



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QUÍMICA FARMACÉUTICA

MONOGRAFIA PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIADO(A) EN
QUÍMICA FARMACÉUTICA

TÍTULO:

Determinación de DL_{50} aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana*, en las especies vegetales **Citrus aurantium, Ruta Chalepensis, Eucalyptus camaldulensis** laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-
Octubre 2017

Autores:

Br(a): Alba Deniss Morales Arauz

Br(a): Jessica del Carmen Ulloa Jiménez.

Br: Reynier Omar Mairena Flores

Tutor:

Francisca Teresa Salazar Cabrera, Lic.

Asesor:

Sergio Rafael Ramirez Lanzas, M.c.S.

María Natalia Gutiérrez, M.c.S

Managua, Octubre 2017

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

TÍTULO:

Determinación de DL_{50} aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana*, en las especies vegetales **Citrus aurantium, Ruta Chalepensis, Eucalyptus camaldulensis** laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

MSc. Rosa Maria González Tapia
Directora del Departamento de Química
Facultad de Ciencias e Ingeniería
UNAN – Managua
Su despacho.

Estimada Sra. González

Por medio de la presente hago constar que los autores Bra. Alba Dennis Morales Arauz con número de carnet 12042163, Bra. Jessica Del Carmen Ulloa Jiménez con número de carnet 12044913 y el Br. Reynier Omar Mairena Flores con número de carnet 12041976 han culminado su trabajo monográfico que lleva por tema *"Identificación de Metabolitos secundarios mediante el método CIULEI para la determinación de DL₅₀ aplicando el bioensayo de Artemia Franciscana, en las especies vegetales Citrus aurantium L., Ruta Chalepensis L. y Eucalyptus camaldulensis Dehnh. Laboratorio de Química, UNAN MANAGUA, Enero – Octubre 2017.*

Atentamente:



Francisca Salazar Cabrera
Lic. Química Farmacéutica
Responsable de laboratorio
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias e Ingeniería
UNAN - Managua

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

RESUMEN

Objetivo_ El presente trabajo tiene como objetivo determinar la actividad citotóxica mediante el cálculo de la DL_{50} y así también se identificaron los metabolitos secundarios en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.*

Introducción_ El retorno hacia el uso terapéutico de los productos de origen natural se ha visto favorecido por el descubrimiento de graves efectos secundarios con fármacos de síntesis e incremento de la automedicación, además porque los productos fitoterápicos, son en general menos peligrosos y más accesibles

Metodología_ El estudio realizado es analítico no experimental. El tamizaje fitoquímico según CIULEI, se utilizó para la identificación de los metabolitos secundarios, se aplicó bioensayo con *Artemia franciscana* y con los datos obtenidos se determinó la DL_{50} a partir de la ecuación de regresión lineal.

Resultado_ Del tamizaje fitoquímico de las tres especies vegetales, se encontraron positivo para las pruebas de Triterpenos, alcaloides, carotenoides, flavonoides, taninos, antracenosidos y emodinas, se calcularon las DL_{50} y se clasificaron según el CYTED en altamente toxica, moderadamente toxica y ligeramente toxica

Conclusión_ según los resultados se logró cumplir todos los objetivos planteados concluyendo que de las tres especies vegetales, la que presento mayor actividad citotóxica fue el extracto alcohólico de la *Ruta chalepensis L.*, con una concentración de 17,82 ppm según la clasificación del CYTED es *altamente tóxica*.

