan los resultados de las concentraciones de inmunoglobulina totales para los grupos 1 (control), 2 (tratamiento con ácido fúlvico) y 3 (tratamiento con ácido fúlvico más minerales). La **Figura 51** muestra el histograma para la concentración de inmunoglobulinas totales en los grupos 1, 2 y 3.

En la **Tabla 25** se muestran los resultados de la masa inicial y final de los ratones en el periodo de ensayo. Las **Figuras 52 y 53** se muestran los histogramas para la masa inicial y final en los tres grupos respectivamente.

Tabla 24. Concentración de inmunoglobulinas totales en los 3 grupos de ratones. Dosis de ácido fúlvico 6,75 mg/mL para los grupos dos y tres

| | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 |
|----------------|---|---|---|
| <i>Muestra</i> | <i>Inmunoglobulinas totales (mg/mL)</i> | <i>Inmunoglobulinas totales (mg/mL)</i> | <i>Inmunoglobulinas totales (mg/mL)</i> |
| 1 | 58 | 66 | 66 |
| 2 | 62 | 68 | 70 |
| 3 | 48 | 66 | 70 |
| 4 | 62 | 76 | 62 |
| 5 | 54 | 65 | 70 |
| 6 | 60 | 76 | 62 |
| 7 | 70 | 72 | 70 |
| 8 | 72 | 70 | 68 |
| 9 | 61 | 68 | |
| MA | 60,7 ± 6,5 | 69,6 ± 3,2 | 66,5 ± 2,9 |
| DE | 7,8 | 4,2 | 3,5 |

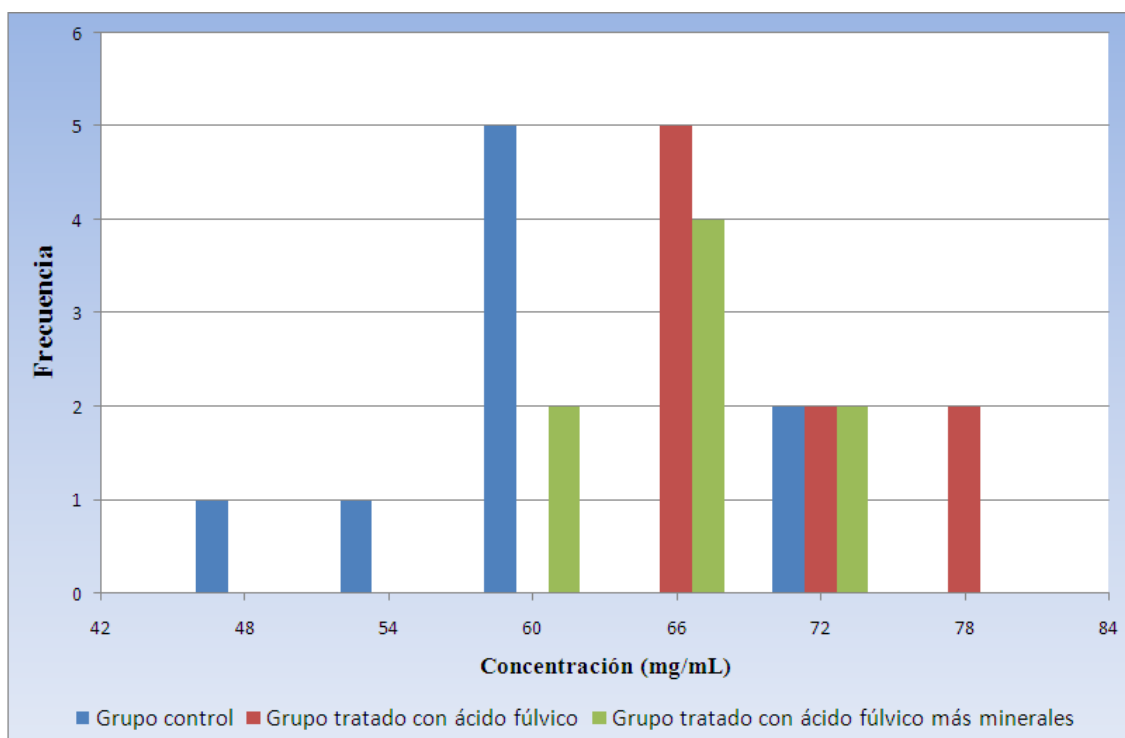


Figura 51. Histograma para la distribución de concentración de inmunoglobulinas totales en los tres grupos.

Tabla 25. Masa inicial y final de los tres grupos de ratones durante el periodo de ensayo.

| | Grupo 1 (control) | | Grupo 2 (AF) | | Grupo 3 (AF + minerales) | |
|-----------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|
| | Inicial | Final | Inicial | Final | Inicial | Final |
| Muestra | Peso (g) | Peso (g) | Peso (g) | Peso (g) | Peso (g) | Peso (g) |
| 1 | 27 | 45 | 27 | 44 | 29 | 43 |
| 2 | 27 | 42 | 29 | 45 | 28 | 42 |
| 3 | 27 | 46 | 27 | 41 | 29 | 42 |
| 4 | 27 | 46 | 28 | 44 | 28 | 44 |
| 5 | 26 | 42 | 27 | 42 | 29 | 45 |
| 6 | 28 | 42 | 30 | 40 | 29 | 43 |
| 7 | 29 | 45 | 26 | 39 | 28 | 42 |
| 8 | 26 | 41 | 28 | 41 | 29 | 47 |
| 9 | 26 | 37 | 27 | 32 | 28 | |
| MA | 27,0 ± 0,65 | 42,8 ± 2,19 | 27,7 ± 0,96 | 40,9 ± 3,03 | 28,4 ± 0,40 | 43,5 ± 1,38 |
| DE | 0,85 | 2,86 | 1,25 | 3,95 | 0,53 | 1,65 |

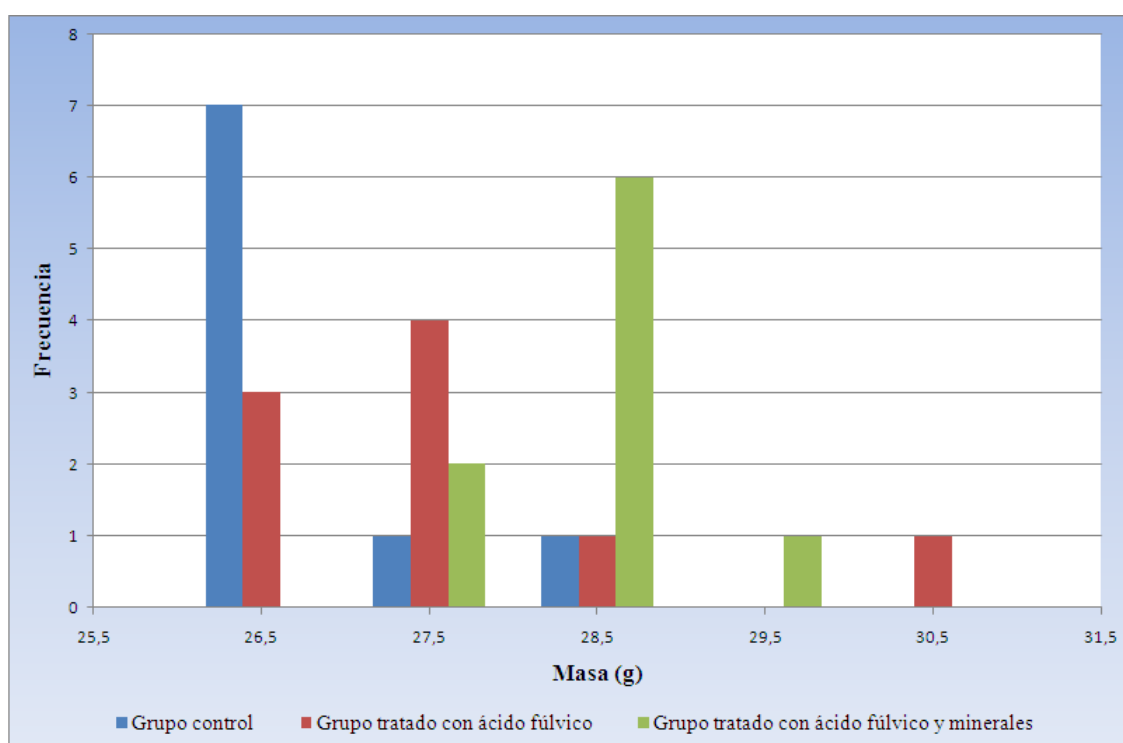


Figura 52. Histograma para la masa inicial en los tres grupos.

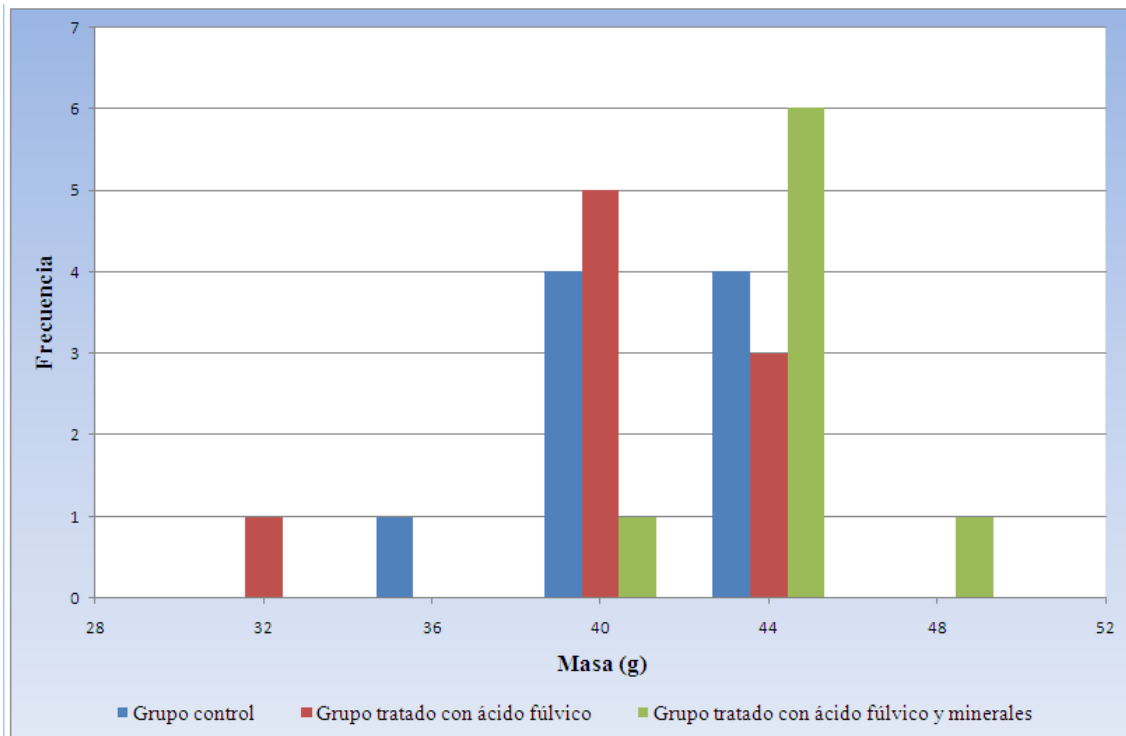


Figura 53. Histograma para la masa final en los tres grupos.

7.5.1. Análisis estadístico (concentración de inmunoglobulina G)

La **Tabla 26** muestra las concentraciones de inmunoglobulina G de los tres grupos, así como el cuadrado de cada valor para su análisis estadístico.

Tabla 26. Concentración de IgG en los tres grupos y suma de los cuadrados para cada valor

| Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Concentración de X_1 | Concentración de X_2 | Concentración de X_3 | $(X_1)^2$ | $(X_2)^2$ | $(X_3)^2$ |
| 8,3 | 18,3 | 11,9 | 68,8 | 334,2 | 145,2 |
| 11,2 | 41,9 | 13,8 | 126,6 | 1757,2 | 190,8 |
| 7,6 | 30,1 | 19,3 | 57,7 | 907,9 | 371,8 |
| 15,2 | 17,4 | 38,1 | 231,7 | 303,4 | 1447,6 |
| 2,5 | 12,4 | 14,1 | 6,4 | 153,3 | 200,4 |
| 2,6 | 15,9 | 22,6 | 6,9 | 254,6 | 513,6 |
| 4,1 | 27,4 | 11,9 | 16,6 | 752,9 | 141,8 |
| 3,5 | 37,2 | 10,1 | 12,0 | 1382,9 | 101,1 |
| 2,6 | 39,5 | | 6,7 | 1562,7 | |
| $\Sigma X_1 = 57,6$ $n = 9$ | $\Sigma X_2 = 240,2$ $n = 9$ | $\Sigma X_3 = 141,9$ $n = 8$ | $\Sigma (X_1)^2 = 533,4$ | $\Sigma (X_2)^2 = 7408,9$ | $\Sigma (X_3)^2 = 3112,2$ |

7.5.1.1. Análisis de varianza

1- Suma total de cuadrados

$$\sum X = 57,6 + 240,2 + 141,9 = 11054,5$$

$$\sum (X_3)^2 = 533,4 + 7408,9 + 3112,2 = 11054,5$$

$$\sum n = 9 + 9 + 8 = 26$$

$$\sum x_T^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = (11054,5) - \frac{(439,8)^2}{26} = 3613,2$$

2- Suma de cuadrados entre grupos

$$\sum x_E^2 = \left[\sum \frac{(\sum X)^2}{n} \right] - \frac{(\sum X_T)^2}{N} = \left[\frac{(57,6)^2}{9} + \frac{(240,2)^2}{9} + \frac{(141,9)^2}{8} \right] - \frac{(439,8)^2}{26}$$

$$\sum x_E^2 = 1860,6$$

3- Suma de cuadrados dentro de los grupos

$$\sum x_D^2 = \sum x_T^2 - \sum x_E^2 = 3613,2 - 1860,6 = 1752,6$$

4- Grados de libertad (gl)

a) Entre grupos $(K - 1)$ $K =$ numero de grupos

$$(3 - 1) = 2$$

b) Dentro de los grupos $(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots (n_i - 1)$

$$(9 - 1) + (9 - 1) + (8 + 1) = 23$$

c) Total $(n_1 + n_2 + \dots n_i) - 1$

$$(9 + 9 + 8) - 1 = 25$$

5- Tabulador y resultados

| Origen de la variación | Grados de libertad (gl) | Suma de cuadrados (SC) | Suma de cuadrados medios (SCM) $\frac{SC}{gl}$ | F de Snedecor $\frac{SCM \text{ entre grupos}}{SCM \text{ dentro de grupos}}$ |
|------------------------|-------------------------|------------------------|---|--|
| "Entre" grupos | 2 | 1860,6 | $\frac{1860,6}{2} = 930,3$ | $\frac{930,3}{76,2} = 12,2$ |
| "Dentro" de los grupos | 23 | 1752,6 | $\frac{1752,6}{23} = 76,2$ | |
| Total | 25 | | | |

Finalmente se busca en las tablas el valor de F_n^m con m grados de libertad en el numerador y n grados de libertad en el denominador con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ que para nuestro caso particular $m = 2$ y $n = 23$ por lo tanto el valor de $F_{23}^2 = 3,42$. Como la F calculada es mayor a la F de tablas ($12,2 > 3,42$) rechazo la hipótesis nula. La probabilidad asociada al análisis de varianza es de $p = 0,00024 < 0,05$ por lo que también se rechaza la hipótesis nula.

7.5.1.2. Contraste posterior a la F de Snedecor

Como en éste caso, sí existe una diferencia entre medias (\bar{X}), el siguiente paso será investigar dónde se encuentra dicha diferencia, como hay tres medias, se pueden hacer tres comparaciones:

- 1- \bar{X} del grupo 1 con \bar{X} del grupo 2
- 2- \bar{X} del grupo 1 con \bar{X} del grupo 3
- 3- \bar{X} del grupo 2 con \bar{X} del grupo 3

En primer lugar, y “dentro” de cada grupo se calcula la razón F

$$F = \frac{(\bar{X}_1 + \bar{X}_2)^2}{\frac{s_D^2(n_1 + n_2)}{n_1 n_2}}$$

donde s_D^2 es la varianza dentro de los grupos.

Primera comparación:

$$F = \frac{(6,4 - 26,7)^2}{\frac{76,2(9 + 9)}{(9)(9)}} = 24,3$$

Segunda comparación:

$$F = \frac{(6,4 - 17,7)^2}{\frac{76,2(9 + 8)}{(9)(8)}} = 7,1$$

Tercera comparación:

$$F = \frac{(26,7 - 17,7)^2}{\frac{76,2(9 + 8)}{(9)(8)}} = 4,4$$

El valor de $F_{23}^2 = 3,42$ se multiplica por los grados de libertad entre grupos ($K - 1$), esto es $3,42(3 - 1) = 6,8$. Cada una de las tres F calculadas se compara con $6,8$ y solo la

F de la tercera comparación es inferior a este valor, por lo que no existe diferencia significativa entre estas dos medias y se acepta la hipótesis nula, mientras que en la primera y segunda comparación se rechaza la hipótesis nula.

7.5.1.3. Estadística de contraste de las medias muestrales

Primera comparación:

Para el grupo 1 (control)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 533,4 - \frac{(57,6)^2}{9} = 164,1$$

Para el grupo 2 (ácido fúlvico)

$$\sum x_2^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 7409 - \frac{(240,2)^2}{9} = 996$$

Como $n_1 = n_2$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n(n-1)}}} = \frac{|6,4 - 26,7|}{\sqrt{\frac{164,1 + 996}{9(9-1)}}} = 5$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 0,00013 < 0,05$ por lo que se rechaza la hipótesis nula.

Segunda comparación:

Para el grupo 1 (control)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 533,4 - \frac{(57,6)^2}{9} = 164,1$$

Para el grupo 3 (ácido fúlvico más minerales)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 3112,2 - \frac{(142)^2}{8} = 592,7$$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}} = \frac{|6,4 - 17,7|}{\sqrt{\frac{164,1 + 592,7}{9 + 8 - 2} \left(\frac{1}{9} + \frac{1}{8} \right)}}} = 3,3$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 0,005 < 0,05$ por lo que se rechaza la hipótesis nula.

Tercera comparación:

Para el grupo 2 (ácido fúlvico)

$$\sum x_2^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 7409 - \frac{(240,2)^2}{9} = 996$$

Para el grupo 3 (ácido fúlvico más minerales)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 3112,2 - \frac{(142)^2}{8} = 592,7$$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} = \frac{|26,7 - 17,7|}{\sqrt{\frac{996 + 592,7}{9 + 8 - 2} \left(\frac{1}{9} + \frac{1}{8}\right)}} = 1,8$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 0,094 > 0,05$ por lo que se acepta la hipótesis nula.

7.5.1.4. Potencia de la prueba ($1 - \beta$)

Primera comparación:

El error β calculado es $\beta = 0,0008$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 0,08% como lo ilustra la **Figura 54**.

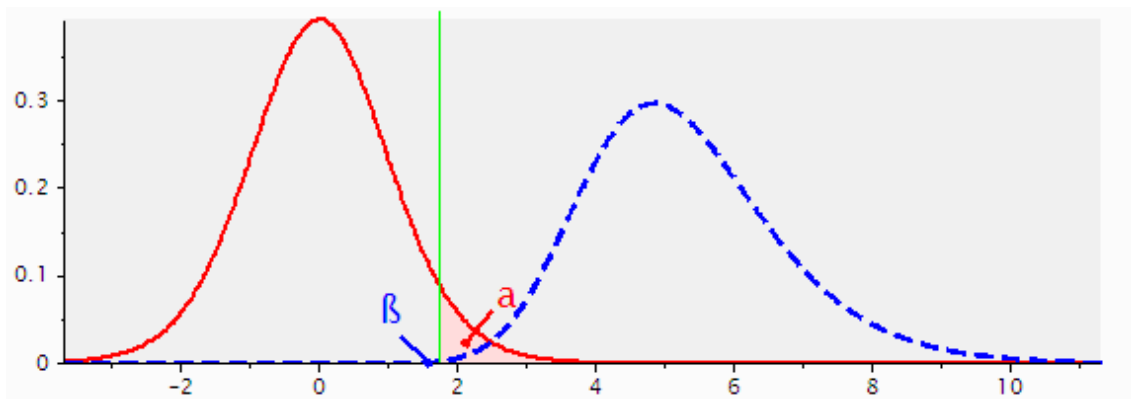


Figura 54. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de IgG entre los grupos 1 y 2).

Segunda comparación:

El error β calculado es $\beta = 0,0001$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 0,01% como lo ilustra la **Figura 55**.