INDICE DE CONTENIDO

Aspectos generales

Título

Carta Aval del Tutor iii

Resumen iv

CAPITULO I

Introducción 1

Planteamiento del problema 2

Justificación 3

Objetivos de investigación 4

CAPITULO II

Antecedentes 6

2.1 Citrus Aurantium (Naranja Agria) 9

2.2 Ruta Chalepensis 13

2.3 Eucalyptus Camaldulensis 17

2.4 Tamizaje Fitoquímico 21

2.5 Método de CIULEI (1982) 22

2.6 Metabolitos Secundarios 22

2.6.1 Alcaloides 23

2.6.2 Flavonoides 23

2.6.3 Carotenoides 24

2.6.4 Tanino 25

2.6.5 Terpeno 25

2.6.6 Emodinas 26

2.6.7 Antracenosidos 27

2.7 Tipos de extracción 27

2.7.1 Extracción por equipo Soxhlet 27

2.7.2 Extracción por reflujo 28

2.8 Bioensayo 29

2.9 Artemia Franciscana 29

2.10 Regresión Lineal 31

2.10.1 Coeficiente de correlación momento producto 31

2.10.2 La recta de regresión de Y sobre X 32

2.10.3 Errores en la pendiente y ordenada en el origen de la recta de regresión 33

2.10.4 Calculo de una concentración y su error aleatorio 34

Hipótesis	35
CAPITULO III: Diseño Metodológico	
3.1.1 Ámbito de estudio	36
3.1.2 Tipo de estudio	36
3.1.3 Población y Muestra	36
3.1.3.1 Población	36
3.1.3.2 Muestra	36
Criterios de inclusión	36
Criterios de Exclusión	36
3.1.4 Variables y Operacionalización	37
3.1.4.1 Variables independientes	37
3.1.4.2 Variables dependientes	37
3.1.4.3 Operacionalización de Variables	37
3.1.5 Material y Método	38
3.1.5.1 Materiales para recolectar información	38
3.1.5.2 Material para procesar información	38
3.1.5.3 Equipos, Reactivos y Materiales de laboratorio	39
3.1.5.4 Método de CIULEI	40
3.1.5.5 Bioensayo con <i>Artemia Franciscana</i>	40
CAPITULO IV	
4.1 Resultado del Tamizaje Fitoquímico	46
4.2 Resultado obtenido en Bioensayo con <i>Artemia Franciscana</i>	46
4.3 Resultado del tamizaje Especie vegetal <i>Citrus Aurantium</i>	47
4.4 Resultado del tamizaje Especie vegetal <i>Ruta Chalepensis</i>	48
4.5 Resultado del tamizaje Especie vegetal <i>Eucalyptus Camaldulensis</i>	49
4.6 Resultado del Bioensayo	50
CAPITULO V	
Conclusiones	54
Recomendaciones	55
Referencia y Bibliografía	
Anexos	

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En el presente estudio se propone determinar DL_{50} e identificar los metabolitos secundarios presentes en las especies estudiadas, ya que se conoce que algunos de estos podrían ser los causantes de sus propiedades tóxicas. El hombre desde su surgimiento fue creando las condiciones para vivir mejor a base de las plantas obtuvo los medios para su alimentación, Salud y bienestar. De esta manera los primeros medicamentos tuvieron su origen en las plantas, siendo muy variados sus usos para diversas afecciones.

Por un lado el retorno hacia el uso terapéutico de los productos de origen natural se ha visto favorecido por el descubrimiento de graves efectos secundarios con fármacos de síntesis e incremento de la automedicación, además porque los productos fitoterápicos, son en general menos peligrosos y más accesibles. El uso de plantas medicinales ha incrementado el desarrollo de nuevas formas de preparación y de administración de las drogas vegetales y sus extractos.

En esta investigación se seleccionaron como muestra de estudio tres especies vegetales, como lo son: *Citrus Aurantium*, *Ruta Chalepensis* y *Eucalyptus Camaldulensis*, las que presentan propiedades terapéuticas como tranquilizantes, espasmolítica y para tratar afecciones respiratorias respectivamente. Debido a que son muy utilizadas, por la población Nicaragüense, se considera de suma importancia tener los conocimientos suficientes, para un uso adecuado de estas.

Para conocer las concentraciones a las que estas especies son tóxicas, se realizó un Bioensayo con *Artemia Franciscana* en el que se determinó el número de nauplios muertos en un periodo de 24 horas, aplicándose el método de regresión lineal se determinó la dosis letal media, con los resultados obtenidos se comparó y demostró que especie vegetal presenta mayor actividad citotóxica según la clasificación de toxicidad del CYTED.

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Nicaragua se encuentra una enorme riqueza de plantas con propiedades curativas, empíricamente se conoce que las plantas medicinales seleccionadas para este estudio podrían presentar toxicidad cuando se exceden las dosis establecidas, se debe tener en cuenta que actualmente estas son especies muy utilizadas por la población.

Sin embargo, esta no se orienta antes de llevar a cabo un tratamiento con Medicina Natural y desconocen que así como presentan propiedades terapéuticas, también poseen propiedades tóxicas que pueden llegar a afectar su salud. Por tanto se considera de gran importancia determinar si estas especies presentan actividad citotóxica y en que dosis. Sin embargo se debe aclarar que estas concentraciones son tóxicas a nivel celular, y no en el ser humano.

Por consecuencia nos hemos planteado la siguiente interrogante ¿Podemos comprobar aplicando el bioensayo con *Artemia franciscana* que estas plantas presentan citotoxicidad? Brindando un aporte teórico-experimental que afirme, que las plantas medicinales no son inocuas por ser Naturales.

JUSTIFICACIÓN

Esta investigación tiene como fin ayudar a la población que utiliza estas plantas medicinales; *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.*, como medicina natural recopilando información de su uso adecuado y sus efectos secundarios, para que no continúe la creencia de que la medicina natural es inofensiva por ser natural.

Cabe destacar que las terapias basadas en procedimientos tradicionales son relativamente inocuas, si se aplican apropiadamente. Debido que las plantas seleccionadas, no presentan estudios que respalde su efecto tóxico y margen de seguridad (DL_{50}), es importante realizar las pruebas que nos proporcionen esta información.

Aplicando el Bioensayo *Artemia franciscana* se determinó de manera cuantitativa que los extractos de las especies seleccionadas, son capaces de provocar la muerte al 50% de los organismos utilizados como bioindicadores, así mismo se indicó la concentración a la que se presenta mayor y menor actividad citotóxica.

Por esta razón se considera que el presente estudio beneficiará en el ámbito de la ciencia, así como a los profesionales de la Salud que se desempeñan en el área de la Fitoterapia. Por otro lado cabe señalar que los valores obtenidos de DL_{50} no advierten una toxicidad como tal en humano, sino que son indicadores de toxicidad a nivel celular que puede orientar investigaciones más amplias y específicas.

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

Objetivo general:

- ✓ Determinar DL_{50} aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana*, en las especies vegetales *Citrus aurantium*, *Ruta Chalepensis*, *Eucalyptus camaldulensis* laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017.

Objetivos específicos:

1. Identificar metabolitos secundarios presentes en los extractos etéreos, alcohólicos y acuosos de las especies vegetales, laboratorio de química 101.
2. Aplicar el método de regresión lineal para determinar DL_{50} en los extractos de las especies vegetales
3. Comparar según los resultados que especie vegetal presenta mayor actividad citotóxica según las DL_{50} obtenidas.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

Sánchez, L. Neira, A. (2005) **BIOENSAYO GENERAL DE LETALIDAD EN Artemia salina, A LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE Psidium guajava. L y Psidium guineense. Sw.** El estudio se centró en la evaluación y verificación de la letalidad de las fracciones acetato de etilo, obtenida de los extractos etanólicos de los frutos en estado de madurez, verde y pintón, utilizando la cáscara y pulpa de las especies guayaba (*Psidium guajava L*) y Choba (*Psidium guineense Sw*). La valoración se llevó a cabo mediante el bioensayo en *Artemia salina*, a través del cual, se evidencia el siguiente proceso: determinar la concentración letal 50 (CL50) utilizando el medio artificial a Ph 7-8, burbujear con el fin de saturar de oxígeno la solución, controlar la eclosión de los huevos a 25 °C después de 48 horas, preparar la solución madre y las de trabajo a concentraciones de 1500, 1000, 500, 100, 10 g/ml, control positivo estricnina a 80, 70, 60, 50 g/ml, blanco solvente etanol a 80 g/ml. El ensayo biológico se realizó siguiendo las metodologías propuestas por Gualdrón, R (1994); Cytel (1995); Martínez, C (1999) y McLaughlin, J (1997).

Naranjo, J. (2009) **Evaluación fitoquímica de extractos naturales de Eucalyptus citriodora y Pinus caribaea con actividad biocida.** Se presenta el estudio fitoquímico de dos extractos naturales obtenidos de las plantas *Eucalyptus citriodora* Hook y *Pinus caribaea* Morelet, ambas con actividad biocida demostrada in vitro contra microorganismos que pueden ocasionar biodeterioro del patrimonio cultural. Para la identificación cualitativa de los metabolitos secundarios, se siguió la metodología establecida por el Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba. Se detectaron varios grupos de compuestos, entre los cuales figuran alcaloides, cumarinas, flavonoides, fenoles, taninos, terpenos y esteroides. Estos pueden ser los responsables de la actividad biológica demostrada en los estudios previos.

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

Barboza, J. Hilje, Luko; Durón, Julio; Cartín, Víctor; Calvo, Marco **Fagodisuasión de un extracto de ruda (*Ruta chalepensis*, Rutaceae) y sus particiones sobre larvas de *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae)** Revista de Biología Tropical, vol. 58, núm. 1, marzo, 2010, pp. 1-14. Se identificaron los principales grupos de metabolitos secundarios presentes, los cuales correspondieron a alcaloides, cumarinas, flavonoides, taninos, saponinas, esteroides y/o triterpenos. Asimismo, mediante las cromatografías de capa fina se determinó con claridad la presencia de la rutina en el extracto crudo, así como en la partición acuosa.

Pino y Jorge (2010), **Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales.** Este artículo pretende divulgar entre los investigadores de nuestro país las nociones fundamentales relacionadas con el bioensayo de *Artemia* (*Artemia* spp.). Se recogen los aspectos biológicos generales de este organismo, las distintas variantes experimentales del ensayo y sus posibles aplicaciones, así como las ventajas y desventajas de esta prueba. Se exponen ejemplos de los avances logrados con su utilización, promoviendo su uso entre ecotoxicólogos y químicos de productos naturales, fundamentalmente en el campo del descubrimiento y desarrollo de nuevos plaguicidas de origen natural. <http://scielo.sld.cu>

Salazar, F. (2010) **Tamizaje Fitoquímico en las hojas frescas de laurelillo [*Cordia inermis* (Mill.) I. M. Johnst.]. Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos. UNAN-León. Agosto – Octubre 2010.** En el extracto etéreo de las hojas frescas se logró determinar por análisis fitoquímico la presencia de triterpenos y esteroides, agliconas de flavonoides. En el extracto alcohólico se logró determinar la presencia de compuestos reductores, triterpenos y esteroides. En el extracto acuoso se determinó la presencia de saponina, compuestos reductores y taninos gálicos.

En 2010, Pérez, Picado y Reyes de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN-León, Facultad de ciencias químicas aplicaron un ensayo para evaluar la **Actividad citotóxica del aceite esencial presente en la hoja de *Ocimum basilicum* (albahaca) mediante el bioensayo con *Artemia salina*.** Se determinó por

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

medio del bioensayo de *Artemia salina*, a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, que el aceite esencial presente en la hoja de *Ocimum basilicum* presenta actividad citotóxica tanto a las 6 como a las 24 horas de exposición ya que los valores obtenidos de la Dosis Letal media (DL_{50}) son inferiores a 100ppm (49.81 y 6.87 ppm respectivamente). La toxicidad que presenta es crónica y no aguda.