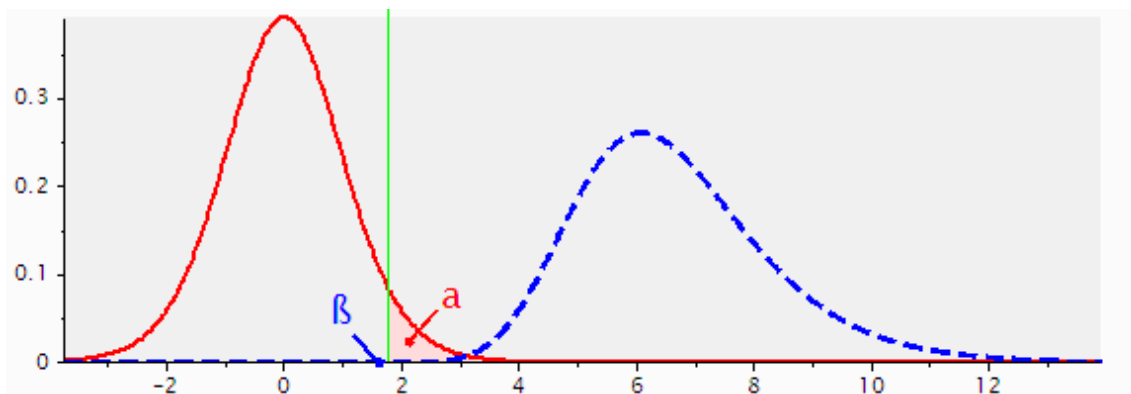


Figura 55. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de IgG entre los grupos 1 y 3).

Tercera comparación:

El error β calculado es $\beta = 0,032$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 3,2% como lo ilustra la **Figura 56** en el área bajo la curva de color azul.

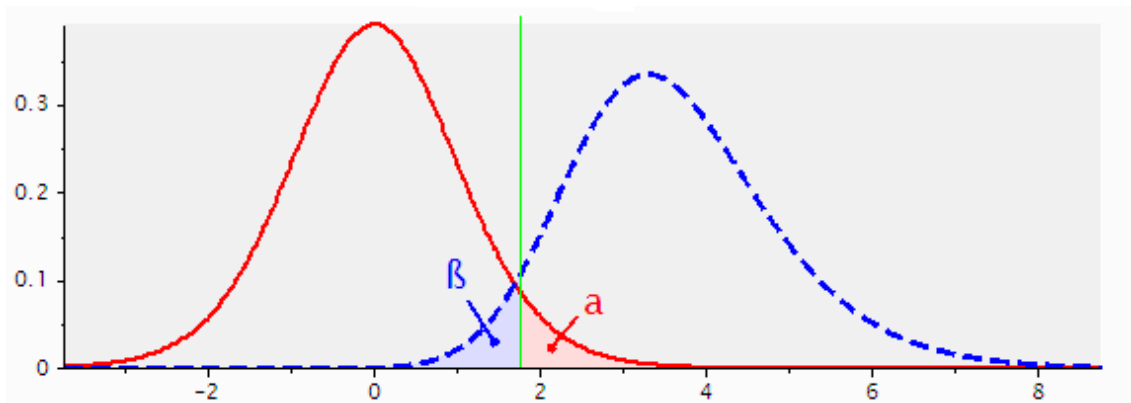


Figura 56. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de IgG entre los grupos 2 y 3).

7.5.1.5. Incremento de inmunoglobulina G.

El análisis estadístico de las medias aritméticas entre los tres grupos reveló que sólo son significativas las medias entre la primera y segunda comparación, esto es, entre el grupo control y el tratado con ácido fúlvico, el grupo control y el grupo tratado con ácido fúlvico más minerales, por lo que se calcula el incremento de inmunoglobulina G entre estos grupos.

1- Incremento de IgG en la primera comparación:

$$\text{Incremento} = \frac{26,6 - 6,4}{6,4}(100) = 315,6\%$$

2- Incremento de IgG en la segunda comparación:

$$\text{Incremento} = \frac{17,7 - 6,4}{6,4}(100) = 171,9\%$$

7.5.2. Análisis estadístico (Concentración de inmunoglobulinas totales)

La **Tabla 27** muestra las concentraciones de inmunoglobulina totales de los tres grupos, así como el cuadrado de cada valor para su análisis estadístico.

Tabla 27. Concentración de inmunoglobulinas totales en los tres grupos y suma de los cuadrados para cada valor

| Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Concentración de X_1 | Concentración de X_2 | Concentración de X_3 | $(X_1)^2$ | $(X_2)^2$ | $(X_3)^2$ |
| 58 | 66 | 66 | 3364 | 4356 | 4356 |
| 62 | 68 | 70 | 3844 | 4624 | 4489 |
| 48 | 66 | 70 | 2304 | 4356 | 4900 |
| 62 | 76 | 62 | 3844 | 5776 | 3844 |
| 54 | 65 | 70 | 2916 | 4225 | 4489 |
| 60 | 76 | 62 | 3600 | 5776 | 3844 |
| 70 | 72 | 70 | 4900 | 5184 | 4900 |
| 72 | 70 | 68 | 5184 | 4900 | 4624 |
| 61 | 68 | | 3721 | 4624 | |
| $\Sigma X_1 = 547$ $n = 9$ | $\Sigma X_2 = 627$ $n = 9$ | $\Sigma X_3 = 532$ $n = 8$ | $\Sigma (X_1)^2 = 33677$ | $\Sigma (X_2)^2 = 43821$ | $\Sigma (X_3)^2 = 35446$ |

7.5.2.1. Análisis de varianza

1- Suma total de cuadrados

$$\Sigma X = 547 + 627 + 532 = 1706$$

$$\Sigma (X_3)^2 = 33677 + 43821 + 35446 = 112944$$

$$\Sigma n = 9 + 9 + 8 = 26$$

$$\sum x_T^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = (112944) - \frac{(1706)^2}{26} = 1004$$

2- Suma de cuadrados entre grupos

$$\sum x_E^2 = \left[\sum \frac{(\sum X)^2}{n} \right] - \frac{(\sum X_T)^2}{N} = \left[\frac{(547)^2}{9} + \frac{(627)^2}{9} + \frac{(532)^2}{8} \right] - \frac{(1706)^2}{26}$$

$$\sum x_E^2 = 364,6$$

3- Suma de cuadrados dentro de los grupos

$$\sum x_D^2 = \sum x_T^2 - \sum x_E^2 = 1004 - 364,6 = 639,5$$

4- Grados de libertad (gl)

d) Entre grupos $(K - 1)$ $K =$ numero de grupos

$$(3 - 1) = 2$$

e) Dentro de los grupos $(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots (n_i - 1)$

$$(9 - 1) + (9 - 1) + (8 + 1) = 23$$

f) Total $(n_1 + n_2 + \dots n_i) - 1$

$$(9 + 9 + 8) - 1 = 25$$

5- Tabulador y resultados

| Origen de la variación | Grados de libertad (gl) | Suma de cuadrados (SC) | Suma de cuadrados medios (SCM) $\frac{SC}{gl}$ | F de Snedecor $\frac{SCM \text{ entre grupos}}{SCM \text{ dentro de grupos}}$ |
|------------------------|-------------------------|------------------------|---|--|
| “Entre” grupos | 2 | 364,6 | $\frac{364,6}{2} = 182,3$ | $\frac{182,3}{27,8} = 6,5$ |
| “Dentro” de los grupos | 23 | 639,6 | $\frac{639,6}{23} = 27,8$ | |
| Total | 25 | | | |

El valor de F_n^m es el mismo que en el caso anterior del análisis estadístico de IgG con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ $F_{23}^2 = 3,42$. Como la F calculada es mayor a la F de tablas ($6,5 > 3,42$) se rechaza la hipótesis nula.

7.5.2.2. Contraste posterior a la F de Snedecor

Como en este caso sí existe una diferencia entre medias (\bar{X}), nuevamente se hacen las tres comparaciones:

- 4- \bar{X} del grupo 1 con \bar{X} del grupo 2
- 5- \bar{X} del grupo 1 con \bar{X} del grupo 3
- 6- \bar{X} del grupo 2 con \bar{X} del grupo 3

Primera comparación:

$$F = \frac{(69,7 - 60,7)^2}{\frac{27,8(9+9)}{(9)(9)}} = 13$$

Segunda comparación:

$$F = \frac{(66,5 - 60,7)^2}{\frac{27,8(9+8)}{(9)(8)}} = 5$$

Tercera comparación:

$$F = \frac{(69,7 - 66,5)^2}{\frac{27,8(9+8)}{(9)(8)}} = 1,5$$

El valor de $F_{23}^2 = 3,42$ se multiplica por los grados de libertad entre grupos ($K - 1$), esto es $3,42(3 - 1) = 6,8$. Al comparar cada una de las tres F calculadas con 6,8 solamente el resultado de la primera comparación es mayor a 6,8 por lo que se rechaza la hipótesis nula, mientras que en la segunda y tercera comparación se acepta la hipótesis nula ya que las F son inferiores al valor de referencia y no existe diferencia significativa entre las medias.

7.5.2.3. Estadística de contraste de las medias muestrales

Primera comparación:

Para el grupo 1 (control)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 33677 - \frac{(547)^2}{9} = 431,5$$

Para el grupo 2 (ácido fúlvico)

$$\sum x_2^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 43821 - \frac{(627)^2}{9} = 140$$

Como $n_1 = n_2$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n(n-1)}}} = \frac{|60,7 - 69,7|}{\sqrt{\frac{431,5 + 140}{9(9-1)}}} = 3,2$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 0,0055 < 0,05$ por lo que se rechaza la hipótesis nula.

Segunda comparación:

Para el grupo 1 (control)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 33677 - \frac{(547)^2}{9} = 431,5$$

Para el grupo 3 (ácido fúlvico más minerales)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 35446 - \frac{(532)^2}{8} = 68$$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}} = \frac{|60,7 - 66,5|}{\sqrt{\frac{431,5 + 68}{9 + 8 - 2} \left(\frac{1}{9} + \frac{1}{8} \right)}}} = 2$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 0,06 > 0,05$ por lo que se acepta la hipótesis nula.

Tercera comparación:

Para el grupo 2 (ácido fúlvico)

$$\sum x_2^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 43821 - \frac{(627)^2}{9} = 140$$

Para el grupo 3 (ácido fúlvico más minerales)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 35446 - \frac{(532)^2}{8} = 68$$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}} = \frac{|69,7 - 66,5|}{\sqrt{\frac{140 + 68}{9 + 8 - 2} \left(\frac{1}{9} + \frac{1}{8} \right)}}} = 1,7$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 0,1 > 0,05$ por lo que se acepta la hipótesis nula.

7.5.2.4. Potencia de la prueba ($1 - \beta$)

Primera comparación:

El error β calculado es $\beta = 0,09$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 9% como lo ilustra la **Figura 57** en el área bajo la curva de color azul.

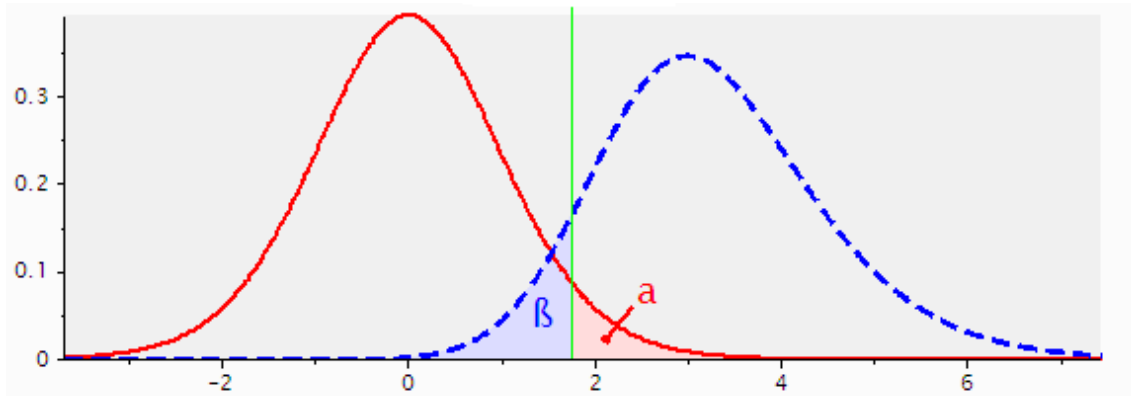


Figura 57. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de inmunoglobulinas totales entre los grupos 1 y 2).

Segunda comparación:

El error β calculado es $\beta = 0,41$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 41% como lo ilustra la **Figura 58** en el área bajo la curva de color azul.

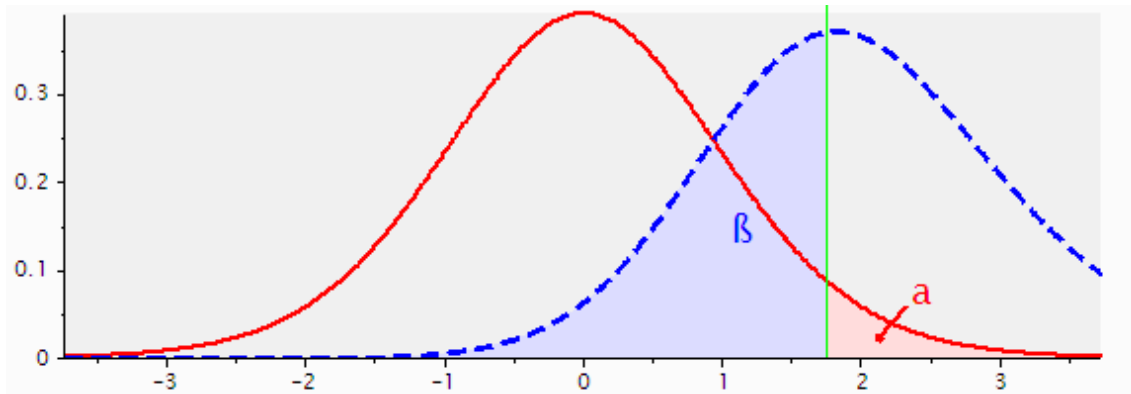


Figura 58. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de inmunoglobulinas totales entre los grupos 1 y 3).

Tercera comparación:

El error β calculado es $\beta = 0,53$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 53% como lo ilustra la **Figura 59** en el área bajo la curva de color azul.

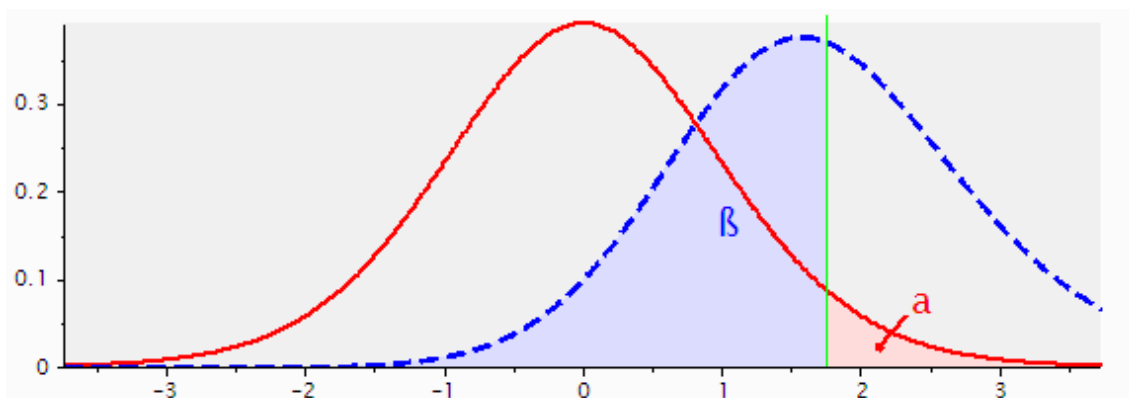


Figura 59. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la concentración de inmunoglobulinas totales entre los grupos 2 y 3).

7.5.2.5. Incremento de inmunoglobulinas totales en ratones.

El análisis estadístico de las medias aritméticas entre los tres grupos dio como resultado solamente una diferencia entre las medias de los grupos 1 (control) y 2 (ácido fúlvico) por lo que solo se calcula el incremento de inmunoglobulinas totales entre estos grupos.

$$\text{Incremento} = \frac{69,6 - 60,7}{60,7} (100) = 15\%$$

7.5.3. Análisis estadístico (masa final en ratones)

Para este análisis, solo se muestra el cálculo de la comparación entre las medias de las masas finales, ya que el cálculo de la comparación entre las medias de las masas iniciales en ambos grupos no fue significativo.

7.5.3.1. Análisis de varianza y contraste posterior a la F de Snedecor

La F calculada en el análisis de varianza fue de 1,7 muy inferior al valor de $F_{23}^2 = 3,42$ de tablas, por lo que se acepta la hipótesis nula y no fue necesario hacer un contraste posterior a la F de Snedecor

7.5.3.2. Estadística de contraste de las medias muestrales

Los valores de t calculados fueron:

- a) Primera comparación: $t = 1,2$ con una probabilidad $p = 0,24 > 0,05$ por lo que se acepta la hipótesis nula.

- b) Segunda comparación: $t = 0,3$ con una probabilidad $p = 0,57 > 0,05$ por lo que se acepta la hipótesis nula.
- c) Tercera comparación: $t = 0,8$ con una probabilidad $p = 0,12 > 0,05$ por lo que se acepta la hipótesis nula.

7.5.3.3. Potencia de la prueba ($1 - \beta$)

Primera comparación:

El error β calculado es $\beta = 0,7$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 70% como lo ilustra la **Figura 60** en el área bajo la curva de color azul.

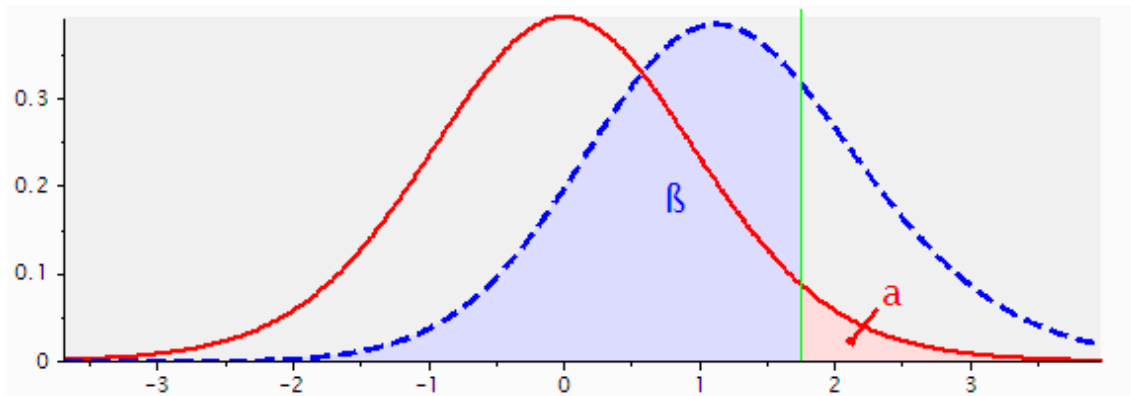


Figura 60. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la masa final entre los grupos 1 y 2).

Segunda comparación:

El error β calculado es $\beta = 0,88$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 88% como lo ilustra la **Figura 61** en el área bajo la curva de color azul.

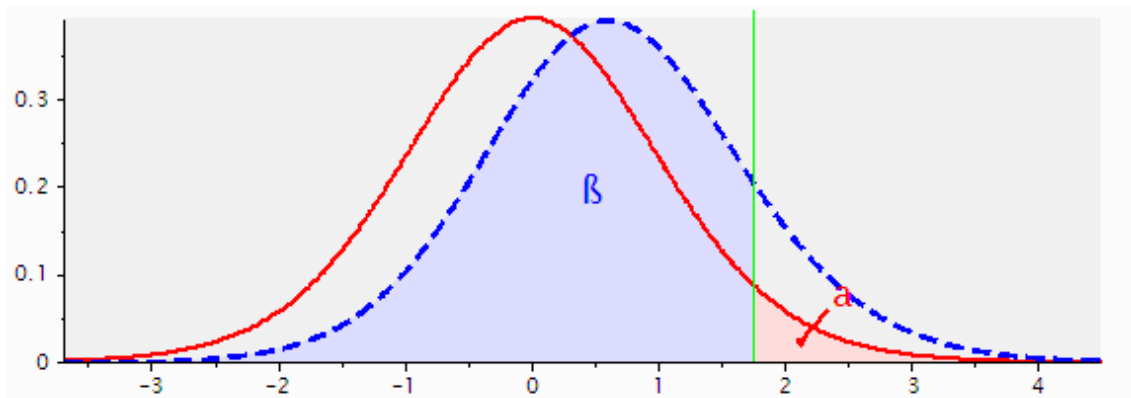


Figura 61. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la masa final entre los grupos 1 y 3).