Rodríguez, Pereira, Vega. (2010) **Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas y tallo de *Colubrina arborescens M.*** Se realizó el estudio fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de la *Colubrina arborescens M.* con el propósito de contribuir al conocimiento, con base científica, de los componentes presentes en ellos, de utilidad en la posible elaboración de productos farmacéuticos. Para realizar el tamizaje fitoquímico se emplearon técnicas simples, rápidas y selectivas, que requirieron un mínimo de equipamiento y de reactivos para las determinaciones de cada compuesto. Se comprobó la alta diversidad de metabolitos secundarios presentes en la *Colubrina arborescens M.* entre ellos: alcaloides, cumarinas, saponinas, flavonoides, azúcares reductores, triterpenos, esteroides, antocianidinas y quinonas, lo que fundamenta su empleo en la cura de diversas afecciones. quimicaviva@qb.fcen.uba.ar En el 2015 Cruz y Gutiérrez de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Facultad de Ciencias e Ingenierías, realizaron una **Evaluación fitoquímica de los metabolitos secundarios para la determinación de la DL_{50} , en la raíz de la especie vegetal mata de piedra (*anthurium cubense*).** A través de los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico de la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense*, se logró comprobar la presencia de metabolitos secundarios tales como Cumarinas, Alcaloides y Esteroides. Según escala de toxicidad planteada por el Programa iberoamericano de ciencias y tecnologías para el desarrollo CYTED, la DL_{50} de la raíz de la especie vegetal *Anthurium cubense* está en escala de extremadamente tóxico.

Aristizábal, J (2011) **Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de las cáscaras y semillas de tres especies de cítricos contra el hongo fitopatógeno**

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

Fusarium roseum. Se utilizó éter de petróleo para obtener los extractos apolares, y etanol para obtener los extractos polares. Posteriormente se realizaron pruebas químicas preliminares y cromatografías en capa delgada para caracterizar los metabolitos secundarios presentes en los extractos.
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8842/tesis787.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Cazar, M. Villena, P. Parra, J. Espinoza, V. Larriva, G. Caldas, A. (2014) **Eficacia de extracto etanólico de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) en el control de *Alternaria sp.* en cultivos de col y patata.** MASKANA, Vol. 5, No. 1, 2014. El efecto inhibitorio de extractos etanólicos ante *Alternaria sp.* en cultivos de invernadero de col (*Oleracea brassica*) y crecimiento in-situ de patatas (*Solanum tuberosum*) fue evaluado. Se prepararon extractos a partir de hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) por el método Soxhlet. El análisis fitoquímico de los extractos reveló la presencia de cantidades considerables de quinonas, lactonas, cumarinas y bajas cantidades de triterpenos y esteroides.

Universidad Nacional San Agustín de Arequipa **Actividad toxicológica de la fracción alcaloidea de los tallos de la *Jatropha macrantha m. Arg.* (Huanarpo macho) en *Artemia salina* (brine shrimps).** renee m. Condori Apaza evelyn k. paredes paredes. En el transcurso del presente estudio de investigación el ensayo de letalidad en *Artemia Salina* es muy usualmente utilizado para evaluar la bioactividad de extractos de plantas y muy en especial en especies de plantas de medicina tradicional, por tanto mediante la DL_{50} se logró obtener la dosis letal de las fracciones alcaloideas siguientes; con respecto a la primera fracción alcaloidea EEAT = 123.02 ppm y la segunda fracción alcaloidea EC12 = 239.88 ppm. En el ensayo de letalidad por medio de las artemias salinas en el estadio de nauplio que es el más adecuado para este análisis podemos decir que el posible mecanismo por el cual actúan los extractos de la fracción alcaloidea es a través de la bomba sodio y potasio ya que está presente en toda célula viva.

2.1. *Citrus aurantium L.* (Naranja agria)

Tabla 1. Clasificación taxonómica

Nombre común	Naranja agria
Nombre científico	Citrus Aurantium
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Geraniales
Familia	Rutaceae
Sub-familia	Citroideae
Tribu	Citreae
Genero	Citrus
Especie	Aurantium

Fuente: wikipedia.org/wiki/Citrus_x_aurantium

Historia

No es nativo de nuestras tierras, tenemos su cuna en el Sureste Asiático donde fue llevado por los árabes a Europa, durante la ocupación de España. Luego, fue introducido a nuestro continente por los españoles durante la colonia. (Brüssel, 1998: 288) El naranjo agrio se da en toda Nicaragua. Crece cultivada en patios y áreas rurales.

Además, de sus propiedades medicinales, también tiene otros usos. Forma parte de la flora doméstica y también es cultivado en huertos y viveros como “patrón” para la injertación de otras especies de cítricos. Popularmente sus frutos son utilizados como condimentos y en la preparación de comidas, dulces y frescos. (Brüssel, 1998: 287)

Determinación de DL₅₀, aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

Descripción botánica

Árbol leñoso de 3-10 m de alto, tronco grueso, erecto, corono compacta, corteza suave, café, ramas verdes, espinas no muy puntiagudas de 2-8 cm de largo. Hojas compuestas, siempre verdes, aromáticas, alternas, peciolo alado, ancho, 6-13 cm de largo, finalmente dentadas, con pequeñas glándulas de aceite. Flores muy olorosas, individuales o grupos en las axilas foliares 3-4 cm de ancho. Frutos en baya, redondos u oblongo-ovalados, 7-8 cm de ancho, pericarpio rugoso, grueso, amargo, con glándulas de aceite; 10-12 segmentos con paredes amargas y pulpa acida, varias semillas. (Girón y Cáceres, 1996:283)

Partes utilizadas

Las flores, los frutos (pericarpio, frutos inmaduros) y eventualmente las hojas. (Arteche G, Alejandro; Vanalocha V, Bernat & Martínez C, Ruth, 1998:337)

Composición química

- Flores: 0.05-0.5% de aceite esencial (´neroli´): limoneno, linalol, nerol, antranilato de metilo.
- Pericarpio: flavonoides responsables del sabor amargo (naringósido, neohesperidósido) y no amargos (Rutósido, hesperidósido, sinensetósido); aceite esencial (´curacao´), 2% limoneno (90%); furanocumarinas; sales minerales, abundante pectina, acidos cítricos, ascórbico y málico.
- Hojas: Aceite esencial (´petitgrain´), 0.2-0.4%: hidrocarburos terpénicos (limoneno), alcoholes (linalol, nerol, antranilato de metilo, betaína, estaquidrina), flavovoides (hesperidina), limonina. (Arteche et al.,1998: 338)

Farmacología

-Flores: el aceite esencial es tranquilizante, hipnótico suave, espasmolítico,

Determinación de DL₅₀, aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

- Pericarpio: el aceite esencial tiene una acción antiespasmódica, ligeramente sedante hipnótica; los flavonoides le confieren propiedades vitamínicas P (aumenta el tono de las paredes venosas, reduce la permeabilidad y aumenta la resistencia capilar. Los principios amargos actúan como tónico, aperitivo, eupéptico y colagogo. La pectina le confiere propiedades demulcentes e hipocolesterolemiantes. La corteza de naranja amarga, por su característico olor y sabor (amargo-aromático), constituye uno de los mejores correctores organolépticos, para enmascarar los olores y sabores desagradables de otras drogas. (Arteche et al., 1998: 338)

Indicaciones

-Pericarpio: inapetencia, dispepsias hiposecretoras, espasmos gastrointestinales, disquinesias hepatobiliares, colecistitis, diarreas, síndrome del intestino irritable. Varices, flebitis, hemorroides, fragilidad capilar, edemas, hiperglicemias.

-Flores, hojas: Ansiedad, insomnio, distonías neurovegetativas, tos nerviosa. (Arteche et al., 1998: 338)

Contraindicaciones

Salvo indicación expresa, recomendamos abstenerse de prescribir aceites esenciales por vía interna durante el embarazo, la lactancia, a niños menores de seis años o pacientes con gastritis, úlceras gastroduodenales, síndrome del intestino irritable, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, hepatopatías, epilepsia, Parkinson u otras enfermedades neurológicas.

No administrar, ni aplicar tópicamente a niños menores de seis años ni a personas con alergias respiratorias o con hipersensibilidad conocida a éste u otros aceites esenciales.

Determinación de DL₅₀, aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

No prescribir formas de dosificación con contenido alcohólico para administración oral a niños menores de dos años ni a consultantes en proceso de deshabitación etílica. (**Arteche et al., 1998: 338**)

Toxicidad

No superar la dosis de 5 gotas por toma, ni administrar más de tres tomas al día., exceder de la dosis podría causar entumecimiento en la lengua. (**Arteche et al., 1998: 338**)

El contacto con el zumo y posterior exposición al sol puede desencadenar fenómenos de fotosensibilidad causados por bergapteno. (**Girón y Cáceres, 1996:286**)

Posología

-Infusión de hojas: 5-20 g/l. infundir 15 minutos, 2 - 3 tazas al día.

-Infusión de flores: 2 g/taza. Infundir 10 minutos, 2 - 3 tazas al día.

-Decocción (pericarpio): 1-2 cucharadas de postre por taza, una a tres al día.

-Agua de azahar: una cucharadita, 1 - 3 veces al día, como complemento de infusiones o decocciones.

-Extracto Fluido (1:1): 30-50 gotas, tres veces al día.

-Jarabe (5-10% de extracto fluido de pericarpio): 2 - 4 cucharadas soperas al día.

-Tintura (1:5): 50-100 gotas, 1- 3 veces al día.

-Aceite esencial: 2-4 gotas, 1 -3 veces al día. (**Arteche et al., 1998: 338**)

2.2. *Ruta chalepensis L.* (Ruda)

Tabla 2. Clasificación taxonómica

Nombre común	Ruda
Nombre científico	<i>Ruta chalepensis</i>
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Sapindales
Familia	Rutaceae
Sub-familia	Rutoideae
Genero	ruta
Especie	Chalepensis

Fuente: wikipedia.org/wiki/Ruta_chalepensis

Historia

En Nicaragua es cultivada en los patios y jardines, ya que también se le considera una planta ornamental. Según nuestro pueblo, requiere de muchos cuidados, pues se le considera muy sensible a los cambios bruscos de temperatura. También se le atribuyen virtudes mágicas, tales como la de traer buena suerte en los negocios. Nuestras mercaderes acostumbran a llevar un cogollo de Ruda en su delantal para la buena suerte en su negocio (Brüssel, J, 1998: 295).

Descripción Botánica

Hierba perenne hasta 1m de alto, fuertemente olorosa, erecta, glauca. Hojas alternas, doblemente divididas, segmentos angostos, oblongas u obovadas, 1.2 cm de largo. Redondeadas en el ápice, enteras o lobuladas. Flores amarillo-verdoso, pequeña; pétalos de 7-9 mm de largo, es espigas terminales. Capsulas de semillas ovoides, 7-9 mm de ancho, con lóbulos puntiagudos. (Girón y Cáceres, 1996:325)

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

Parte utilizada

Hojas (Morales y Uriarte, 1999:54)