Tercera comparación:

El error β calculado es $\beta = 0,5$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 50% como lo ilustra la **Figura 62** en el área bajo la curva de color azul.

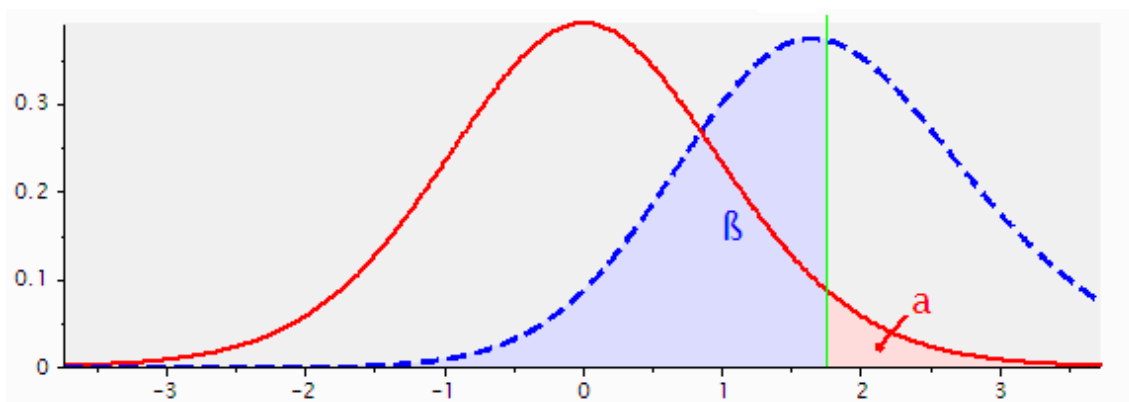


Figura 62. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética en la masa final entre los grupos 2 y 3).

7.5.3.4. Incremento de masa en ratones.

El análisis estadístico de las medias en la masa final, reveló que no hay relación significativa en ninguna de ellas, por lo que sólo se calcula el incremento de masa para cada grupo durante el periodo de ensayo.

Grupo 1

$$\text{Incremento} = \frac{42,8 - 27}{27} (100) = 58,5\%$$

Grupo 2

$$\text{Incremento} = \frac{40,9 - 27,7}{27,7} (100) = 47,6\%$$

Grupo 3

$$\text{Incremento} = \frac{43,5 - 28,4}{28,4} (100) = 53,2\%$$

El aumento de masa es inverso al incremento de anticuerpos. El grupo 1, que fue el que puso de manifiesto los valores más bajos de inmunoglobulinas, es el que incrementó más masa, mientras que el grupo 2 que fue el que consiguió los valores más altos de anticuerpos es el que menos masa logró incrementar.

7.6. Concentración de anticuerpos totales en ratas.

En la **Tabla 28** se dan los resultados de la concentración de inmunoglobulinas totales en las lecturas inicial y final de ambos grupos, en las **Figuras 63** y **64** se muestran los histogramas de la distribución de frecuencias en la concentración de anticuerpos totales para la lectura inicial y final en el grupo 1 (control) y la lectura inicial y final para el grupo 2 (tratado con ácido fúlvico) respectivamente.

Tabla 28. Concentración inicial y final de inmunoglobulinas totales en ratas para los grupos 1 y 2. Dosis de ácido fúlvico 10,2 mg/mL

| Grupo 1 Control | | | Grupo 2 Ácido fúlvico | | |
|------------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|
| | Inicial | Final | | Inicial | Final |
| Muestra | Ig totales (mg/mL) | Ig totales (mg/mL) | Muestra | Ig totales (mg/mL) | Ig totales (mg/mL) |
| 1 | 66 | 68 | 11 | 70 | 70 |
| 2 | 70 | 69 | 12 | 65 | 70 |
| 3 | 66 | 63 | 13 | 68 | 68 |
| 4 | 64 | 67 | 14 | 62 | 70 |
| 5 | 60 | 64 | 15 | 68 | 68 |
| 6 | 64 | 66 | 16 | 60 | 69 |
| 7 | 66 | 70 | 17 | 62 | 72 |
| 8 | 68 | 70 | 18 | 64 | 72 |
| 9 | 70 | 68 | 19 | 62 | 71 |
| 10 | 66 | 70 | 20 | 62 | 70 |
| MA | 66 ± 2,13 | 67,5 ± 1,79 | MA | 64,3 ± 2,38 | 70 ± 1,01 |
| DE | 2,98 | 2,5 | DE | 3,3 | 1,4 |

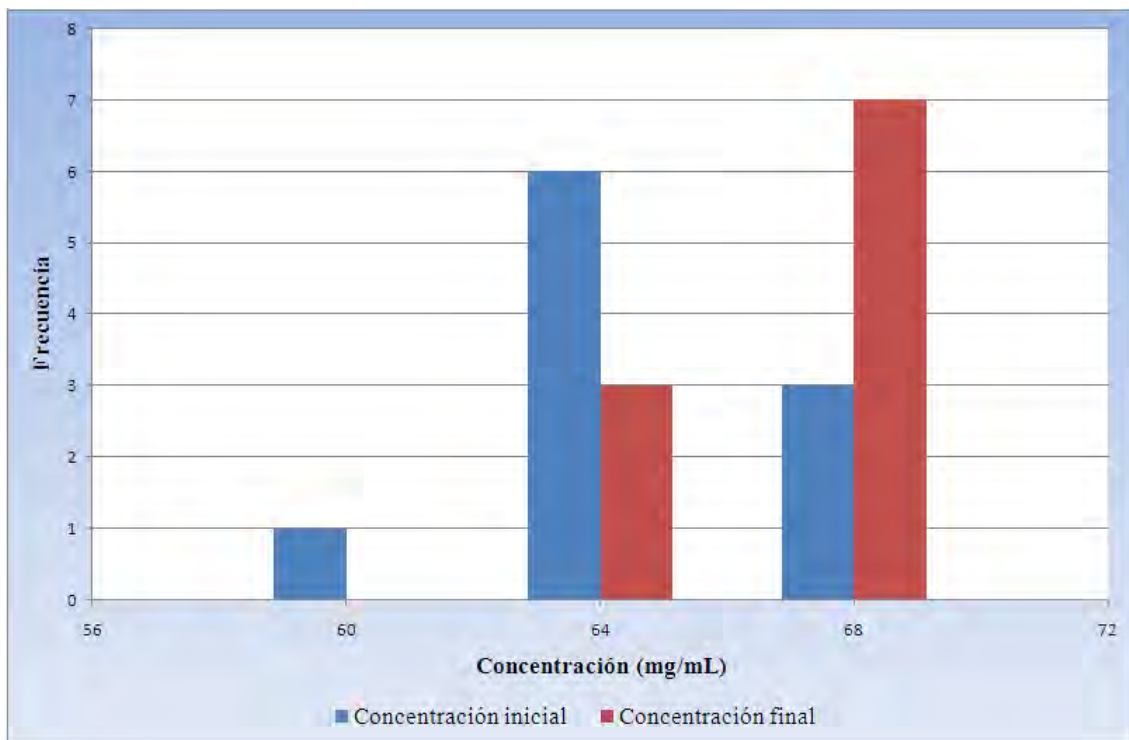


Figura 63. Histograma para la concentración de inmunoglobulinas totales en las lecturas inicial y final (grupo 1).

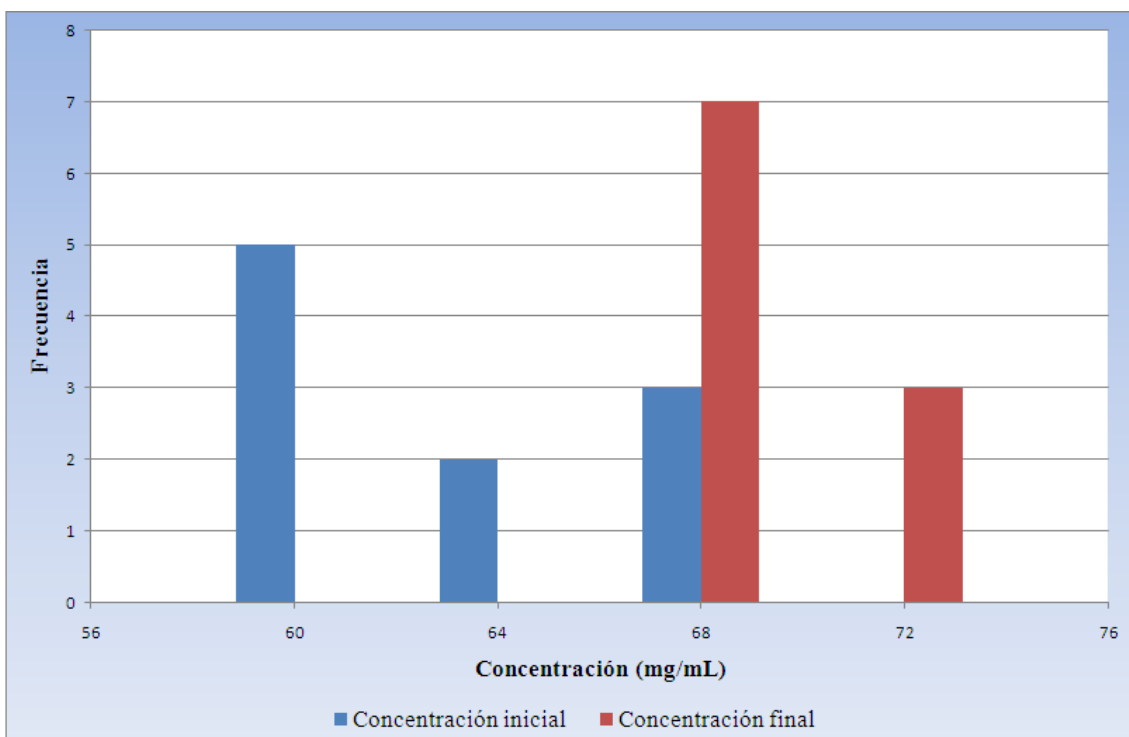


Figura 64. Histograma para la concentración de inmunoglobulinas totales en las lecturas inicial y final (grupo 2).

En la **Tabla 29** se presentan los valores de la masa inicial y final de las ratas tomados durante el periodo de ensayo. Las **Figuras 65** y **66** muestran los histogramas de la distribución de frecuencias para la masa inicial en ambos grupos y la masa final también en ambos grupos respectivamente.

Tabla 29. Masa inicial y final de las ratas para ambos grupos. Dosis de ácido fúlvico

| Grupo 1 | | | Grupo 2 | | |
|----------------|---------------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------------|
| | Inicial | Final | | Inicial | Final |
| Muestra | masa (g) | masa (g) | Muestra | masa (g) | masa (g) |
| 1 | 303 | 400 | 11 | 311 | 400 |
| 2 | 324 | 409 | 12 | 305 | 396 |
| 3 | 310 | 424 | 13 | 305 | 411 |
| 4 | 307 | 396 | 14 | 302 | 377 |
| 5 | 301 | 409 | 15 | 315 | 382 |
| 6 | 312 | 468 | 16 | 312 | 414 |
| 7 | 280 | 396 | 17 | 311 | 379 |
| 8 | 316 | 463 | 18 | 302 | 405 |
| 9 | 323 | 416 | 19 | 303 | 379 |
| 10 | 325 | 431 | 20 | 313 | 374 |
| MA | 309,9 ± 9,58 | 421,2 ± 18,6 | MA | 307,9 ± 3,56 | 391,7 ± 10,87 |
| DE | 13,4 | 26 | DE | 4,97 | 15,2 |

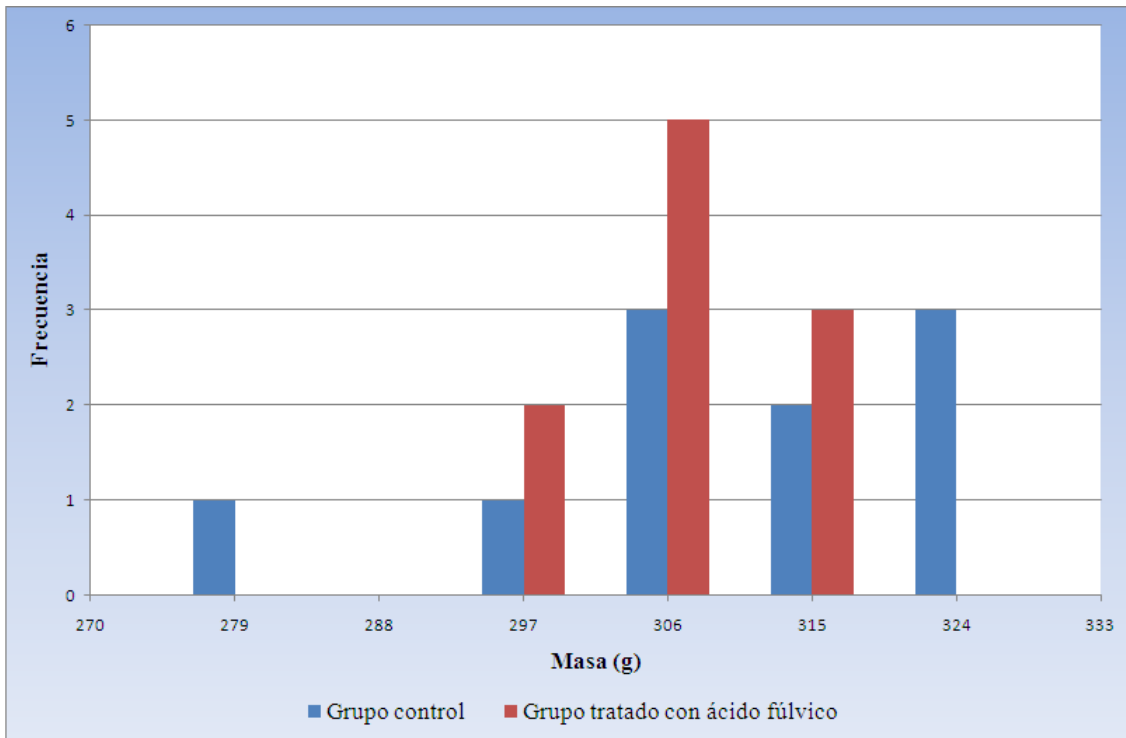


Figura 65. Histograma para la distribución de frecuencias de la masa inicial en ambos grupos.

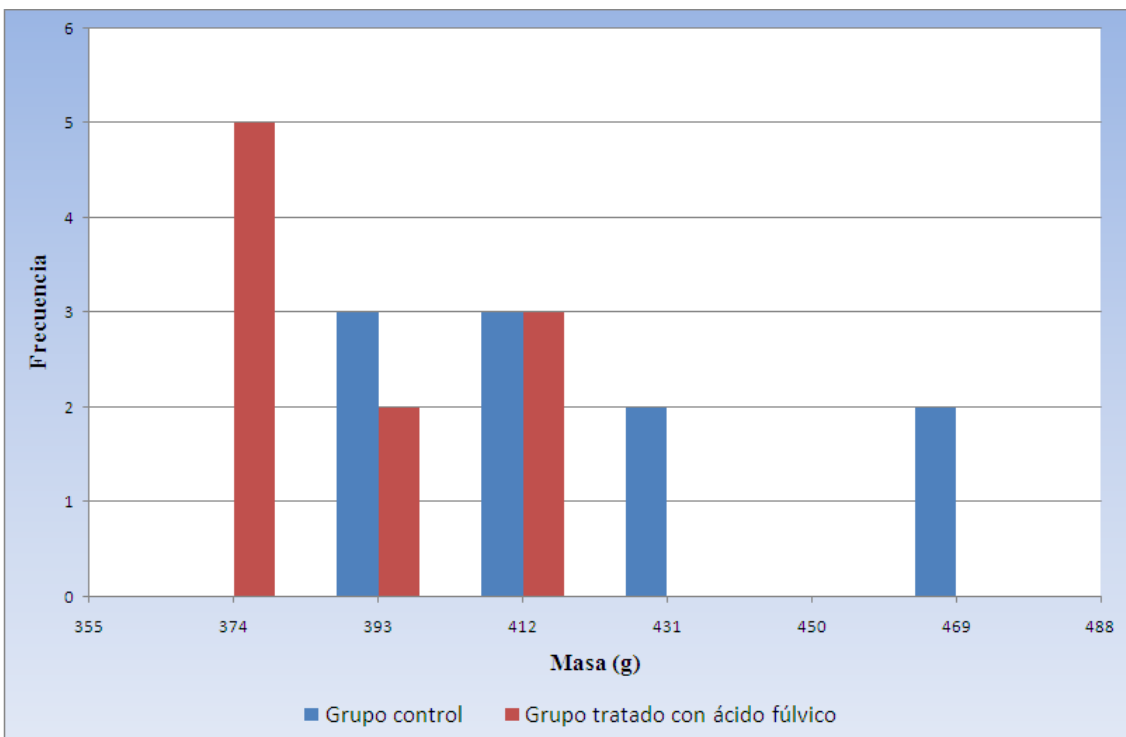


Figura 66. Histograma para la distribución de frecuencias de la masa final en ambos grupos.

7.6.1. Análisis estadístico (concentración de inmunoglobulinas totales)

La estadística se realizó de dos maneras:

- 1- Se hizo una *comparación de las medias dentro de los grupos*, para datos correlacionados, es decir, se comparó la media inicial con la media final para cada grupo.
- 2- Se hizo una *comparación de las medias entre los grupos*, para datos no correlacionados, es decir, la media inicial del grupo 1 comparada con la media inicial del grupo 2, luego, la media final del grupo 1 comparada con la media final del grupo 2.

Ya que el análisis de varianza (prueba de Levene) solo se puede llevar a cabo para la comparación de varianzas de datos no correlacionados, el estadígrafo F no se realizó en datos correlacionados.

7.6.1.1. Comparación de las medias dentro de los grupos.

La **Tabla 30** muestra la concentración inicial y final de inmunoglobulina totales en ambos grupos, así como el cuadrado de cada valor para su análisis estadístico.

Tabla 30. Concentración inicial y final de inmunoglobulinas totales en ambos grupos y suma de cuadrados para cada valor

| Grupo 1 | | | | Grupo 2 | | | |
|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| C inicial X_1 | C final X_2 | $(X_1)^2$ | $(X_2)^2$ | C inicial X_1 | C final X_2 | $(X_1)^2$ | $(X_2)^2$ |
| 66 | 68 | 4356 | 4624 | 70 | 70 | 4900 | 4900 |
| 70 | 69 | 4900 | 4761 | 65 | 70 | 4225 | 4900 |
| 66 | 63 | 4356 | 3969 | 68 | 68 | 4624 | 4624 |
| 64 | 67 | 4096 | 4489 | 62 | 70 | 3844 | 4900 |
| 60 | 64 | 3600 | 4096 | 68 | 68 | 4624 | 4624 |
| 64 | 66 | 4096 | 4356 | 60 | 69 | 3600 | 4761 |
| 66 | 70 | 4356 | 4900 | 62 | 72 | 3844 | 5184 |
| 68 | 70 | 4624 | 4900 | 64 | 72 | 4096 | 5184 |
| 70 | 68 | 4900 | 4624 | 62 | 71 | 3844 | 5041 |
| 66 | 70 | 4356 | 4900 | 62 | 70 | 3844 | 4900 |
| $\Sigma X_1 =$ 660 n = 10 | $\Sigma X_2 =$ 675 n = 10 | $\Sigma (X_1)^2 =$ 43640 | $\Sigma (X_2)^2 =$ 45619 | $\Sigma X_1 =$ 643 n = 10 | $\Sigma X_2 =$ 700 n = 10 | $\Sigma (X_1)^2 =$ 41445 | $\Sigma (X_2)^2 =$ 49018 |

7.6.1.1.1. Estadística de contraste de medias muestrales

Grupo 1

Coefficiente de correlación

$$r = \frac{n \sum X_1 X_2 - (\sum X_1)(\sum X_2)}{\sqrt{[n(\sum X_1^2) - (\sum X_1)^2][n(\sum X_2^2) - (\sum X_2)^2]}}$$
$$r = \frac{(10)(44588) - (660)(675)}{\sqrt{[10(43640) - (660)^2][10(45619) - (675)^2]}} = 0,56$$

a) Para la concentración inicial.

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 43640 - \frac{(660)^2}{10} = 80$$

Desviación típica de cada distribución S

$$S_{X1} = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}} = \sqrt{\frac{80}{10}} = 2,8$$

Error típico de cada media

$$S_{\bar{X}} = \frac{S}{\sqrt{n-1}} = \frac{2,8}{\sqrt{10-9}} = 0,94$$

b) Para la concentración final.

$$\sum x_2^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 45619 - \frac{(675)^2}{10} = 56,5$$

Desviación típica de cada distribución S

$$S_{X1} = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}} = \sqrt{\frac{56,5}{10}} = 2,4$$

Error típico de cada media $S_{\bar{X}}$

$$S_{\bar{X}} = \frac{S}{\sqrt{n-1}} = \frac{2,4}{\sqrt{10-9}} = 0,8$$

Error típico de la diferencia de medias $S_{D\bar{X}}$

$$S_{D\bar{X}} = \sqrt{S_{\bar{X}1}^2 + S_{\bar{X}2}^2 - 2(r)(S_{\bar{X}1})(S_{\bar{X}2})} = \sqrt{(0,94)^2 + (0,8)^2 - 2(0,56)(0,94)(0,8)}$$

$$S_{D\bar{X}} = 0,82$$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{S_{D\bar{X}}} = \frac{|66 - 67,5|}{0,82} = 1,83$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 0,1 > 0,05$ por lo que se acepta la hipótesis nula.

Grupo2

Coefficiente de correlación

$$r = \frac{n \sum X_1 X_2 - (\sum X_1)(\sum X_2)}{\sqrt{[n(\sum X_1^2) - (\sum X_1)^2][n(\sum X_2^2) - (\sum X_2)^2]}}$$

$$r = \frac{(10)(44992) - (643)(700)}{\sqrt{[10(41445) - (643)^2][10(49018) - (700)^2]}} = -0,42$$

a) Concentración inicial.

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 41445 - \frac{(643)^2}{10} = 100$$

Desviación típica de cada distribución S

$$S_{X1} = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}} = \sqrt{\frac{100}{10}} = 3,2$$

Error típico de cada media

$$S_{\bar{X}} = \frac{S}{\sqrt{n-1}} = \frac{3,2}{\sqrt{10-9}} = 1$$

b) Concentración final.

$$\sum x_2^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 49018 - \frac{(700)^2}{10} = 18$$

Desviación típica de cada distribución S

$$S_{X1} = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}} = \sqrt{\frac{18}{10}} = 1,3$$

Error típico de cada media $S_{\bar{X}}$

$$S_{\bar{X}} = \frac{S}{\sqrt{n-1}} = \frac{1,3}{\sqrt{10-9}} = 0,4$$

Error típico de la diferencia de medias $S_{D\bar{X}}$

$$S_{D\bar{X}} = \sqrt{S_{\bar{X}_1}^2 + S_{\bar{X}_2}^2 - 2(r)(S_{\bar{X}_1})(S_{\bar{X}_2})} = \sqrt{(1)^2 + (0,4)^2 - 2(-0,42)(1)(0,4)}$$

$$S_{D\bar{X}} = 1,23$$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{S_{D\bar{X}}} = \frac{|64,2 - 7|}{1,23} = 4,7$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 0,001 < 0,05$ por lo que se rechaza la hipótesis nula.

7.6.1.1.2. Potencia de la prueba ($1 - \beta$)

Grupo 1.

El error β calculado es $\beta = 0,48$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 48% como lo ilustra la **Figura 67** en el área bajo la curva de color azul.

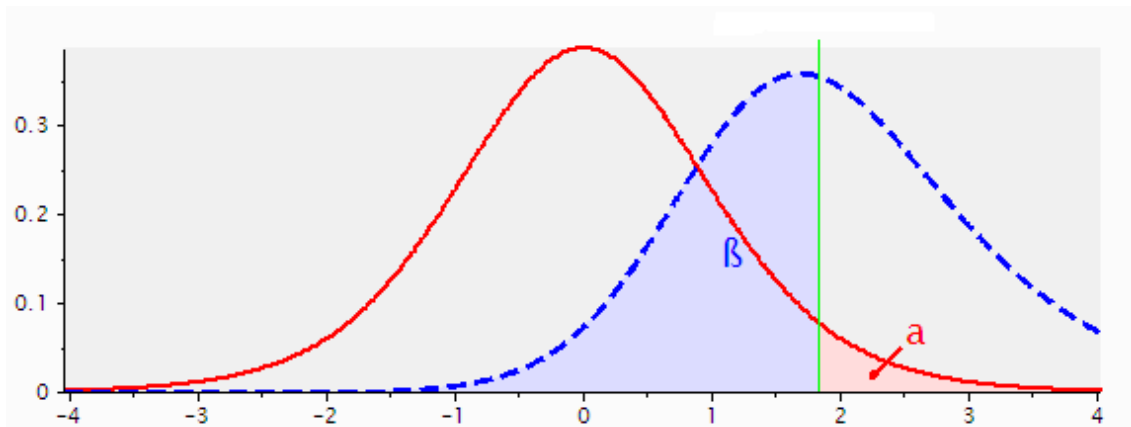


Figura 67. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética de la concentración inicial y final de anticuerpos totales para el grupo 1).

Grupo 2.

El error β calculado es $\beta = 0,009$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 0,9% como lo ilustra la **Figura 68**.

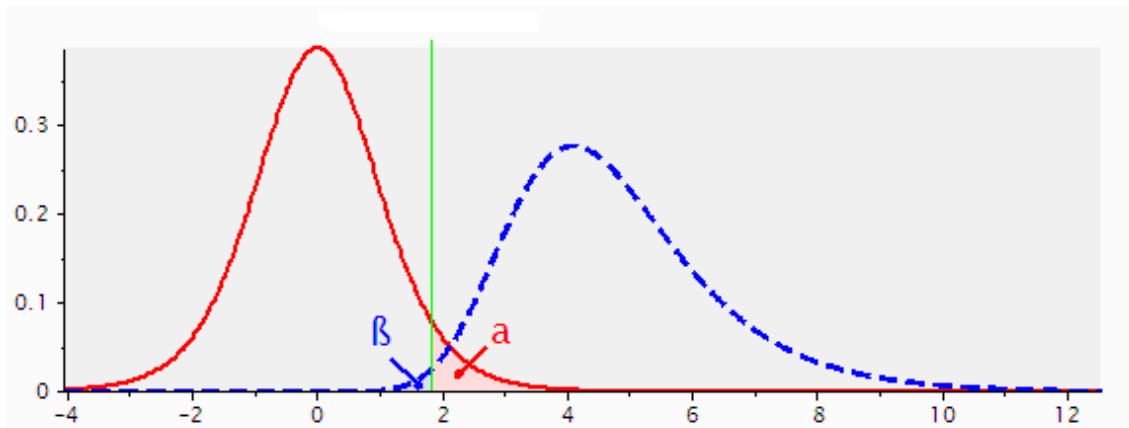


Figura 68. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética de la concentración inicial y final de anticuerpos totales para el grupo 2).

7.6.1.2. Comparación de las medias entre los grupos.

7.6.1.2.1. Análisis de varianza

Comparación entre la concentración inicial de anticuerpo en ambos grupos

1- Suma total de cuadrados

$$\sum x_T^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = (43640 + 41445) - \frac{(660 + 643)^2}{10 + 10} = 194,5$$

2- Suma de cuadrados entre grupos

$$\sum x_E^2 = \left[\sum \frac{(\sum X)^2}{n} \right] - \frac{(\sum X_T)^2}{N} = \left[\frac{(660)^2}{10} + \frac{(643)^2}{10} \right] - \frac{(660 + 643)^2}{20} = 14,4$$

3- Suma de cuadrados dentro de los grupos

$$\sum x_D^2 = \sum x_T^2 - \sum x_E^2 = 194,5 - 14,4 = 180$$

4- Grados de libertad (gl)

a) Entre grupos $(K - 1)$ $K =$ numero de grupos

$$(2 - 1) = 1$$

b) Dentro de los grupos $(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots (n_i - 1)$

$$(10 - 1) + (10 - 1) = 18$$

c) Total $(n_1 + n_2 + \dots n_i) - 1$

$$(10 + 10) - 1 = 19$$

5- Tabulador y resultados

| Origen de la variación | Grados de libertad (gl) | Suma de cuadrados (SC) | Suma de cuadrados medios (SCM) $\frac{SC}{gl}$ | F de Snedecor $\frac{SCM \text{ entre grupos}}{SCM \text{ dentro de grupos}}$ |
|------------------------|-------------------------|------------------------|---|--|
| “Entre” grupos | 1 | 14,4 | 14,4 | $\frac{14,4}{10} = 1,4$ |
| “Dentro” de los grupos | 18 | 180 | $\frac{180}{18} = 10$ | |
| Total | 19 | | | |

Como la F calculada es menor a la F de tablas ($F_{18}^1 = 4,41$) esto es $1,4 < 4,4$ se acepta la hipótesis nula. La probabilidad asociada al análisis de varianza es de $p = 0,74 > 0,05$ por lo que también se acepta la hipótesis nula.

Comparación entre la concentración final de anticuerpo en ambos grupos

1- Suma total de cuadrados

$$\sum x_T^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = (45619 + 49018) - \frac{(675 + 700)^2}{10 + 10} = 105,7$$

2- Suma de cuadrados entre grupos

$$\sum x_E^2 = \left[\sum \frac{(\sum X)^2}{n} \right] - \frac{(\sum X_T)^2}{N} = \left[\frac{(675)^2}{10} + \frac{(700)^2}{10} \right] - \frac{(675 + 700)^2}{20} = 31,2$$

3- Suma de cuadrados dentro de los grupos

$$\sum x_D^2 = \sum x_T^2 - \sum x_E^2 = 105,7 - 31,2 = 74,5$$

4- Grados de libertad (gl)

a) Entre grupos $(K - 1)$ $K =$ numero de grupos $(2 - 1) = 1$

b) Dentro de los grupos $(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots (n_i - 1)$

$$(10 - 1) + (10 - 1) = 18$$

c) Total $(n_1 + n_2 + \dots n_i) - 1$

$$(10 + 10) - 1 = 19$$

5- Tabulador y resultados

Como la F calculada es mayor a la F de tablas ($F_{18}^1 = 4,41$) esto es $7,5 > 4,4$ se rechaza la hipótesis nula. La probabilidad asociada al análisis de varianza es de $p = 0,01 < 0,05$ por lo que también se rechaza la hipótesis nula.

| Origen de la variación | Grados de libertad (gl) | Suma de cuadrados (SC) | Suma de cuadrados medios (SCM) $\frac{SC}{gl}$ | F de Snedecor $\frac{SCM \text{ entre grupos}}{SCM \text{ dentro de grupos}}$ |
|------------------------|-------------------------|------------------------|---|--|
| “Entre” grupos | 1 | 31,2 | 31,2 | $\frac{31,2}{4,14} = 7,5$ |
| “Dentro” de los grupos | 18 | 74,5 | $\frac{74,5}{18} = 4,14$ | |
| Total | 19 | | | |

7.6.1.2.2. Estadística de contraste de las medias muestrales

Comparación entre la concentración inicial de anticuerpos totales en ambos grupos

Para el grupo 1 (control)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 43640 - \frac{(660)^2}{10} = 80$$

Para el grupo 2 (ácido fúlvico)

$$\sum x_2^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 41445 - \frac{(643)^2}{10} = 100$$

Como $n_1 = n_2$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n(n-1)}}} = \frac{|66 - 64,3|}{\sqrt{\frac{80 + 100}{10(10-1)}}} = 1,2$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 0,246 > 0,05$ por lo que se acepta la hipótesis nula.

Comparación entre la concentración final de anticuerpos totales en ambos grupos

Para el grupo 1 (control)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 45619 - \frac{(675)^2}{10} = 56,5$$

Para el grupo 2 (ácido fúlvico)

$$\sum x_2^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 49018 - \frac{(700)^2}{10} = 18$$

Como $n_1 = n_2$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n(n-1)}}} = \frac{|67,5 - 70|}{\sqrt{\frac{56,5 + 18}{10(10-1)}}} = 2,7$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 0,014 > 0,05$ por lo que se rechaza la hipótesis nula.

7.6.1.2.3. Potencia de la prueba ($1 - \beta$)

Comparación entre la concentración inicial de anticuerpos totales en ambos grupos

El error β calculado es $\beta = 0,68$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 68% como lo ilustra la **Figura 69** en el área bajo la curva de color azul.

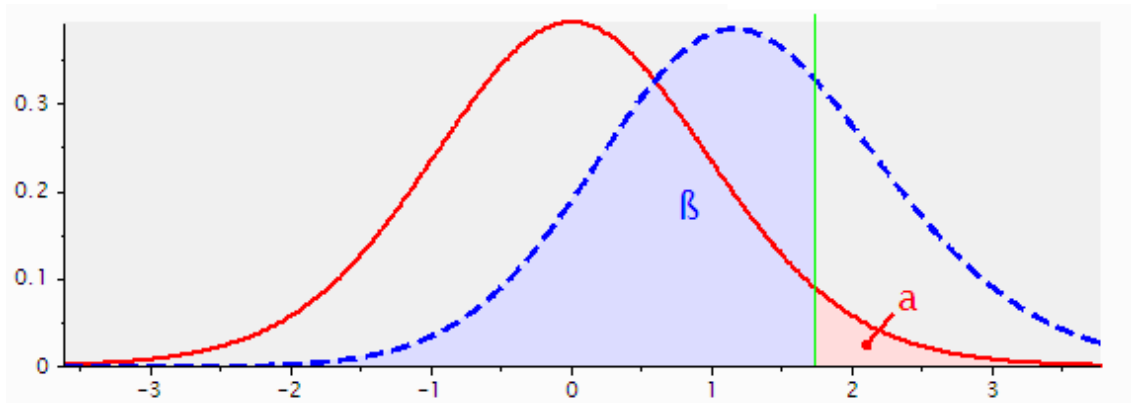


Figura 69. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética entre la concentración inicial anticuerpos totales en ambos grupos).

Comparación entre la concentración final de anticuerpos totales en ambos grupos

El error β calculado es $\beta = 0,15$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 15% como lo ilustra la **Figura 70** en el área bajo la curva de color azul.

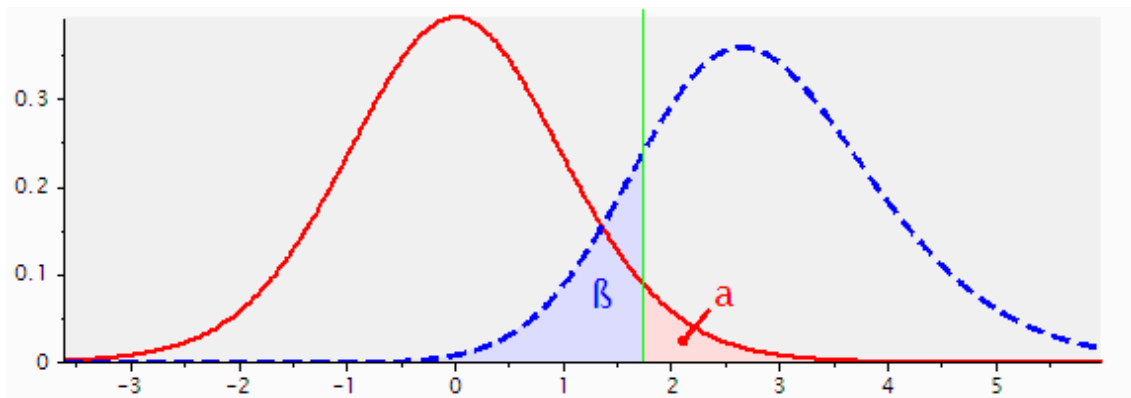


Figura 70. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética entre la concentración final anticuerpos totales en ambos grupos).

7.6.1.3. Incremento de inmunoglobulinas totales en ratas.

Comparación de las medias dentro de los grupos

De ésta comparación, sólo las medias (inicial y final) del grupo 2 (ácido fúlvico) fueron significativamente diferentes, por lo que se puede afirmar que el ácido fúlvico incremento el título de anticuerpos totales, como se muestra:

$$\text{Incremento} = \frac{70 - 64,3}{64,3} (100) = 8,9\%$$

Comparación de las medias entre los grupos

Para ésta comparación, solo la calculada en la concentración final en ambos grupos fue diferente y el incremento de anticuerpos del grupo 2 con respecto al grupo 1 fue de:

$$\text{Incremento} = \frac{70 - 67,5}{67,5} (100) = 3,7\%$$

7.6.2. Análisis estadístico (masa final en ratas)

Para éste análisis, sólo se muestra la estadística en la comparación entre las medias de las masas finales, ya que el cálculo de la comparación entre las medias de las masas iniciales en ambos grupos no fue significativo (*comparación de las medias entre los grupos*). Cabe mencionar que en éste estudio, no se realizó una *comparación de las medias dentro de los grupos* en datos correlacionados, ya que hay una gran diferencia entre la media aritmética de la masa inicial con respecto a la de la masa final, debido al incremento de masa en los animales durante el periodo de ensayo. La **Tabla 31** muestra la masa final de ambos grupos, así como el cuadrado de cada valor para su análisis estadístico.

Tabla 31. Masa final de ratas en ambos grupos y suma de cuadrados para cada valor

| Grupo 1 X ₁ | Grupo 2 X ₂ | Grupo 1 | Grupo 2 |
|---|---|---|---|
| Masa final (g) | Masa final (g) | (X ₁) ² | (X ₂) ² |
| 400 | 400 | 160000 | 160000 |
| 409 | 396 | 167281 | 156816 |
| 424 | 411 | 179776 | 168921 |
| 396 | 377 | 156816 | 142129 |
| 409 | 382 | 167281 | 145924 |
| 468 | 414 | 219024 | 171396 |
| 396 | 379 | 156816 | 143641 |
| 463 | 405 | 214369 | 164025 |
| 416 | 379 | 173056 | 143641 |
| 431 | 374 | 185761 | 139876 |
| ΣX₁ = 4212 n = 10 | ΣX₂ = 3917 n = 10 | Σ(X₁)² = 1780180 | Σ(X₂)² = 1536369 |

7.6.2.1. Análisis de varianza

Comparación entre la masa final en ambos grupos

1- Suma total de cuadrados

$$\sum x_T^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = (1780180 + 1536369) - \frac{(4212 + 3917)^2}{10 + 10} = 12517$$

2- Suma de cuadrados entre grupos

$$\sum x_E^2 = \left[\sum \frac{(\sum X)^2}{n} \right] - \frac{(\sum X_T)^2}{N} = \left[\frac{(4212)^2}{10} + \frac{(3917)^2}{10} \right] - \frac{(8129)^2}{20} = 4351,2$$

3- Suma de cuadrados dentro de los grupos

$$\sum x_D^2 = \sum x_T^2 - \sum x_E^2 = 12517 - 4351,2 = 8165,7$$

4- Grados de libertad (gl)

- a) Entre grupos $(K - 1)$ $K =$ numero de grupos
 $(2 - 1) = 1$
- b) Dentro de los grupos $(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots (n_i - 1)$
 $(10 - 1) + (10 - 1) = 18$
- c) Total $(n_1 + n_2 + \dots n_i) - 1$
 $(10 + 10) - 1 = 19$

5- Tabulador y resultados

| Origen de la variación | Grados de libertad (gl) | Suma de cuadrados (SC) | Suma de cuadrados medios (SCM) $\frac{SC}{gl}$ | F de Snedecor $\frac{SCM \text{ entre grupos}}{SCM \text{ dentro de grupos}}$ |
|------------------------|-------------------------|------------------------|---|--|
| “Entre” grupos | 1 | 4351,2 | 4351,2 | $\frac{4351,2}{453,6} = 9,6$ |
| “Dentro” de los grupos | 18 | 8165,7 | $\frac{8165,7}{18} = 453,6$ | |
| Total | 19 | | | |

Como la F calculada es mayor a la F de tablas ($F_{18}^1 = 4,41$) esto es $9,6 > 4,5$ se rechaza la hipótesis nula. La probabilidad asociada al análisis de varianza es de $p = 0,0062 < 0,05$ por lo que también se rechaza la hipótesis nula.

7.6.2.2. Estadística de contraste de las medias muestrales

Comparación entre la masa final en ambos grupos

Para el grupo 1 (control)

$$\sum x_1^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 1780180 - \frac{(4212)^2}{10} = 6085,6$$

Para el grupo 2 (ácido fúlvico)

$$\sum x_2^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} = 1536369 - \frac{(3917)^2}{10} = 2080$$

Como $n_1 = n_2$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n(n-1)}}} = \frac{|421,2 - 391,7|}{\sqrt{\frac{6085,6 + 2080}{10(10-1)}}} = 3,1$$

La probabilidad asociada al resultado de contraste de medias muestrales es $p = 0,006 > 0,05$ por lo que se rechaza la hipótesis nula.