Composición química

Si se le realiza un tamizaje fitoquímico a las hojas pueden presentar alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, aceite volátil, esteroides y triterpeno, contiene además rutina (1-2%), aceite amargo (metil-n-nonilcetona, metil-n-heptilcetona), cumarinas (bergapteno, chalepina, psoraleno, rutaringlicósido) y alcaloides derivados de acridona, quinolina y furanoquinolina. (Skimmianina). Las raíces contienen alcaloides y cumarinas. La semilla seca contiene 26.4% de proteína y 33.2% de grasa (Girón y Cáceres, 1996:326)

Farmacología

El Rutósido le confiere propiedades venotónicas, vasoprotectoras; el aceite esencial, una acción emenagoga que puede llegar hacer abortiva según las dosis, vermífuga y rubefaciente-revulsiva, en uso externo. Las furanocumarinas son responsables de su acción espasmolítica. (Arteche et al., 1998: 406)

Indicaciones

Insuficiencia venosa: varices, hemorroides; amenorrea, helmintiasis, gastritis, úlceras gastroduodenales, espasmos gastrointestinales. En uso externo está indicada en inflamaciones osteoarticulares, eczemas y psoriasis. (Arteche et al., 1998: 406)

Por sus propiedad aperitiva, aromatizante, espasmolítica, eupéptica, tónica, y vasoactiva el uso oral de las hojas está indicado en el tratamiento de anorexia, dispepsia, tos nerviosa, edema, fragilidad capilar y várices. (Girón y Cáceres, 1996:327)

Las infusiones de las ramitas tiene el siguiente uso: flebitis, estimula la circulación periférica y disminuye la presión arterial de la sangre. La infusión es capaz para

Determinación de DL₅₀, aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

combatir la artritis y en problema de ácido úrico. Para combatir las lombrices intestinales, para aliviar afecciones nerviosas, histerismo, epilepsia, calambres, dolores de cabeza, vértigos, congestión, debilidad de la vista. **(Sosa, 1997:40)**

Contraindicaciones

Salvo indicación expresa, recomendamos abstenerse de prescribir aceites esenciales por vía interna durante el embarazo, la lactancia, a niños menores de seis años o a pacientes con gastritis, úlceras gastroduodenales, síndrome del intestino irritable, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn hepatopatías, epilepsia, Parkinson u otras enfermedades neurológicas.

No administrar, ni aplicar tópicamente a niños menores de seis años ni a personas con alergia respiratoria o con hipersensibilidad conocida a éste u otros aceites esenciales. Evitar la exposición solar tras su aplicación tópica, para evitar la aparición de dermatitis por fotosensibilización.

No prescribir formas de dosificación orales con contenido alcohólico a niños menores de dos años ni a consultantes en proceso de deshabituación etílica. **(Arteche et al., 1998: 406)**

Toxicidad

Gastroenteritis, tumefacción de lengua y faringe, sialorrea, excitación seguida de abatimiento, vértigos, confusión mental, temblores, convulsiones, metrorragias, nefritis, lesiones hepática, y del intestino delgado e incluso la muerte por depresión cardiorrespiratoria. Tener en cuenta el contenido alcohólico del extracto fluido y de la tintura. **(Arteche et al., 1998: 406)**

El contacto con la planta o con el aceite puede producir eritema, dermatitis, hinchazón y desecación; internamente puede causar dolor del epigastrio, náuseas, vómito, salivación, disminución del pulso y enfriamiento de las extremidades; la sobre

Determinación de DL₅₀, aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

dosis puede ser mortal. En embarazadas puede producir hemorragia y aborto. **(Girón y Cáceres, 1996:327)**

Posología

Infusión al 1%, 1- 3 tazas al día. Verter 1 taza (8oz) de agua hirviendo sobre 1 - 2 cucharaditas de hojas y dejar reposar de 10 a 15 minutos. Cocimiento 1 - 2 cucharaditas de hojas en 1 taza de agua

Polvo: 250 a 500 mg/día, en cápsulas de 50 g

Aceite esencial: 2 gotas al día, en un terrón de azúcar, o en solución oleosa o alcohólica.

Extracto fluido, (1:1): 10-30 gotas, 1 - 3 veces al día.

Tintura (1:10): 30-50 gotas, 2 - 3 veces al día.

Uso externo:

Infusión: 2 a 5 g/l, aplicada en forma de compresa o lavados. **(Arteche et al., 1998: 406)**

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

2.3 *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* (Eucalipto)

Tabla 3. Clasificación taxonómica

Nombre común	Eucalipto
Nombre científico	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Myrdales
Familia	Myrtaceae
Sub-familia	Myrtoideae
Tribu	Eucalyptae
Genero	<i>Eucalyptus</i>
Especie	<i>Camaldulensis</i>

Fuente: wikipedia.org/wiki/Eucalyptus_camaldulensis

Historia

El eucalipto es originario de Australia y Tasmania donde fue descubierto por un estudioso botánico hace más de 300 años. Hace más o menos unos cien años el eucalipto es introducido a América. Hoy en día existen diversas variedades de eucalipto en Nicaragua y en el resto de América. En otros países como España hay grandes empresas que se dedican a solamente a extraer aceite de eucalipto para la producción de medicamentos pastillas, jarabes, pomadas y otros. (Brüssel, 1998:260)

Descripción botánica

Árbol verde de rápido crecimiento que en condiciones favorable puede alcanzar los 100m de altura, es característicos el crecimiento helicoidal de la corteza ya que posee dos tipos de hojas bien diferenciadas en las ramas jóvenes, crecen hojas ovaladas y