7.6.2.3. Potencia de la prueba ($1 - \beta$)

Comparación entre la masa final en ambos grupos

El error β calculado es $\beta = 0,09$ por lo que la probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada es del 9% como lo ilustra la **Figura 71** en el área bajo la curva de color azul.

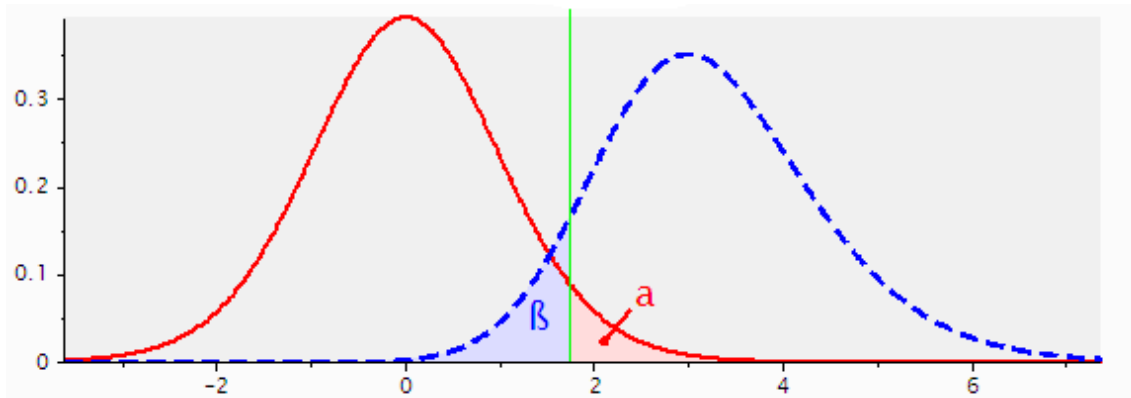


Figura 71. Distribución de probabilidades para los errores α y β (comparación de media aritmética entre la masa final en ambos grupos).

7.6.2.4. Incremento de masa en ratas.

Los resultados de éste análisis revelan que si hay diferencias entre la media aritmética de la masa final de ambos grupos (comparación entre grupos), por lo que el incremento de masa del grupo 1 con respecto del grupo 2 fue:

$$\text{Incremento} = \frac{421,2 - 391,7}{391,7} (100) = 7,5\%$$

Mientras que el incremento de masa dentro de los grupos en el periodo de ensayo fue:

Grupo 1

$$\text{Incremento} = \frac{421,2 - 310}{310} (100) = 35,9\%$$

Grupo 2

$$\text{Incremento} = \frac{391,7 - 308}{308} (100) = 27,2\%$$

Nuevamente, al igual que con los ratones, el incremento en el título de anticuerpos es inversamente proporcional al incremento de masa para los grupos tratados con ácido fúlvico.

7.6.3. Dosis de ácido fúlvico ingerido por día en ratas.

La dosis de ácido fúlvico que bebió aproximadamente el grupo de prueba fue de 440 mL por cada 2,56 días, esto es 172 mL/día, por lo que la cantidad de ácido ingerida por día por cada gramo (masa de rata) es:

$$\left(\frac{172\text{mL}}{\text{día}}\right)\left(\frac{1}{5\text{ratas}}\right)\left(\frac{10,2\text{mg de AF}}{\text{mL}}\right)\left(\frac{1\text{rata}}{420\text{g}}\right) = \frac{0,835\text{mg de AF}}{\text{g} * \text{día}}$$

7.7. Resumen de resultados.

7.7.1. Resultados estadísticos

7.7.1.1. Resumen del segundo ensayo en ratones.

El resumen de los resultados obtenidos del análisis estadístico de las muestras se presenta en la **Tabla 32**.

Tabla 32. Resumen de resultados para el segundo ensayo en ratones.

| Parámetro | Estadígrafo F | Probabilidad p | Estadígrafo t | Probabilidad p | Probabilidad β de aceptar H_0 |
|------------|---------------|------------------|---------------|------------------|---------------------------------------|
| IgG | 0,03 | 0,62 | 0,17 | 0,86 | 0,9 |
| | Acepto H_0 | Acepto H_0 | Acepto H_0 | Acepto H_0 | |
| Ig totales | 1,6 | 0,74 | 1,3 | 0,22 | 0,18 |
| | Acepto H_0 | Acepto H_0 | Acepto H_0 | Acepto H_0 | |
| Masa | 1,01 | 0,43 | 1 | 0,33 | 0,28 |
| | Acepto H_0 | Acepto H_0 | Acepto H_0 | Acepto H_0 | |

7.7.1.2. Resumen del tercer ensayo en ratones.

El resumen de los resultados obtenidos del análisis estadístico de las muestras se presenta en la **Tabla 33**.

Tabla 33. Resumen de resultados para el tercer ensayo en ratones.

| Parámetro | Estadígrafo F | Probabilidad p | Estadígrafo t | Probabilidad p | Probabilidad β de aceptar H_0 |
|------------|---------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------------------------------|
| IgG | 56,9 | $2,7 \times 10^{-6}$ | 7,6 | $2,5 \times 10^{-6}$ | 0,00001 |
| | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | |
| Ig totales | 82,5 | 3×10^{-7} | 9,1 | $2,9 \times 10^{-7}$ | 0,00001 |
| | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | |
| Masa | 81,8 | $3,2 \times 10^{-7}$ | 9,1 | 3×10^{-7} | 0,00001 |
| | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | |

7.7.1.3. Resumen del cuarto ensayo en ratones

El resumen de los resultados obtenidos del análisis estadístico de las muestras se presenta en la **Tabla 34**.

Tabla 34. Resumen de resultados para el tercer ensayo en ratones.

| Parámetro | Comparación | Estadígrafo F | Probabilidad <i>p</i> | Estadígrafo t | Probabilidad <i>p</i> | Probabilidad β de aceptar Ho |
|------------|-------------|---------------|-----------------------|---------------|-----------------------|------------------------------------|
| IgG | | 12,2 | 0,00024 | | | |
| | | Rechazo Ho | Rechazo Ho | | | |
| | Primera | 24,3 | 0,00011 | 5 | 0,00013 | 0,0008 |
| | | Rechazo Ho | Rechazo Ho | Rechazo Ho | Rechazo Ho | |
| | Segunda | 7,1 | 0,0049 | 3,3 | 0,0052 | 0,0001 |
| | | Rechazo Ho | Rechazo Ho | Rechazo Ho | Rechazo Ho | |
| | Tercera | 4,4 | 0,093 | 1,8 | 0,094 | 0,032 |
| | | Acepto Ho | Acepto Ho | Acepto Ho | Acepto Ho | |
| Ig totales | | 6,5 | 0,0055 | | | |
| | | Rechazo Ho | Rechazo Ho | | | |
| | Primera | 13 | 0,0061 | 3,2 | 0,0055 | 0,09 |
| | | Rechazo Ho | Rechazo Ho | Rechazo Ho | Rechazo Ho | |
| | Segunda | 5 | 0,06 | 2 | 0,06 | 0,41 |
| | | Acepto Ho | Acepto Ho | Acepto Ho | Acepto Ho | |
| | Tercera | 1,5 | 0,1 | 1,7 | 0,1 | 0,53 |
| | | Acepto Ho | Acepto Ho | Acepto Ho | Acepto Ho | |
| Masa | | 1,762 | 0,194 | | | |
| | | Acepto Ho | Acepto Ho | | | |
| | Primera | | | 1,2 | 0,26 | 0,7 |
| | | | | Acepto Ho | Acepto Ho | |
| | Segunda | | | 0,3 | 0,57 | 0,88 |
| | | | | Acepto Ho | Acepto Ho | |
| | Tercera | | | 0,8 | 0,12 | 0,5 |
| | | | | Acepto Ho | Acepto Ho | |

Comparaciones:

- a) *Primera*: Grupo control con grupo tratado con ácido fúlvico (grupo 1 con grupo 2)
- b) *Segunda*: Grupo control con grupo tratado con ácido fúlvico más minerales (grupo 1 con grupo 3)
- c) *Tercera*: Grupo tratado con ácido fúlvico con grupo con ácido fúlvico más minerales (grupo 2 con grupo 3)

7.7.1.4. Resumen del quinto ensayo en ratas.

El resumen de los resultados obtenidos del análisis estadístico de las muestras se presenta en la **Tabla 35**.

Tabla 35. Resumen de resultados para el cuarto ensayo en ratas.

| Parámetro | Comparación | Estadígrafo F | Probabilidad p | Estadígrafo t | Probabilidad p | Probabilidad β de aceptar H_0 |
|------------|----------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|---------------------------------------|
| Ig totales | Dentro del grupo 1 | | | 1,83 | 0,1 | 0,48 |
| | | | | Acepto H_0 | Acepto H_0 | |
| | Dentro del grupo 2 | | | 1,23 | 0,001 | 0,009 |
| | | | | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | |
| | Inicial entre grupos | 1,4 | 0,74 | 1,2 | 0,24 | 0,68 |
| | | Acepto H_0 | Acepto H_0 | Acepto H_0 | Acepto H_0 | |
| | Final entre grupos | 7,5 | 0,01 | 2,7 | 0,013 | 0,15 |
| | | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | |
| Masa | Final entre grupos | 9,6 | 0,0062 | 3,1 | 0,006 | 0,09 |
| | | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | Rechazo H_0 | |

Comparaciones:

- Comparación de las medias dentro de los grupos.* Se comparo la media inicial con la media final en ambos grupos.
- Comparación de las medias entre los grupos.* Se comparo la media inicial del grupo 1 con la media inicial del grupo 2, así como la media final del grupo 1 con la media final del grupo 2.

Debido a la ausencia de significación estadística ($p \geq 0,05$) se acepta la hipótesis nula, esto significa que no existen diferencias entre los grupos comparados.

7.7.2. Efectos observados del ácido fúlvico

Tabla 36. Efectos observados del ácido fúlvico en ratones.

| Parámetro | Comparación entre grupos | Comparación dentro del grupo | Incremento (%) | Numero de ensayo |
|--------------------|--------------------------|------------------------------|----------------|------------------|
| IgG (mg/mL) | 2 respecto a 1 | | 175,9 | Tercero |
| Ig totales (mg/mL) | 2 respecto a 1 | | 19,4 | Tercero |
| Masa (g) | 1 respecto a 2 | | 21,1 | Tercero |
| | | | | |
| IgG (mg/mL) | 2 respecto a 1 | | 315,6 | Cuarto |
| | 3 respecto a 1 | | 171,9 | Cuarto |
| Ig totales (mg/mL) | 2 respecto a 1 | | 15 | Cuarto |
| Masa (g) | | Grupo 1 | 58,5 | Cuarto |
| | | Grupo 2 | 47,6 | Cuarto |
| | | Grupo 3 | 53,2 | Cuarto |

Tercer ensayo

Grupo 1: Control (ratones inmunizados)

Grupo 2: Prueba (ratones inmunizados y con un tratamiento de ácido fúlvico más minerales)

Cuarto ensayo

Grupo 1: Control

Grupo 2: Prueba (tratamiento con ácido fúlvico)

Grupo 3: Prueba (tratamiento de ácido fúlvico más minerales)

Dosis de ácido fúlvico en ambos ensayos: 6,75 mg/mL

Tabla 37. Efectos observados del ácido fúlvico en ratas.

| Parámetro | Comparación | Incremento (%) |
|--------------------|--------------------|----------------|
| Ig totales (mg/mL) | Dentro del grupo 2 | 8,9 |
| | Final entre grupos | 3,7 |
| Masa (g) | Final entre grupos | 7,5 |
| | Dentro del grupo 1 | 35,9 |
| | Dentro del grupo 2 | 27,2 |

Grupo 1: Control

Grupo 2: Prueba (tratamiento con 10,2 mg/mL de ácido fúlvico)

CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN

El intestino delgado constituye el principal órgano digestivo y de absorción. Aproximadamente el 90% de los alimentos ingeridos se absorbe durante su tránsito a través del intestino delgado. La pared del intestino delgado está tapizada de células especializadas que completan el proceso digestivo y absorben las pequeñas moléculas que resultan. Estas células tienen diversas enzimas en su membrana externa, la cual constituye el revestimiento interior del intestino delgado. Diminutas proyecciones cilíndricas llamadas vellosidades cubren toda la superficie plegada de la pared intestinal. Las células epiteliales que cubren cada vellosidad tienen proyecciones microscópicas llamadas microvellosidades. Casi todos los nutrientes pasan a través de las células que revisten el intestino delgado y entran en la sangre por los capilares en las vellosidades. Los mecanismos por los que se efectúa la absorción de los nutrientes son variados y complejos; muchos de ellos se desplazan por medio de proteínas portadoras, ya sea por transporte activo ó por difusión facilitada¹²¹.

8.1 Determinación de iones Γ y Fe^{3+}

Los resultados de la Tabla 11 muestran un incremento tanto en la absorción del Fe^{3+} como del Γ con suplemento de ácido fúlvico, es evidente que la absorción se incrementa con la ingesta de dicho ácido, este aumento puede deberse, además del mecanismo de absorción descrito en el apartado 3.5.2.1., para el hierro férrico, a tres factores distintos en los cuales el ácido fúlvico pudiera estar implicado:

- 1- El intestino delgado utiliza un sistema de transporte activo secundario dependiente de la energía almacenada en un gradiente electroquímico, ya que las bombas iónicas del transporte activo primario impulsadas por la hidrólisis del ATP (bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$) pueden generar desigualdades importantes de concentraciones iónicas en ambos lados de la membrana. Estos gradientes iónicos están lejos del equilibrio y constituyen por tanto una posible fuente de energía libre utilizada por el sistema de transporte secundario, que genera un simporte. Como ocurre en las plantas en su sistema de captación de NO_3^- que es tomado por un simporte inducible $\text{H}^+ / \text{NO}_3^-$ con una estequiometría de 2:1²¹⁸. Hay evidencia que apoya la hipótesis de que los ácidos fúlvicos puedan interactuar con estas proteínas de transporte en las plantas. Por lo tanto de

manera análoga, el ácido fúlvico también puede actuar de una forma similar en las células epiteliales del intestino delgado incrementando así la absorción del hierro férrico quelado por este ácido y lo mismo podría ocurrir con el yoduro.

- 2- Se sabe que los detergentes son capaces de aumentar la permeabilidad de la membrana celular²¹⁹ y las sustancias húmicas, también muestran esta actividad²²⁰ por lo que deben actuar de manera similar dada su naturaleza polianiónica, pueden actuar como moléculas tensoactivas^{221,222}. Los surfactantes son capaces de incrementar la fluidez de la membrana biológica por disminución de la cohesión entre alguno de estos componentes^{223,224}. Este fenómeno resulta en una mayor permeabilidad^{225,226} y una disminución de la temperatura en el que la transición en la matriz de la membrana lipídica ocurre desde una fase de líquido a sólido²²⁷.

Un estudio realizado por Su-Chien²²⁸ demostró que las ratas alimentadas con aceite de cártamo poseían el contenido más alto de ácido linoléico 18:2 en la membrana plasmática de los enterocitos y también mostró una mayor tasa de absorción de hierro, el ácido linoléico fue más eficaz en el aumento de transporte de hierro.

Por consiguiente al ácido fúlvico al ser una molécula polianiónica y mostrar características tensoactivas como los surfactantes, podría incrementar la fluidez de la membrana y por consiguiente mejorar la permeabilidad de los enterocitos intestinales y obtener así una mejor absorción de los iones estudiados.

- 3- El ácido fúlvico en una parte o en su totalidad contiene ambas fracciones hidrofílicas e hidrofóbicas²²⁹ es decir, es una molécula anfifílica^{230,231}. Las moléculas hidrofóbicas (no polares) del ácido fúlvico, pueden disolverse fácilmente en la bicapa lipídica de la membrana y cruzarla con facilidad, por lo que los complejos Fe-AF o I-AF podrían pasar sin la ayuda de proteínas de membrana.

Puede ser que el ácido fúlvico mejore la absorción de estos oligoelementos ya sea por cualquiera de los tres mecanismos ó inclusive en los tres. En trabajos previos²³² también se observó un incremento dos veces mayor de iones Ca^{2+} y HPO_4^{2-} en suero de ratones en presencia de estos ácidos. La concentración de Fe^{3+} y I^- en heces también aumento

pero su eliminación no se presentó en orina, en ésta última solo se ha observado la eliminación de iones Ca^{2+} y HPO_4^{2-} ya que los iones Fe^{3+} y I^- son fijados en mucho mayor proporción en los glóbulos rojos y en la glándula tiroides respectivamente.

8.2 Concentración de IgG e inmunoglobulinas totales de ratón e inmunoglobulinas totales en rata.

8.2.1. Primer ensayo. Dosis de ácido fúlvico = 0,75 mg/mL

Como se muestra en la **Tabla 12**, no se observó ningún incremento de IgG y tampoco en inmunoglobulinas totales

8.2.2. Segundo ensayo. Dosis de ácido fúlvico = 15 mg/mL

La dosis de ácido fúlvico que se uso fue 20 veces superior a la anterior, el análisis estadístico confirmó que no existen diferencias significativas en las concentraciones promedio de anticuerpos en ambos grupos, por lo que también se puede afirmar que no se observó incremento alguno ni de IgG y tampoco de inmunoglobulinas totales.

8.2.3. Tercer ensayo. Dosis de ácido fúlvico = 6,75 mg/mL

En el caso de los ratones inmunizados, sí se presentó un incremento de 176% y 19.4% para IgG y anticuerpos totales respectivamente, aunque el sistema inmune se estimuló con un inmunógeno en ambos grupos, el grupo de prueba con suplemento de ácido fúlvico más minerales, superó en mayor cantidad el título de anticuerpos comparado con el grupo control. Parece que existe un sinergismo entre el inmunógeno que estimula al sistema inmune y el ácido que posiblemente interviene en la síntesis de éstos anticuerpos. En cuanto a la masa final de los ratones, el grupo control incremento en un 21% su masa con respecto al grupo de prueba (**Tabla 36**).

8.2.4. Cuarto ensayo. Dosis de ácido fúlvico = 6,75 mg/mL

El incremento de IgG fue de 315.6%, sí comparamos al grupo 2 (tratamiento con ácido fúlvico) con el grupo 1 (control), en la comparación entre el grupo 3 (tratamiento de ácido fúlvico más minerales) con el grupo 1, se observó un incremento de IgG del 172%. Para las inmunoglobulinas totales, solo fue evidente un incremento del 15% comparando al grupo 2 con el grupo 1, la comparación entre las medias de la concentración entre el grupo 3 con respecto del grupo 1, no mostró diferencia estadística significativa. En cuanto a la masa de los ratones, el grupo que más incremento presentó

en el periodo de ensayo fue el grupo 1, seguido del grupo 3 y finalmente el grupo 2, con un 58,5%, 53,2% y 47,6% respectivamente, es decir, que el grupo control mostró un mayor incremento de masa (**Tabla 36**).

De las 3 dosis de ácido fúlvico utilizadas, la de 6,75 mg/mL fue la que mejores resultados mostró en el incremento de anticuerpos, ésta es muy similar a la concentración usada en la detección de iones ^{131}I y $^{59}\text{Fe}^{3+}$ de 5,1 mg/mL. Para dar una posible explicación de lo observado, se puede recurrir a los estudios de dinámica molecular⁸⁰, que revelan, que el ácido fúlvico, a mayores concentraciones forma agregados, por lo que se puede suponer que a una concentración relativamente baja como 0,75 mg/mL, pueden no formarse éstos agregados *in vivo*, por lo que la cantidad de ácido fúlvico absorbida, podría no ser suficiente para intervenir en la síntesis de anticuerpos, contrariamente a una concentración relativamente alta de ácido fúlvico como 15 mg/mL, estas moléculas pueden formar agregados *in vivo*, dificultando así la absorción de éste ácido por lo que su absorción sería mínima consiguiendo así, un menor incremento de anticuerpos, pero a una concentración moderada entre las antes mencionadas (6,75 mg/mL), se puede especular que no se forman agregados, facilitando la absorción de ácido fúlvico, lo que incrementaría significativamente el título de anticuerpos.

Respecto a la dosis de 6,75 mg/mL adicionada con minerales también se observó un incremento de IgG en el tercer ensayo, de 176% y de 172% para el cuarto ensayo. Estos resultados son muy similares ya que en ambos se usó una mezcla de ácido fúlvico adicionado con minerales, éste comportamiento puede explicarse debido a la propiedad que tiene el ácido fúlvico para formar complejos con estos macronutrientes y oligoelementos, por lo que una parte del ácido fúlvico absorbido puede ser utilizada en la síntesis de anticuerpos mientras que la otra forma quelatos.

En cuanto a los ratones inmunizados del tercer ensayo, el grupo control mostró una concentración de IgG de 22 mg/mL, similar a la concentración del grupo 2 (prueba con ácido fúlvico) del cuarto ensayo de 26,6 mg/mL. Por lo que se puede decir, que a una concentración de ácido fúlvico de 6,75 mg/mL, éste, incrementa la concentración de IgG como lo hace un inmunógeno.

8.2.5. Quinto ensayo. Dosis de ácido fúlvico 10,2 mg/mL

En el periodo de ensayo de dos meses con ratas, se realizaron dos comparaciones; dentro del grupo y entre grupos.

Dentro del grupo (inmunoglobulinas totales). Para el grupo control se hizo una comparación entre el promedio de la concentración de anticuerpos totales al inicio con el promedio de la concentración de anticuerpos al final sin incremento alguno. Para el grupo de prueba, se comparó la concentración promedio de anticuerpos totales, al inicio y al final, con un incremento del 9%.

Entre grupos (inmunoglobulinas totales). Haciendo una comparación de la concentración final promedio de anticuerpos entre el grupo 1 y el grupo 2, se puede observar que el grupo de prueba incremento en un 3,7% el título de anticuerpos totales, con respecto al grupo control.

Dentro del grupo (incremento de masa). Durante el periodo de ensayo, el grupo control incrementó su masa en un 36%, mientras que el grupo de prueba solo consiguió hacerlo en un 27.2%.

Entre grupos (masa final). Nuevamente, comparando la masa final promedio entre el grupo 1 y el grupo 2, el incremento fue de 7.5% del grupo control con respecto al grupo de prueba.

Como se muestra en los resultados, todos los grupos en tratamiento con ácido fúlvico (ratas y ratones), mostraron una disminución de masa durante el periodo de ensayo con respecto al grupo control (comparación entre grupos) ó incluso si se compara la masa inicial y final en este periodo, el grupo control es el que mayor incremento de masa presenta. La causa, puede ser el ligero efecto laxante que provoca el ácido fúlvico, pero al observar los resultados de la **Tabla 36**, el tercer grupo del cuarto ensayo que bebió ácido fúlvico más minerales, mostró una menor pérdida de masa en comparación con el grupo 2 que solo bebió suplemento de ácido fúlvico, al parecer los minerales ayudaron a amortiguar el efecto laxante del ácido.

Para poder ver los efectos en el incremento de inmunoglobulinas totales en una persona sana de una masa promedio de 70 kg la ingesta de ácido fúlvico se puede estimar a partir del cálculo del apartado 7.6.3 y ésta sería de:

$$\frac{0,835 \text{ mg de AF}}{\text{g} * \text{día}} \times \frac{70000 \text{ g}}{\text{persona}} = \frac{58450 \text{ mg de AF}}{\text{día} * \text{persona}} = \frac{58,45 \text{ g de AF}}{\text{día} * \text{persona}}$$

La incertidumbre en la medición de IgG fue elevada debido a que la concentración de anticuerpos humorales oscila a lo largo del día, por otro lado, se debe considerar que la cepa que se utilizó fue de una especie no consanguínea, es decir, que también la concentración de anticuerpos es distinta de un animal a otro. Por lo que el análisis estadístico nos ayuda a descartar los aparentes “incremento” que pueden presentarse de manera aleatoria y poder identificar los que sí son atribuidos a la ingesta del ácido fúlvico y así conseguir una comparación más confiable entre grupos ($p < 0,05$).

Finalmente, existe evidencia de que el aumento en la fluidez de la membrana incrementa la movilidad de las proteínas de intramembrana. En estudios previos²³³ se ha encontrado que los linfocitos de una cepa de ratones (murinos) incubados con ácido oleico 18:1 muestran un aumento en la expresión de antígenos CD44, en comparación con los que se incubaron con ácido esteárico 18:0²³⁴. Estos resultados son similares a las de Hoover y colaboradores²³⁵, quienes encontraron que los linfocitos murinos incubados con ácido linoleico 18:2 muestran también un incremento en la expresión del antígeno de superficie. Las funciones de los macrófagos pueden ser alteradas por los lípidos a través de cambios en la fluidez de la membrana.

Como se puede observar, los ácidos grasos insaturados tienen efectos directos en algunas células de defensa ya que mejoran la fluidez de la membrana de estas células. Por lo tanto, ya que los ácido fúlvico también incrementan la fluidez de las membranas cabe la posibilidad de que ejerzan efectos similares en algunas células del sistema inmunológico específico y no específico.

CAPITULO 9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

9.1 Determinación de iones Γ y Fe^{+3}

El número de cuentas por segundo obtenidas de la espectrometría gamma de los isotopos radiactivos de ^{131}I y ^{59}Fe , es superior en el grupo de ratones tratados con ácido fúlvico que el grupo control, ya que se observa una mayor cantidad de hierro en sangre, riñones, hígado y heces, así como de yodo en sangre, heces y glándula tiroidea en el grupo de prueba. Lo que confirma que el ácido fúlvico forma quelatos con un gran número de minerales, mejorando la absorción de estos oligoelementos.

Los ácidos fúlvicos han demostrado que poseen una gran actividad biológica en animales. Los resultados obtenidos confirman su importancia en el metabolismo y absorción de oligoelementos indispensables (Γ y Fe^{+3}) para el óptimo desarrollo de los vertebrados. El mecanismo de absorción queda abierto a cualquiera de las tres posibilidades antes descritas en la discusión.

9.2 Concentración de IgG e inmunoglobulinas totales de ratón e inmunoglobulinas totales en rata.

En ratones. Con los resultados de los análisis refractométrico y enzimoinmunoanálisis obtenidos, se concluye que el ácido fúlvico no actúa como inmunógeno debido al perfil de concentraciones que se manejaron, ya que un inmunógeno incrementa el título de anticuerpos aun en dosis bajas, cosa que no ocurrió con la dosis más baja de ácido fúlvico empleada, pero, a determinadas concentraciones, éste incrementa la concentración de inmunoglobulinas como lo hace un inmunógeno. Aunque el ácido fúlvico no ejerza una acción inmunogénica, es evidente un incremento de anticuerpos totales así como de inmunoglobulina G, con o sin estímulo del sistema inmune.

En ratas. La concentración de anticuerpos totales obtenida por refractometría, se incrementó en el grupo tratado con ácido fúlvico en el periodo de ensayo, comparada con el grupo control, por lo que se afirma que la ingesta de éste ácido refuerza el sistema inmunológico en estos roedores.

Aún no se tiene claro el mecanismo por el cual el ácido fúlvico incrementa el título de anticuerpos, las respuestas son solo especulativas ya que éste podría actuar de distintas formas:

- 1- El incremento en el número de anticuerpos posiblemente se deba a que los ácidos fúlvicos estimulen la producción de glucoproteínas ya que estas pueden regular el sistema inmune a través del mantenimiento del equilibrio de las células T asesinas (inmunidad mediada por células), debido a que estos ácidos están conformados por azúcares complejos y péptidos.
- 2- Pueda ejercer un efecto beneficioso sobre el sistema inmunológico de los animales porque el mecanismo de acción del ácido fúlvico está asociado con su capacidad para formar glúcidos.
- 3- El ácido fúlvico puede estimular la síntesis de glucoproteínas (anticuerpos) en las células B ó que potencializar la expresión de genes responsables de la síntesis de anticuerpos.

Aunque los efectos del ácido fúlvico están lejos de ser completamente entendidos, debido a su naturaleza compleja y aun desconocida, éstos pueden relacionarse con un síndrome de efectos fisiológicos sobre el metabolismo.

9.3 Perspectivas

Una de las perspectivas de los ácidos fúlvicos, es analizar las posibilidades de que estos ácidos puedan actuar como anticuerpos, ya sea que faciliten el proceso de fagocitosis o que interfieran con los antígenos virales o bacterianos, debido a los múltiples componentes que presentan en su estructura, como; polisacáridos, polipéptidos, fenoles, éteres, carbonilos, quinonas, varias combinaciones de benceno, compuestos alifáticos etc., ya que se ha sugerido que los grupos funcionales carboxílicos e hidroxílicos de las sustancias húmicas podrían desempeñar un papel importante en la determinación de su actividad²³⁶⁻²³⁸, pero la manera en que ejercen sus efectos aún no se comprenden en su totalidad.

Como se ha publicado anteriormente, las sustancias húmicas, especialmente las sales de los ácidos húmicos poseen efectos antivirales contra una amplia gamma de estos agentes patógenos, por lo que sería de gran interés poder determinar si el ácido fúlvico usado en éste trabajo, posee las mismas propiedades que sus análogos de ácidos húmicos para combatir enfermedades virales como el VIH, herpes simple, influenza etc., ya que podría llegar a ser un complemento significativo de los antivirales sin ningún efecto tóxico o secundario.

REFERENCIAS

1. Burford, C. (1994). *The microbiology of composting*, p.10-19. In: A. Lamont (ed.) *Down to Earth Composting*. Institute of Waste Management, Northhampton. Reino Unido.
2. Goyal, S., Dhull, S.K., Kapoor, K.K., (2005). *Chemical and biological changes during composting of different organic wastes and assessment of compost maturity*. *Bioresour. Technol.* **96**, 1584–1591.
3. Inbar Y, Hadar Y, Chen Y. (1992). *Characterization of humic substances formed during the composting of solid wastes from wineries*. *Sci Total Environ* **113**:35–48.
4. Mathur, S.P., Downen, G., Dinel, H., Schnitzer, M., (1993). *Determination of compost biomaturity. I. Literature review*. *Biol. Agri. Horticult.* **10**, 65–85.
5. Stevenson, F.J. and Ardakani, M.S., (1972). *Organic matter reactions involving micronutrients in soils*. In: J.M. Mortvedt, P.M. Giordano and W.L. Lindsay (Editors), *Micronutrients in Agriculture*. Am. Soc. Agron. Inc., Madison, Wisc., pp.79-114.
6. Stevenson, F.S., (1992). *Humus Chemistry e Genesis, Composition and Reactions*. Wiley, New York, USA.
7. Mac Carthy, P. (2001). *The principles of humic substances*. *Soil Sci.* **166**:738–751.
8. Tan, K., (2003). In: *Humic Matter in Soil and Environment*. Dekker, New York, pp. 75–126.
9. C.L. Chen, X.K.Wang. (2007). *Influence of pH, soil humic/fulvic acid, ionic strength and foreign ions on sorption of thorium (IV) onto Al₂O₃*. *Appl. Geochem.* **22**: 436–445.
10. M. Schnitzer. (1978). *Humic substances: chemistry and reactions*, in: M. Schnitzer, S.U. Khan (Eds.), *Soil Organic Matter*, Elsevier Publishing, Amsterdam, , pp. 1–64.
11. Piccolo, A. (2002). *The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implication in soil science*, *Adv. Agron.* **75**, 57-134.
12. Stevenson, F.J. (1994). *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
13. Senesi, N. (1992). *Metal-humic substance complexes in the environment. Molecular and mechanistic aspects by multiple spectroscopic approach*, in D.C. Adriano (ed.), *Biogeochemistry of trace metals*, Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 429-494.
14. Schnitzer, M. (1978). *Humic substances: chemistry and reactions*, in M. Schnitzer and S. U. Khan (eds.), *Soil Organic Matter*, Elsevier, Amsterdam, pp. 1-64.
15. Chen, Y. and Stevenson, F.J. (1986). *Soil organic matter interactions with trace elements*, in Y. Chen and Y. Avnimelech (eds.), *The role of organic matter in modern agriculture*, Martinus Nijhof, Dordrecht, The Netherlands, pp. 73-116.
16. Chefetz, B. (1998). *Transformation of organic matter during composting of municipal solid waste*, Ph.D. Thesis, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel.
17. Osterberg, R., Wei, S.Q. and Shirshova, L. (1999). *Inert copper ion complexes formed by humic acids*, *Acta Chemica Scandinavica* **53**, 172-180.
18. Liu, A.G. and Gonzalez, R.D. (2000) *Modeling adsorption of copper(II), cadmium(II) and lead(II) on purified humic acid*, *Langmuir* **16**, 3902-3909.
19. Abate, G. and Masini, J.C. (2001) *Acid-basic and complexation properties of a sedimentary humic acid*. A study on the Barra Bonita reservoir of Tiet(e)over-cap river, S(a)over-tildeo Paulo State, Brazil, *Journal of the Brazilian Chemical Society* **12**, 109-116.
20. Gamble, D. S., Underdown, A. W. and Langford, C. H. (1980). *Copper titration of fulvic acid ligand sites with theoretical, potentiometric, and spectrometric analysis*, *Analytical Chemistry* **52**, 1901-1908.
21. Larive, C.K., Rogers, A., Morton, M. and Carper, W.R. (1996). *Cd¹¹³ NMR binding studies of C. Fulvic acid complexes: Evidence of fast exchange*, *Environmental Science & Technology* **30**, 2828- 2831.
22. Logan, E.M., Pulford, I.D., Cook, G.T. and MacKenzie, A.B. (1997) *Complexation of Cu²⁺ and Pb²⁺ by peat and humic acid*, *European Journal of Soil Science* **48**, 685-696.
23. Spark, K.M., Wells, J.D. and Johnson, B.B. (1997). *The interaction of a humic acid with heavy metals*, *Australian Journal of Soil Research.* **35**, 89-101.
24. Manunza, B., Deiana, S., Maddau, V., Gessa, C. and Seeber, R. (1995). *Stability constants of metalhumate complexes: titration data analyzed by bimodal Gaussian distribution*, *Soil Science Society of America Journal* **59**, 1570-1574.
25. Leenheer, J.A., Brown, G.K., MacCarthy, P. and Cabaniss, S.E. (1998). *Models of metal binding structures in fulvic acid from the Suwannee River, Georgia*, *Environmental Science & Technology* **32**, 2410-2416.

26. Evangelou, V.P. and Marsi, M. (2001) *Composition and metal ion complexation behaviour of humic fractions derived from corn tissue*, Plant and Soil **229**, 13-24.
27. *Humic substances: nature's most versatile materials*. In: Proceedings of the 20th Anniversary Biennial Conference of International Humic Substances Society, Boston, USA, **21-26 July 2002**.
28. Stevenson, F.J. and Ardakani, M.S., (1972). *Organic matter reactions involving micronutrients in soils*. In: J.M. Mortvedt, P.M. Giordano and W.L. Lindsay (Editors), Micronutrients in Agriculture. Am. Soc. Agron. Inc., Madison, Wisc., pp.79-114.
29. C.L. Chen, X.K. Wang, H. Jiang, W.P. Hu, (2007) *Direct observation of macromolecular structures of humic acid by AFM and SEM*, Colloids Surf. A **302**, 121-125.
30. Perdue, M., (1985). *Acidic functional groups of humic substances*. In: Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, P. (Eds.), Humic Substances in Soil, Sediment and Water: Geochemistry and Isolation. Wiley-Interscience, New York, pp. 494-526.
31. Khristeva, L.A. (1953). *The participation of humic acids and other organic substances in the nutrition of higher plants*, Pochvovedenie **10**, 46-59.
32. Khristeva, L.A. (1970). *Theory of humic fertilizers and their practical use in the Ukraine*, in Robertson R.A. (ed.), 2-nd International Peat Congress, Leningrad, HMSO, Edinburgh, **543-558**.
33. Bottomley, W.B. (1914). *Some accessory factors in plant growth and nutrition*, Proc. of the Royal Society of London (Biology) **88**, 237-247.
34. Bottomley, W.B. (1914). *The significance of certain food substances from plant growth*, Annals of Botany (London) **34**, 353-365.
35. Hillitzer, A. (1932). *Über den einfluss der humusstoffe auf das wurzelwachstum*, Beihefte zum Botanischen Zentralblatt **49**, 467-480.
36. Paszewski, A., Trojanowski, J. and Lobarzewska, W. (1957). *Influence of the humus fraction on the growth of oat coleoptiles*, Annales Universitatis Marie Curie Sklodowska, Sklodowska **12**, 1-13.
37. O'Donnel, R.W. (1973). *The auxin-like activity of humic preparations from leonardite*, Soil Sci. **116**, 106-112.
38. Azam, F. and Malik, K.A. (1982). *Effect of humic acids on seedling growth of wheat (Triticum aestivum L.) under different conditions*, Pak. J. Botany **14**, 47-48. **303**
39. Cacco, G. and Dell'Agnola, G. (1984). *Plant growth regulator activity of soluble humic complex*, Can. J. Soil Sci. **62**, 306-310.
40. Syltie, P.W. (1985). *Effects of very small amounts of highly active biological substances on plants growth*, Biol. Agricult. Horticult. **2**, 245-269.
41. Dell'Agnola, G. and Nardi, S. (1987). *Hormone-like effect of enhanced nitrate uptake induced by depolycondensed humic fractions obtained from Allobophora rosea and A. caliginosa faeces*, Biol. Fertil. Soils **4**, 115-118.
42. Nardi, S., Arnoldi, G. and Dell'Agnola, G. (1988). *Release of hormone-like activities from Allobophora rosea and A. caliginosa faeces*, Can. J. Soil Sci. **68**, 563-567.
43. Piccolo, A., Nardi, S. and Concheri, G. (1992). *Structural characteristics of humus and biological activities*, Soil Biol. Biochem. **24**, 273-380.
44. Young, C.C. and Chen, Y. (1997) *Polyamines in humic acid and their effect on radical growth of lettuce seedlings*, Plant Soil **195**, 143-149.
45. Rauthan, B.S. and Schnitzer, M. (1981) *Effects of a soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cucumber (Cucumis sativus) plants*, Plant Soil **63**, 491-495.
46. Iswaran, V., Sen, A. and Vimal, O.P. (1973). *Influence of humus spray on the yield of soybean Glycine max var, Clark*. Sci. Cult. **39**, 143-144.
47. Mishra, B. and Srivastava, L.L. (1988). *Physiological properties of humic acids isolated from some major soil accosiation of Bihar*, J. Ind. Soc. Soil Sci. **36**, 83-89.
48. Prozorowskaya, A.A. (1936). *The effect of humic acid and its derivatives on the uptake of nitrogen, phosphorus, potassium and iron by plants, in Organo-mineral fertilizers, collected papers of Research Scientific Institute for Fertilizers, Insecticides, and Fungicides*, p. 127 (in Russian).
49. Saalbach E. (1956). *Einfluss von Huminstoffe auf den Stoffwechsel der Pflanzen*, in Rapp. D. (ed), Trans. 6 International Congr. Soil Science, pp. 107-111.
50. Vaughan, D., Malcom, R.E. and Ord, B.G. (1985). *Influence of humic substances on biochemical processes in plants*, in D. Vaughan and R.E. Malcom (eds.), Soil organic matter and biological activity, Martinus Nijhoff/Junk W Publishers, Dordrecht, pp. 77-108.