Determinación de DL₅₀, aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

opuestas mientras que las características en las hojas alargadas son de forma de haz, tanto las hojas como los tallos y las capsulas florales huelen a esencia y posee un sabor amargo. (Brussel, 1998:210)

Partes utilizadas

Hojas adultas

Composición química

Aceite esencia (1,5 a 3,5 %): hasta un 90% de cienol o eucaliptol (que en su mayor parte desaparece tras el proceso de destilación), monoterpenos (25%) alfa-pineno, p-cimeno, limoneno, telandreno, aldehídos: butiraldehidos, capronaldehido, azuleno, taninos, resina, flavona: eucaliptina, triterpenos derivados de ácido ursolico (2-4%). (Arteche et al., 1998: 209)

Farmacología

El aceite esencial le confiere una marcada acción antiséptica, especialmente sobre las vías respiratorias, tanto en uso interno como por la inhalación o por via rectal (la esencia se elimina por vías respiratorias). Tiene un efecto mucolítico y expectorante, hipoglucemiante, febrífugo, desodorante, antihelmíntico y cicatrizante. (Arteche et al., 1998: 209)

Indicaciones

Por via oral está indicado para tratar afecciones respiratorias como gripe, resfriados, faringitis, bronquitis, asma, rinitis, sinusitis, y diabetes. Se recomienda administrarse tres veces al día en dosis de 2-3 g/tazas de decocción, 0.5-1 g de polvos, 1-3 ml de tintura 1:8 etanol al 35 %; 200-300mg de extracto seco, 20-30 gotas de extracto fluido, 10-30 gotas de jarabe al 10%, 3-9 gotas de esencia.

Tópicamente está indicado para tratar llagas y heridas, eczemas, vulvovaginitis. Se aplica en forma de fricciones para combatir el reumatismo y como inhalaciones y

Determinación de DL₅₀, aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

gargarismos con aceite o pomada para tratar afecciones respiratorias. (Girón y Cáceres, 1996:172)

Contraindicaciones

Referidas al aceites esencial.

No se debe prescribir para administración oral durante el embarazo, lactancia y niños menores de seis años. Tampoco tópicamente para niños menores de dos años o con alergias respiratorias.

Hipersensibilidad a este o a otros aceites esenciales.

Se ha comprobado que estimula la función de los microsomas hepáticos, con lo que se acelera el proceso de catabolismo, por lo que no debe administrarse junto con otras medicaciones.

Está contraindicado cuando existan inflamaciones del tracto gastrointestinal, de las vías biliares o hepatopatías. Es incompatible con medicamentos sedantes analgésicos o anestésicos.

Formas de dosificación con contenido alcohólico (extracto fluido, tintura) evaluar la conveniencia de su administración durante el embarazo, lactancia a niños pequeños o a personas con gastritis úlceras gastroduodenales, síndrome de intestino irritable o colitis ulcerosa. Totalmente contraindicadas durante los procesos de deshabitación etílica. (Arteche et al., 1998: 209)

Toxicología

La esencia: en dosis altas (la dosis terapéutica como expectorante es de 0,06-0,2 ml) o por la existencia de una mayor sensibilidad individual, puede provocar gastroenteritis, hematuria, taquicardia, miosis, cefaleas, broncoespasmos depresión de los centros respiratorios y coma.

Determinación de DL₅₀, aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

El aceite esencial: en tratamientos prolongados puede inhibir la movilidad ciliar.

El eucaliptol es neurotóxico y epileptogeno.

En aplicación tópica, el aceite esencial puede producir dermatitis de contacto.

En caso de prescribir inhalaciones con aceite esencial, practicar previamente un test de tolerancia (aplicar durante 15 segundos y esperar unos 30 minutos). (**Arteche et al., 1998: 209**)

Posología

Uso interno:

Decocción: 3 g de hojas por tazas, hervir un minuto, dejar infundir durante 10 minutos, beber tres tazas al día.

Polvos: 500 mg, 2 – 6 veces al día.

Extracto seco: (5:1) 200 a 300 mg, 2 – 3 veces al día.

Extracto fluido: (1:1) 20 a 30 gotas, 2 – 3 veces al día.

Jarabe (10% de extracto fluido) 30 a 45 g/día.

Tintura (1:10) 50 gotas, 1 – 3 veces al día.

Aceite esencial: 3 - 9 gotas al día, en dosis de 1 - 3 gotas con infusión o sobre un terrón de azúcar.

Capsulas (25-100 mg/caps.), 1 – 3 al día.

Supositorios (10 a 40 mg de esencia/sup), 1 – 3 al día.

Infusión: 10 g/litro.

Aceite esencial: Inhalaciones húmedas (5 - 10 gotas en medio litro de agua hirviendo)

Aerosoles (3 - 5 gotas de aceites esenciales por cada 50 cc de preparado). (**Arteche et al., 1998: 209**)

2.4 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o "Screening" Fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración y precipitación. Debe permitir la evaluación rápida con reacciones sensibles reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados de un tamizaje farmacológico.

Para la medicina moderna se han usado muchas drogas con principios activos medicinales. En resumen, el objetivo del tamizaje es reducir a un número manejable el conjunto de los extractos vegetales para efectuar sobre estos el fraccionamiento guiado por los bioensayos para encontrar el o los compuestos de interés. (Sharapin, 2000)

Diversos métodos de tamizaje fitoquímico están descritos en la literatura algunos evalúan pocos grupos de sustancias en compensación otros evalúan la presencia de compuestos de poco interés como ácidos grasos, azúcares reductores, polisacáridos y mucilagos, la cantidad de material vegetal varia de 5 g a 200 g. la comparación de cinco métodos de tamizaje demostró que el método descrito por CIULEI (1982), y adaptada en el laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Estatal de Campinas-UNICAM, ofrece mayor reproductibilidad, siendo de fácil ejecución, este permite la evaluación rápida, con reacciones sensibles de bajo costo.