51. Nardi, S., Concheri, G., Dell'Agnola, G. and Scrimin, P. (1991). *Nitrate uptake and ATPase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions*, Soil Biol. Biochem. **26**, 1341-1346.
52. Pinton, R., Cesco, S., Iacoletti, G., Astolfi, S. and Varanini, Z. (1999). *Modulation of NO₃ – uptake by water extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H⁺-ATPase*, Plant Soil **215**, 155-161
53. Nardi, S., Gessa, C., Ferrarese, L., Trainotti, L., Casadoro, G., and Pizzeghello, D. (2000) *A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings*, Soil Biol. Biochem. **32**, 415-419.
54. Cacco, G., Attina, E., Gelsomino, A. and Sidari, M. (2000) *Effect of nitrate and humic substances of different molecular size on kinetic parameters of nitrate uptake in wheat seedlings*, J. Plant Nutr. Soil Sci. **163**, 313-320.
55. Zachariakis, M., Tzorakakis, E., Kritsotakis, I., Siminis, C.I. and Manios, V. (2001). *Humic substances stimulate plant growth and nutrient accumulation in grapevine rootstocks*, Acta Horticult. (ISHS) **549**, 131-136.
56. Ram, N. and Verloo, M. (1983). *Effect of natural complexants on the uptake of trace elements by barley and their extractable amounts in soil*, Agrochimica **28**, 13-19.
57. Fortun, C., Rapsch, S. and Ascaso, C. (1985). *Action of humic acid preparations on leaf development, mineral elements contents and chloroplast ultrastructure of ryegrass plants*, Photosynthetica **19**, 294-299.
58. Vaughan, D. and Malcom, R.E. (1985). *Influence of humic substances on growth and physiological processes*, in D. Vaughan and R.E. Malcom (eds.), Soil organic matter and biological activity, Martinus Nijhoff/Junk W Publishers, Dordrecht, pp. 37-76.
59. Chen, Y. and Avid, T. (1990). *Effect of humic substances on plant growth*, in P. MacCarthy, C.E. Clapp, R.L. Malcom, and P.R. Bloom (eds.), Humic substances in soils and crop science: selected readings, Soil Sci. Soc. Am., Madison, pp.161-186.
60. Mackowiak, C.L., Grossl, P.R. and Bugbee, B.G. (2001). *Beneficial effects of humic acid on micronutrient availability to wheat*, Soil Sci. Soc. Am. J. **65**, 1744-1750.
61. Varanini, Z. and Pinton, R. (2001). *Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition*, in R. Pinton, Z. Varanini, and P. Nannipieri (eds.), The Rhizosphere, Marcel Dekker, Basel, pp.141-158.
62. Clapp, C.E., Chen, Y., Hayes, M.H.B. and Cheng, H.H. (2001). *Plant growth promoting activity of humic substances*, in R.S. Swift and K.M. Sparks (eds.), Understanding and managing organic matter in soils, sediments, and waters, IHSS, Madison, pp. 243-255.
63. Sánchez-Sánchez, A., Sánchez-Andreu, J., Juárez, M., Jordá, J. and Bermúdez, D. (2002) *Humic substances and amino acids improve effectiveness of chelate FeEDDHA in lemon trees*, J. of Plant Nutr. **25**, 2433-2442.
64. Cincirová, A. (1964). *The effect of humic acid on transamination in winter wheat plants*, Biol Plant (Prague) **6**, 183-188.
65. Perminova, I.V., Grechishcheva, N.Yu., Kovalevskii, D.V., Kudryavtsev, A.V., Petrosyan, V.S. and Matorin, D.N. (2001). *Quantification and prediction of detoxifying properties of humic substances to polycyclic aromatic hydrocarbons related to chemical binding*, Environ. Sci. Technol. **35**, 3841-3848.
66. Gorovaya, A.I., Orlov, D.S. and Shcherbenko, O.V. (1995). *Humic substances: structure, functions, mode of action, protective properties, role in the environment*, Naukova dumka, Kiev.
67. Loffredo, E., Senesi, N. and D'Orazio, V. (1997). *Effect of humic acids and herbicides, and their combinations on the growth of tomato seedlings in hydroponics*, Z. Pflanzenernaehr. Bodenk. **160**, 455-461.
68. Lange, N., Golbs, S. and Kuhnert, M. (1987). *Grundlagenuntersuchungen zu immunologischen Reaktionen an der Laboratoriumstratte unter dem Einfluss von Huminsauren*, Arch. Exper. Veter.-Med. **41**, 140-146.
69. Cozzi, R., Nicolai, M., Perticone, P., De Salvia, R. and Spuntarelli, F. (1993). *Desmutagenic activity of natural humic acids: inhibition of mitomycin C and maleic hydrazide mutagenicity*, Mutat. Res. **299**, 37-44.
70. Sato, T., Ose, Y. and Nagase, H. (1986). *Desmutagenic effect of humic acid*, Mutat. Res. **162**, 173-178.
71. Sato, T., Ose, Y., Nagase, H. and Hayase, K. (1987). *Mechanism of desmutagenic effect of humic acid*, Mutat. Res. **176**, 199-204.

72. Day, K.E. (1991). *Effects of dissolved organic carbon on accumulation and acute toxicity of fenvalerate, deltamethrin and cyhalothrin to Daphnia Magna (Straus)*, Environ. Toxicol. Chem. **10**, 91-101.
73. Carlberg, G.E., Martinsen, K., Kringstad, A., Gjessing, E., Grande, M., Källqvist, T. and Skare, J.U. (1986). *Influence of aquatic humus on the bioavailability of chlorinated micropollutants in Atlantic salmon*, Arch. Environ. Contam. Toxicol. **15**, 543-548.
74. *Humic acids and their sodium salts* (1999). Summary report, February, The European Agency for the evaluation of medical products, Committee for veterinary medical products, (EMEA/MRL) 554/99-FINAL.
75. Leverage, G.J., Landrum, P.F., Giesy, J.P. and Fannin, T. (1983). Humic acids reduce bioaccumulation of some polycyclic aromatic hydrocarbons, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **40**, 63-69.
76. VonWandruszka, R., (2000). *Humic acids: their detergent qualities and potential uses in pollution remediation*. *Geochem. Trans.* **1**, 10-15.
77. Lu, F.J., (1990a). Fluorescent humic substances and blackfoot disease in Taiwan. *Appl. Organomet. Chem.* **4**, 191-193.
78. Schnitzer, M. (1978). *Humic substances: chemistry and reactions*, in M. Schnitzer and S. U. Khan (eds.), *Soil Organic Matter*, Elsevier, Amsterdam, pp. 1-64.
79. Ricardo Vivas-Reyes, Eduardo Arguello, Hernán Ayazo. (2007). *Estudio teorico de la afinidad de los ácidos húmicos por los cationes Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} y CH_3Hg^+* . *Real Academia de Ciencias. Zaragoza.* **62**: 99-117
80. R.A. Alvarez-Puebla, C. Valenzuela-Calahorra, J.J. Garrido. (2006). *Theoretical study on fulvic acid structure, conformation and aggregation A molecular modelling approach*. *Science of the Total Environment* **358**: 243- 254
81. Cornelius Steelink, Amorn Petsom (1987) "Structural features of lignins and humic substances as revealed by spin-echo and broadband decoupled C-¹³ NMR spectroscopy" *Science of The Total Environment*, Volume **62**, Pages 165-174
82. C.L. Chen, X.K.Wang (2007). *Influence of pH, soil humic/fulvic acid, ionic strength and foreign ions on sorption of thorium(IV) onto Al₂O₃*, *Appl. Geochem.* **22** 436-445.
83. Vigneault, B., Percot, A., Lafleur, M. and Campbell, P.G.C. (2000). *Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances*, *Environ. Sci. Technol.* **34**, 3907-3913.
84. Gerritsen, J. and Bradley, S.W. (1987) *Electrophoretic mobility of natural particles and cultured organisms in fresh water*, *Limnol. Oceanogr.* **32**, 1049-1058.
85. Parent, L., Twiss, M.R. and Campbell, P.G. (1996) *Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalga Chlorella: a test of the free-ion model of trace metal toxicity*, *Environ. Sci. Technol.* **30**, 1713-1720.
86. Campbell, P.G., Twiss, M.R. and Wilkinson, K.J. (1997) *Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living – cells implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota*, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **54**, 2543-2554.
87. Visser, S.A. (1985) *Physiological action of humic substances on microbial cells*, *Soil Biol. Biochem.* **17**, 457-462. 130.
88. Fein, J.B., Boily J.-F., Guclu, K. and Kaulbach, E. (1999) *Experimental study of humic acid adsorption onto bacteria and Al-oxide mineral surfaces*, *Chem. Geol.* **162**, 33-45.
89. Zhou J.L. and Banks C. J. (1993) *Mechanism of humic acid colour removal from natural waters by fungal biomass biosorption*, *Chemosphere* **27**, 607-620.
90. Samson, G. and Visser, S.A. (1989) *Surface-active effects of humic acids on potato cell membrane properties*, *Soil Biol. Biochem.* **21**, 343-347.
91. Elworthy P. H. and Treon J. F. (1967) *Physiological activity of nonionic surfactants*. In *Nonionic Surfactants* (M. J. Schick, ed.). Marcel-Dekker, New York, pp. 923-970.
92. Lee Y. S. and Bartlett R. J. (1976) *Stimulation of plant growth by humic substances*. *Soil Science Society of America Journal* **40**, 876-879.
93. Ryacek V. (1962) *Der Einfluss isolierter Humusstoffe auf einige physiologische Ausserungen der Pflanzenzell*. *Czechoslovak Academy of Sciences, Prague*. In *Studies about Humus*, p. 235.
94. Mukerji C., Ghosh R. and Mukerji S. (1975) *Effect of an anionic detergent on the permeability of some plant cells*. *Indian Journal of Experimental Botany* **13**, 575-577.
95. Riede, U.N., Zerk, G., Freudenberg, N., Keller, H.U., Seubert, B., (1991). *Humate induced activation of human granulocytes*. *Virchows Archive B. Cell Pathology Including Molecular Pathology.* **60**, 27-30.

96. Terratol, L.L.C., (2002). Effects of Humic Acid on Animals and Humans. <http://www.terratol.com/sitebuildercontent/sitebuilderfiles/EffectsofHumicAcidonAnimalsandHumans.pdf>
97. Amosova, Ya. M., Kosyanova, Z. F., Orlov, D. S., Tikhomirova, K. S., Shinkarenko, A. L. (1990). *Humic acid in yhe therapeutic muds whit a special reference to their physiological activity*. Kurortul. Fizioter. **27 (4)**, 1-6.
98. Wang, C., (1996). *Interaction between fulvic acids of different origins and active oxygen radicals*. Science in China (Series C), **39(3)**: p. 267-275.
99. Van Rensburg CEJ, van Straten A, Dekker J (2000) *An in vitro investigation of the antimicrobial activity of oxifulvic acid*. J Antimicrob Chemother **46:853-854**
100. Pukhova G. G., Druzhina N. A., Stepchenko L. M., (1987) *Effect of sodium humate on animals irradiated with lethal dose*. Radiobiologia **27**; 650-653
101. Harrison M. T., Harden, R. McG., Alexander W. D., and Wayne E. (1965). *Iodine balance studies in patients with normal and abnormal thyroid function*. J. Clin. Endocrinol. **25**: 1077.
102. Hiss J. M., and Dowling J. T (1962). *Thyroxine metabolism in untreated and treated pancreatic steatorrhea*. J. Clin. Invest. **41**: 988.
103. Leatherland, J.F., (1982). *Environmental physiology of the teleostean thyroid gland: a review*. Environ. Biol. Fish. **7**, 83-110.
104. McNabb, F.M., (2007). *The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in birds and its role in bird development and reproduction*. Crit. Rev. Toxicol. **37**, 163-193.
105. Shi, Y.B., (1999). *Amphibian Metamorphosis. From Morphology to Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
106. Yen, P.M., (2001). *Physiological and molecular basis of thyroid hormone action*. Physiol. Rev. **81**, 1097-1142.
107. Jasinski, M., Pantazopoulos, P., Rother, P., van Rooijen, N., Song, W.-C., Molina, H., Bessler, M., (2004). *A novel mechanism of complement-independent clearance of red cells, deficient in glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins*. Blood **103**, 2827-2834.
108. Lynch, S.R., (1984). Iron. In: Solomons, N.W., Rosenberg, U.H. (Eds.), *Absorption and Malabsorption of Mineral Nutrients*. Alan R. Liss Inc., New York, pp. 89-124.
109. Bioquímica. Ed. McGraw-Hill.. Dr. Juan Jose Hicks Gomez pag. 814
110. Anderson GJ, Frazer DM, McKie AT, et al (2005). *Mechanisms of haem and non-haem iron absorption: Lessons from inherited disorders of iron metabolism*. Biometals **18:339-348**.
111. Sharp P, Srail SK. (2007). *Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption*. World J Gastroenterol **13:4716-4724**
112. D. Narins, *Biochemistry of nonheme iron*; A. Bezkorovainy; Ed Plenum, New York, (1980); Chapter 3. L. Hallberg, Ann. J. Nutr. I, **123-147**. (1981)
113. Umbreit J: (2005). *Iron deficiency: A concise review*. Am J Hematol **78:225-231**.
114. Conrad ME, Umbreit JN. (2002). *Pathways of iron absorption*. Blood Cells Mol Dis **29:336-355**.
115. Fleming RE. (2005). *Advances in understanding the molecular basis for the regulation of dietary iron absorption*. Curr Opin Gastroenterol **21:201-206**.
116. Bothwell TH, Baynes RD, MacFarlane BJ, et al (1989). *Nutritional iron requirements and food iron absorption*. J Intern Med **226:357-365**.
117. Skikne BS, Lynch SR, Cook JD. (1981). *Role of gastric acid in food iron absorption*. Gastroenterology **81:1068-1071**.
118. McKie, A.T., Barrow, D., Latunde-Dada, G.O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T.J., Raja, K.B., Shirali, S., Hediger, M.A., Farzaneh, F., Simpson, R.J., (2001). *An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron*. Science **291**, 1755-1759.
119. Vulpe, C. D., and Packman, S. (1995) *Annu. Rev. Nutr.* **15**, 293-322
120. Mark R. Bleackley, Ann Y.K. Wong, David M. Hudson, Christopher H-Y. Wu, and Ross T.A. MacGillivray. *Blood Iron Homeostasis: Newly Discovered Proteins and Iron Imbalance*. Transfusion Medicine Reviews, Vol **23**, No **2** (April), 2009: pp **103-123**
121. Teresa Audesirk, Gerald Audesirk, Bruce E. Byers. *Biología, la vida en la Tierra*. Ed Pearson Educación. 2008. Pp **699,700**
122. R.J. Harris, S.J. Shire, C. Winter, (2009). *Commercial manufacturing scale formulation and analytical characterization of therapeutic recombinant antibodies*, Drug Dev. Res. **61**, 137-154.
123. E.Y. Chi, S. Krishnan, T.W. Randolph, J.F. Carpenter, (2003) *Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation*, Pharm. Res. **20**, 1325-1336.

124. Wang, S., Singh, D.L., Zeng, K., King, S., Nema, (2007). *Antibody structure, instability, and formulation*, J. Pharm. Sci. **96**, 1–26.
125. S.O. Disciullo, J.G. Abuelo, K. Moalli, J.C. Pezzullo, Circulating heavy IgM in IgM nephropathy, Clin. Exp. Immunol. **73** (1988) 395–400.
126. M. Boes, (2000). *Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses*, Mol. Immunol. **37**, 1141–1149.
127. Boes M. (2000); *Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses*. Mol Immunol, **37**:1141-9.
128. C.T. Hughey, J.W. Brewer, A.D. Colosia, W.F. Rosse, R.B. Corley, (1998). *Production of IgM hexamers by normal and autoimmune B cells: implications for the physiologic role of hexameric IgM*, J. Immunol. **161**, 4091–4097.
129. Chang TW, Wu PC, Hsu CL, Hung AF. (2007). *Anti-IgE antibodies for the treatment of IgE-mediated allergic diseases*. Adv Immunol, **93**:63-119.
130. Woolf JM, Mestecky J. (2005). *Mucosal immunoglobulins*. Immunol Rev, **206**:64-82.
131. Corthesy B. (2007). *Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis?* J Immunol **178**:27-32.
132. Vaughan, D., Malcom, R.E., Ord, B.G., (1985). *Influence of humic substances on biochemical processes in plants*. In: Vaughan, D., Malcom, R.E. (Eds.), Soil Organic Matter and Biological Activity, Martinus Nijhoff/Junk W, Dordrecht, The Netherlands, pp. 77–108.
133. Cacco, G., Dell’Agnola, G., (1984). *Plant growth regulator activity of soluble humic complex*. Canadian Journal of Soil Science **62**, 306–310.
134. Dell’Agnola, G., Nardi, S., (1987). *Hormone-like effect of enhanced nitrate uptake induced by depolycondensed humic fractions obtained from Allolobophora rosea and A. caliginosa faeces*. Biology and Fertility of Soils **4**, 115–118.
135. Nardi, S., Arnoldi, G., Dell’Agnola, G., (1988). *Release of the hormone-like activities from Allolobophora rosea and A. caliginosa faeces*. Canadian Journal of Soil Science **68**, 563–567.
136. Visser, S.A., (1986). *Effetto delle sostanze umiche sulla crescita delle piante*. In: Burns, R.G., Dell’Agnola, G., Miele, S., Nardi, S., Savoini, G., Schnitzer, M., Sequi, P., Vaughan, D., Visser, S.A. (Eds.), Sostanze Umiche. Effetti sul Terreno e sulle Piante, Ramo Editoriale degli Agricoltori, Roma, pp. 96–143.
137. Chaminade, R.; Blanchet, R. C. R. Acad. Sci. (Paris) (1953), 237, 1768-1770.
138. Khristeva, L. A. Pochvivedenie (1953), 10, 46-59.
139. Lee, Y. S.; Bartlett, R. J. Soil Sci. Soc. Am. J. (1976), 40, 876-879.
140. Ewa Lipczynska-Kochany, Jan Kochany (2009). *Effect of humate on biological treatment of wastewater containing heavy metals*. Chemosphere **77**, 279–284
141. Davies, G., Fataftah, A., Cherkasskiy, A., Ghabbour, E.A., Radwan, A., (1997). *Tight metal binding by humus acids and its role in biomineralization*. Dalton Trans. **21**, 4047–4060.
142. Bondietti E.: *Environmental migration of longlived radionuclides*. IAEA, Vienna (1982).
143. Samanidou V., I. Papadoyannis, G. Vasilikiotis (1991). *Mobilization of heavy-metals from river sediments of Northern Greece, by humic substances*. J. Environm. Sci. Health **A26**: 1055.1068.
144. Randy Mosley, Morris and Mosley. *The effect of humates on remediation of hydrocarbon and salt contaminated soils*. 5th International Petroleum Environmental Conference to be held in Albuquerque, New Mexico, October 20th – 23rd 1998.
145. Chen, Y.X., Chen, H.L., Xu, Y.T., Shen, M.S., (2004). *Irreversible sorption of pentachlorophenol to sediments: experimental observations*. Environ. Intern. **30**, 31-37.
146. Xing, B., 2001. Sorption of naphthalene and phenanthrene by soil humic acids. Environ. Pollut. **111**, 303-309.
147. Conte, P., Agretto, A., Spaccini, R., Piccolo, A., (2005). *Soil Remediation: humic acids as natural surfactants in the washings of highly contaminated soils*. Environ. Pollut. **135**, 515-522.
148. Verstraete W. and W. Devliegher (1997). *Formation of non-bioavailable organic residues in soil: perspectives for site remediation*. Biodegradation **7**: 471.485.
149. Enviromate TM (2002) *Effects of humic acid on animals and humans (literature review and current research)*. Effects of humic acid. Enviromate Inc. 8571 Boat Club Road, Forth Worth, Texas 76179. <http://www.enviromateinc.com/effectssha.asp>
150. Sydow, G.; et al. Pharmazie, December (1986). *The effects of phenolic polymers on retroviruses*. Vol. **41**, Issue **12**, Pages **865-868**.
151. Klocking, R.; et al. Experientia, May (1972). *Antiviral properties of humic acids*., Vol. **28**, Issue **5**, Pages **607-608**.

152. Thiel KD, Helbig B, Klöcking R, Wutzler P, Sprössig M, Schweizer H (1981) Comparison of the in vitro activities of ammonium humate and of enzymically oxidized chlorogenic and caffeic acids against type 1 and type 2 human herpes virus. *Pharmazie* **36**:50–53
153. Schiller, F.; Klocking, R.; Wutzler, P.; Farber, I. *Dermatol Monatsschr*, (1979). *Results of an oriented clinical trial of ammonium humate for the local treatment of herpesvirus hominis (HVH) infections*. Vol. **165**; Issue 7; Pages **505-509**.
154. Thiel, K. D.; Heibig, B.; Klocking, R.; Wutzler, P.; Sprössig, M.; Schweizer, H. *Pharmazie*, (1981). *Comparison of the in vitro activities of ammonium humate and of enzymically oxidized chlorogenic and caffeic acids against type 1 and type 2 human herpes virus*. Vol. **36**; Issue 1; Pages **50-53**.
155. Thiel, K. D.; Klocking, R.; Schweizer, H.; Sprössig, M. *Zentralbl Bakteriell*, (1977). *In vitro studies of the antiviral activity of ammonium humate against herpes simplex virus type 1 and type 2*.; Vol. **239**; Issue **3**; Pages **304-321**.
156. Laub, R. Laub BioChem Corp., August (1998). *The chemically induced inhibition of HSV infection*. www.laubiochem.com.
157. Helbig, B. et al (1987). *Therapeutic effect of E-5-2-bromovinyl 2-deoxyuridine, caffeic acid oxidation product, and trisodiumphosphonoformate on cutaneous herpes simplex virus type 1 infected guinea pigs*. *Med Viral*.; Vol. **23**; Issue **3**; pages **303-309**.
158. Interaction of humic acids and humic acid like polymers with *herpes simplex virus type 1*. Klocking, R. *Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment*, Berlin, (1991); pages **408-412**.
159. Laub R (2000) *Laub developing humate with anti-HIV, HSV, HPV and other antiviral activity*. Biotechnology information institute, February 2000. *Antiviral drug and vaccine development information*, vol. **12**. no. **2**. ISBN **0897-9871**
160. Laub developing *humate with anti-HIV, HSV, HPV and other antiviral activity*. Laub, R. Biotechnology Information Institute, February 2000. *Antiviral Drug and Vaccine Development Information*, Vol. **12**, No. **2**. ISBN **0897-9871**.
161. Laub, R. Laub BioChem Corp. *The chemically induced inhibition of HIV-1 replication*., January 1995. www.laubiochem.com.
162. Laub, R. U. S August 1999. *Process for preparing synthetic soil-extract materials and medicament based thereon*.. Patent No. **5,945,446**.
163. Schols, D.; et al. *Acquir Immune Defic Syndr*, (1991). *Selective inhibitory activity of polyhydroxycarboxylates derived from phenolic compounds against human immunodeficiency virus replication*. Vol. **4**; Issue 7, pages **677-685**.
164. Loya, S.; et al December, 1993. *Hexaprenoid hydroquinones. Novel inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1*.. *Journal of Natural Products*.; Vol. **52**, Issue **12**; pages **2120-2125**.
165. Mentel, R., et al. *Biochem Acta*, (1983). *Effectiveness of phenol body polymers (Humic Acids) against influenza virus*. Vol. **42**; Issue **10**; pages **1353-1356**.
166. Thiel. K. D., Klocking. R., Helbig B. (1976). *In vitro untersuchungen zur antiviralen aktivitat enzymatisch oxidierter o diphenolverbindungen gegenüber Herpes simplex virus typ 1 und typ 2*. *Zbl. Blakt. Hyg. I Abt. Org. A*. **234**. **159-160**
167. Wutzler P., Sprobing M., Schweizer H. (1981). *Vergleich der in vitro wirkung von ammoniumhumat und enzymatisch oxidierter chlorogen und kaffeesavre gegenüber herpesvirus hominis typ 1 und typ 2*. *Pharmazie* **36**. **50-53**
168. Klocking. R., Sprobing M., Wutzler P., Thiel. K. D., Helbig B. (1983). *Antiviral wirksame huminsauren and huminsaureahnliche polymere*. *Z. Physiother*. **33**. **95-101**.
169. Eichhorn U., Eichhorn U., Helbig B. (1984). *Anwendung von ⁵¹Cr markierten FL-zellen zur testung der antiviralen aktivitat von phenolkorpolymerisaten gegen Cozsackieviron in vitro*, *disch. Gesundh wes* **39**. **1514-1519**
170. Hils J., May A., Sperber M., Klocking. R., Helbig B., Sprobing M. (1986). *Hemmung ausgewahlter influenzavirustamme der typen A und B durch phenolkorperpolymerisate*. *Biomed. Biochim. Acta*. **45**. **1173-1179**.
171. Thiel, K.D., B. Helbig, R. Klöcking, P. Wutzler, M. Sprössig and H. Schweizer, (1981). *Comparison of the in vitro activities of ammonium humate and of enzymically oxidized chlorogenic and caffeic acids against type 1 and type 2 human herpes virus*. *Pharmazie*, **36**: **50-53**.
172. Klocking R., Sprobig M. (1975). *Wirkung von ammoniumhumat auf einige virus-zell-systeme*. *Z. Allg. Mikrobiol*. **15**. **25-30**
173. Schols D., Wutzler P., Klocking R., Helbig, R., De Clercq E. (1991). *Acq Immun. Defic. Synd* **4**. **677-685**.

174. Neyts J., Snoeck R., Wutzler P., Klocking R., Helbig, R., De Clercq E., Cushman M., Wang p. (1992). *Antiviral Chem. Chemother* **3**: 215-222
175. Brzozowski T., Dembinski A., Konturek S. (1994). *Influence of Tolpa Peat Preparation on gastroprotection and on gastric and duodenal ulcers*. *Acta Pol. Pharm.* **51**:103-107.
176. Klocking R., Fernekorn A., Stolzner W., (1992). *Nachweis einer ostrogenen aktivitat von huminsauren und huminsaureahnlichen polymeren*. *Telma* **22**: 187-197.
177. Wang, Z., Y. Xu, and Peng, (1996). *Influences of fulvic acid on bioavailability and toxicity of selenite for wheat seedling and growth*. *Biological Trace Element Research*, **55**: p. 147-162.
178. Schneider J., R. Weis, C. Manner et al. (1996). *Inhibition of HIV-1 in cell culture by synthetic humate analogues derived from hydroquinone: mechanism of inhibition*. *Virology* **218**: 389-395.
179. Van Rensburg C.E., J. Dekker, R. Weis, T.L. Smith, J. van Rensburg, J. Schneider: (2002). *Investigation of the anti-HIV properties of oxihumate*. *Chemotherapy* **48**: 138-143.
180. Joone G.K., J. Dekker, C.E. van Rensburg. (2003). *Investigation of the immunostimulatory properties of oxihumate*. *Z. Naturforsch.* **58**: 263-267
181. Wang, C., (1996). *Interaction between fulvic acids of different origins and active oxygen radicals*. *Science in China (Series C)*, **39(3)**: p. 267-275.
182. Van Rensburg CEJ, van Straten A, Dekker J (2000) *An in vitro investigation of the antimicrobial activity of oxifulvic acid*. *J Antimicrob Chemother* **46**:853-854
183. Van Rensburg CEJ, Malfeld SCK, Dekker J (2001) *Topical application of oxifulvic acid suppresses the cutaneous immune response in mice*. *Drug Develop Res* **53**:29-32
184. Tachibana Y, Hiribe S, Tawa R (2004) *Studies of antioxidative activity of humic substances in peat*. *Trace Nutrients Res* **23**:104-108 in Japanese
185. Kuhnert M., Fucho V., Golbs S. (1989). *Pharmakologisch toxikologisch eigenschften von huminsauren und ihre wirkungs profile fur eine veterinarmedizinische therapie*. *DTW. Drtsch. Tierarztl Wochenschr* **96**: 3-10.
186. Ridwan F. N. S. (1977). *Untersuchungen zum einflub von huminsauren auf die blei und cadmium abortion bei ratten*. *Dissertation Universitat Gottingen*.
187. Kocking R. (1980). *Giftung und entgiftung von schwermetallen durch huminsauren*. *Arch. Exper. Veterinarmedizin* **34**: 389-393
188. Ylva Lind and Anders Wicklund Glynn. (1999). *The Influence of Humic Substances on the Absorption and Distribution of Cadmium in Mice*. *Pharmacology & Toxicology* **84**, 267-213.
189. Maslinski, C; Fogel, W. A.; Andrzejewski, W. (1993). *An examination of humate stimulated liver functions*. *Acta Pol. Pharm.* Vol. **50**; Issue 4-5; pages 413-416.
190. Visser, S. A. *Sci. Total Environ.*; (1987); Vol. **62**; Issue 4; pages 347-354.
191. EMEA (1999) *Humic acids and their sodium salts, summary report*. Committee for Veterinary Medicinal Products
192. Humintech (2004) *Huminfed-Tierfutterzusätze and Veterinär Medizin and Huminsäure Basierende Produkte*. Humintech@Humintech GmbH, Heerdter Landstr. 189/D, D-40549 Düsseldorf, Germany in the Global Environment and Implication for Human Health. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1368 pp
193. Chiu, H.C., Shih, S.R., Lu, F.J., Yang, H.L., (1993). *Stimulation of endothelin production in cultured human endothelial cells by fluorescent compounds associated with blackfoot disease*. *Thromb. Res.* **69 (1)**, 139-151.
194. Liang, H.J., Tsai, C.L., Chen, P.Q., Lu, F.J., (1999). *Oxidative injury induced by synthetic humic acid polymer and monomer in cultured rabbit articular chondrocytes*. *Life Sci.* **65 (11)**, 1163-1173.
195. Liang, H.J., Tsai, C.L., Lu, F.J., (1998). *Oxidative stress induced by humic acid solvent extraction fraction in cultured rabbit articular chondrocytes*. *J. Toxicol. Environ. Health A* **54 (6)**, 477-489.
196. Huang, T.S., Lu, F.J., Tsai, C.W., Chopra, I.J., (1994). *Effect of humic acids on thyroidal function*. *J. Endocrinol. Invest.* **17 (10)**, 787-791.
197. Huang, T.S., Lu, F.J., Tsai, C.W., (1995). *Tissue distribution of absorbed humic acids*. *Environ. Geochem. Health* **17**, 1-4.
198. Lu, F.J., Liu, T.M., (1986). *Fluorescent compounds in drinking water of blackfoot disease endemic areas: animal experimental model*. *J. Formosan Med. Assoc.* **85**, 352-358.
199. Bernacchi, F., Ponzanelli, I., Minunni, M., Falezza, A., Loprieno, N., Barale, R., (1996). *In vivo cytogenetic effects of natural humic acid*. *Mutagenesis* **11 (5)**, 467-469.
200. Cheng, M.L., Ho, H.Y., Huang, Y.W., Lu, F.J., Chiu, D.T., (2003). *Humic acid induces oxidative DNA damage, growth retardation, and apoptosis in human primary fibroblasts*. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) **228 (4)**, 413-423.

201. Hseu, Y.C., Huang, H.W., Wang, S.Y., Chen, H.Y., Lu, F.J., Gau, R.J., Yang, H.L., (2002). *Humic acid induces apoptosis in human endothelial cells*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **182** (1), 34–43.
202. Lu, F.J., Huang, T.S., Lin, Y.S., Pang, V.F., Lin, S.U., (1994). *Peripheral vasculopathy in rats induced by humic acids*. *Appl. Organomet. Chem.* **8**, 223–228.
203. Yang, H.L., Chiu, H.C., Lu, F.J., (1996). *Effects of humic acid on the viability and coagulant properties of human umbilical vein endothelial cells*. *Am. J. Hematol.* **51** (3), 200–206.
204. Ghio, A.J., Quigley, D.R., (1994). *Complexation of iron by humic-like substances in lung tissue: role in coal workers' pneumoconiosis*. *Am. J. Physiol.* **267** (2 Pt 1), L173–L179.
205. Ghio, A.J., Stonehuerner, J., Quigley, D.R., (1994). *Humic-like substances in cigarette smoke condensate and lung tissue of smokers*. *Am. J. Physiol.* **266** (4 Pt 1), L382–L388.
206. Cheng, M.L., Ho, H.Y., Chiu, D.T., Lu, F.J., (1999). *Humic acid-mediated oxidative damages to human erythrocytes: a possible mechanism leading to anemia in Blackfoot disease*. *Free Radic. Biol. Med.* **27** (3–4), 470–477.
207. Gau, R.J., Yang, H.L., Suen, J.L., Lu, F.J., (2001). *Induction of oxidative stress by humic acid through increasing intracellular iron: a possible mechanism leading to atherothrombotic vascular disorder in blackfoot disease*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283** (4), 743–749.
208. Lu, F.J., (1990b). *Blackfoot disease: arsenic or humic acid?* *Lancet* **336** (8707), 115–116.
209. Yang, M.L., Lee, Y., Huang, T.S., Lu, F.J., (2002). *Humic acid extracted from Blackfoot disease-endemic well water induces adipocyte differentiation of C3H10T1/2 fibroblast cells: a possible mechanism leading to atherosclerotic-like plaque in Blackfoot disease*. *Arch. Toxicol.* **76** (1), 48–54.
210. Yang, C., Niu, C., Bodo, M., Gabriel, E., Notbohm, H., Wolf, E., Muller, P.K., (1993). *Fulvic acid supplementation and selenium deficiency disturb the structural integrity of mouse skeletal tissue. An animal model to study the molecular defects of Kashin–Beck disease*. *Biochem. J.* **289** (Pt 3), 829–835.
211. Yang, C.L., Bodo, M., Notbohm, H., Peng, A., Muller, P.K., (1991). *Fulvic acid disturbs processing of procollagen II in articular cartilage of embryonic chicken and may also cause Kashin–Beck disease*. *Eur. J. Biochem.* **202** (3), 1141–1146.
212. Zhai, S.S., Kimbrough, R.D., Meng, B., Han, J.Y., LeVois, M., Hou, X., Yin, X.N., (1990). *Kashin–Beck disease: a cross-sectional study in seven villages in the People's Republic of China*. *J. Toxicol. Environ. Health* **30** (4), 239–259.
213. Cooksey, R.C., Gaitan, E., Lindsay, R.J., Hill, J.R., Kelly, K., (1985). *Humic substances, a possible source of environmental goitrogens*. *Org. Geochem.* **8**, 77–80.
214. Lugo R., Curso regional sobre determinación de radionúclidos en alimentos, México Noviembre 1990
215. H. Hugh Fudenberg, Daniel P. Stites, Joseph L. Caldwell, J. Vivian Well. Pruebas inmunológicas de laboratorio. Tercera edición. Ed El Manual Moderno.
216. Hamilton-Simpson-Ellis. "Refractometría y polarimetría" 1995. McGraw Hill. 1980. México pagina Web: En: www.cecyt15.ipn.mx/polilibros/instrumenta/contenido/unidades/unidad_vi.htm
217. J. M. Navarrete, V. M. Urbina, T. Martínez, L. Cabrera. (2004) *Role of fulvic acids for transporting and fixing phosphate and iron ions in bean plants by radiotracer technique*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Vol. **259**, No. **2**, 311–314
218. Miller, A.J., Smith, S.J., (1996). *Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells*. *Journal of Experimental Botany* **47**, 843–854.
219. Gloxhuber Ch. (1974) *Toxicological properties of surfactants*. *Archives of Toxicology* **52**, 245–i70
220. Visser S. A. (1982) *Surface active phenomena by humic substances of aquatic origin*. *Revue Francake des Sciences de l'Eau* **1**, 2855295.
221. Visser, S.A., (1986). *Effetto delle sostanze umiche sulla crescita delle piante*. In: Burns, R.G., Dell'Agola, G., Miele, S., Nardi, S., Savoini, G., Schnitzer, M., Sequi, P., Vaughan, D., Visser, S.A. (Eds.), *Sostanze Umiche. Effetti sul Terreno e sulle Piante*, Ramo Editoriale degli Agricoltori, Roma, pp. 96–143.
222. Nardi, S., Concheri, G., Dell'Agola, G., Scrimin, P., (1991). *Nitrate uptake and ATPase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions*. *Soil Biology & Biochemistry* **23**, 833–836.
223. Attwood D. and Florence A. T. (1983) *Surfactant Systems*. Their Chemistry, Pharmacology and Biology. Chapman & Hall, London.
224. Lenaz G., Curatola G., Masotti L. (1975) *Perturbation of membrane fluidity*. *Journal of Bioenergetics* **7**, 223–299.
225. McElhaney R. N., De Gier J. and van der Neut-Kok E. C. M. (1973) *The effect of alterations in fatty acid composition and cholesterol content on the nonelectrolyte permeability of Acholeplasma laidlawii B cells and derived liposomes*. *Biochimica et Biophysica Acta* **298**, 500–512.

226. Raison J. K. (1980) *Membrane lipids: structure and functions*. In *The Biochemistry of Plants* (P. K. Stumpf and E. E. Corm, Eds), Academic Press, New York. Vol. 4, pp. 57-84.
227. Boggs J. M. (1984) *Intermolecular hydrogen bonding between membrane lipids*. In *Biomembranes* (M. Kates and L. A. Manson, Eds). Press, New York. Vol. 12, pp. 3-54. Plenum
228. Su-Chien Chang and Mou-Liang Chen. (1992) *Effects of dietary fat on lipid composition and iron uptake of intestinal brush-border membrane of rats*. *J. Nutr. Biochem.*, vol. 3, March
229. Stevenson FJ (1994) *Humus chemistry, 2nd edn*. Wiley, New York
230. Stumm W (1992) *Chemistry of the solid-water interface*. Wiley, New York
231. Campbell NA, Reece JB (2005) *Biology*, 7th edn. Benjamin Cummings, San Francisco, pp 92-140
232. J. M. Navarrete., G. Muller., T. Martínez (2006). *Effect of synthetic carbon amino saccharides on the transfer of labeled mineral $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ ions from drinking water to blood serum in mice*. *Czechoslovak Journal of physics*, Vol 56, 695-696
233. Klausner, R.D., Bhalla, D.K., Dragsten, P., et al. (1980). *Model for Capping Derived from Inhibition of Surface Receptor Capping by Free Fatty Acids*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 437-441
234. Peck, M.D., Li, Z., Han, T., et al. (1994). *Fatty Acid Unsaturation Stimulates Membrane-Cytoskeleton Interactions in Mouse Splenic Lymphocytes*. (in press)
235. Hoover, R.L., Bhalla, D.K., Yanovich, S., et al. (1980). *Effects of Linoleic Acid on Capping, Lectin Mediated Mitogenesis, Surface Antigen Expression, and Fluorescent Polarization in Lymphocytes and BHK Cells*. *J. Cell Physiol.* 103~ 399-406
236. Mato, M.C., Olmedo, M.G., Mendez, J., (1972). *Inhibition of indoleacetic acid-oxidase by soil humic acids fractionated on Sephadex*. *Soil Biology & Biochemistry* 44, 69-473.
237. Malcom, R.E., Vaughan, D., (1978). *Effects of humic acid fractions on invertase activities in plant tissues*. *Soil Biology & Biochemistry* 11, 65-72.
238. Pflug, W., Ziehm, W., (1981). *Inhibition of malate dehydrogenase by humic acids*. *Soil Biology & Biochemistry* 13, 293-299.

Aprobación del protocolo por el CICUAL (Comité Institucional para el cuidado y uso de los animales de laboratorio)



**FACULTAD DE QUÍMICA
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO
Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO
OFICIO/FQ/CICUAL/017/10
ASUNTO: Aprobación de Protocolo**

**DR. JUAN MANUEL NAVARRETE TEJERO
DEPTO. QUÍMICA INORGÁNICA Y NUCLEAR
*Presente***

Por medio de la presente le informamos que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), de la Facultad de Química, UNAM, ha revisado el Protocolo:

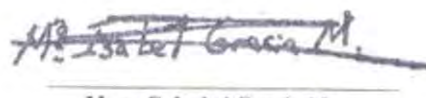
Título: “EFECTO DE LOS ACIDOS FULVICOS EN LA FISIOLOGIA DE VERTEBRADOS, DETERMINADO POR MEDIO DE TRAZADORES RADIATIVOS”

DICTAMEN: APROBADO

Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo.

Atentamente
“POR MÍ RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, D.F. a 17 de Enero del 2011


M. en C. Bernardo Lucas Florentino
Coordinador del CICUAL


M. en C. Isabel Gracia Mora
Secretaria del CICUAL

c.e.p. Dr. Eduardo Bárzana García, Director, FQ.
c.e.p. Dr. Jorge Vázquez, Secretario Académico de Investigación, FQ.
c.e.p. Dra. Laura Gasque, Jefa del Depto. FQ.
c.e.p. CICUAL, FQ.

Certificado de salud de los animales de laboratorio
CERTIFICADO DE SALUD

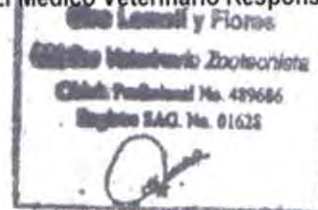


En cumplimiento de la normatividad vigente, por este conducto certifico que los animales amparados por la Factura HL605, de Harlan Laboratories, SA de CV., se encontraron sanos, libres de enfermedades infectocontagiosas y de ectoparásitos.

Estos animales fueron producidos y mantenidos en el "Centro UNAM-Harlan de Producción de Animales de Laboratorio", un sistema de barrera que brinda las condiciones técnica y científicamente óptimas, para la crianza de animales de laboratorio con un perfil microbiológico definido.

El estado de salud de todos los animales y la autenticidad genética de las cepas endogénicas producidos en la Barrera Harlan No. 650 de la Ciudad de México (Centro UNAM-Harlan), se evalúan periódicamente y los resultados se publican trimestralmente en www.harlan.com. Además, a solicitud del cliente, se anexan al presente certificado, el cual se expide en la Ciudad de México a los 08 días del mes de marzo de 2011

El Médico Veterinario Responsable.



CIRO LOMELI Y FLORES
 Médico Veterinario Zootecnista
 Cedula Profesional No.469686
 Registro SAG. No.01628