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

2.5 Método de CIULEI (1982)

El método de CIULEI consiste en realizar una serie de marchas fitoquímicas preliminares que permiten determinar una amplia variedad de metabolitos presentes en las especies vegetales con interés farmacológico.

Se extrae la droga seca y molida con éter, utilizando un Soxhlet. El residuo se seca y se extrae, en el Soxhlet con Alcohol. Finalmente, la droga se extrae con agua, bajo reflujo. Los extractos etéreo, alcohólico y acuoso se someten a una secuencia de pruebas químicas. (Sharapin, 2000)

2.6 Metabolitos Secundarios

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones. Se denominan *metabolitos primarios*.

Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan *metabolitos secundarios*. (Avalos y Pérez, 2009)

Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas a una familia, o incluso a algunas especies.

2.6.1 Alcaloides

Son sustancias dotadas de una actividad farmacológica potente, sin duda las de mayor interés farmacológico. Se trata de unas sustancias de origen predominantemente vegetal (solo algunos se encuentran en animales) que tienen una reacción básica o alcalina. Ejercen su actividad sobre el sistema nervioso central, excitándolo o deprimiéndolo, y sobre los vasos sanguíneos, actuando como hipertensores o hipotensores.

Su gran actividad exige una gran precaución en su empleo por causar intoxicaciones en muchas ocasiones mortales actualmente se conocen más de 4 mil Alcaloides, aunque su presencia probablemente queda reducida a menos del 10% de las especies botánicas. Algunas familias botánicas destacan por su riqueza en alcaloides: *buxáceas*, *amarilidáceas*, *euforbiáceas*, *leguminosas*, *liliáceas*, *papaveráceas*, *ranunculáceas*, *solanáceas* y *asteráceas* entre otras.

Entre los alcaloides tóxicos presentes en las especies botánicas se encuentra la Nicotina: presente entre el 1 y el 10 % en las hojas de tabaco (*nicotiana tabacum L.*) caracterizándose su acción toxica (síndrome nicotínico) con irritación de las mucosas y a nivel cutáneo directo, aumento de la motilidad y de las secreciones (con diarrea, congestión y edema), producción de ateromas y una actividad ganglioplégica. (Debenedetti y Wilson, 2002)

2.6.2 Flavonoides

Los flavonoides son los pigmentos amarillos derivados de la fenil-venzo y Pirona o fenil cromosoma. Se da mucho en el reino vegetal, normalmente en forma de Heterósidos. Son una estructura molecular del tipo C6-C3-C6 son una familia muy

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Existen 6 clases principales, las chalconas, las flavonas, los flavonoles, las antocianidinas, y los taninos condensados, y otras dos más, las Antonas y las Auronas.

De todos ellos, los que tienen mayor interés farmacológico son dentro del grupo de los Flavonoides son: flavonas, flavonoles y flavononas y sus correspondientes heterosidos y los antocianosidos. Muchos de ellos presentan actividad sobre el sistema vascular como por ejemplo el Rutósido o los Citroflavonoides, llamados así por haber sido aislados en especies pertenecientes al género Citrus.

Son compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las plantas superiores, principalmente en las partes aéreas: hojas, flores y frutos: las principales familias que las tienen son rutáceas, poligonáceas, compuestas y umbelíferas. En general son protectores capilares y venosos, favoreciendo la correcta síntesis del colágeno. Entre otras destacan las siguientes: acción antioxidante, acción vitamínica P (vasoprotectores-capilarotropos), diuréticos (inhiben las fosfatasas renales), antiespasmódicos, hemostáticos y tonificantes de la circulación venosa. **(Debenedetti y Wilson, 2002)**

2.6.3 Carotenoides

Los carotenoides son compuestos naturales presentes en diversas estructuras de plantas y en gran variedad de animales, algas, hongos y bacterias. Estos pigmentos son responsables del color de flores y frutos (para favorecer la polinización y dispersión de semillas), o de estructuras animales como las plumas y picos de algunos pájaros, el exoesqueleto de crustáceos y el musculo o la piel de algunos peces.

Son considerados compuestos indispensables para la vida, fundamentalmente debido a las funciones que llevan a cabo en relación con la fotosíntesis (captación de

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

luz, foto protección) los antioxidantes naturales presente en los vegetales y algunos animales han sido estudiados por su papel en la protección de diversas enfermedades como ciertos tipos de cáncer, enfermedad cardiovascular.

Los carotenoides son tetra terpenos constituidos por múltiples unidades isoprenoides con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos. Son moléculas lipofílicas, con nula solubilidad en agua. La propiedad de absorber luz se deriva de la presencia de siete o más enlaces dobles conjugados con posibilidad de absorber luz visible con colores que van del amarillo al rojo. (Debenedetti y Wilson, 2002)

2.6.4 Taninos

Son sustancias de origen vegetal carentes de nitrógeno en su molécula y solubles parcialmente en agua y en alcohol, cuya característica más evidente es su capacidad para desnaturalizar las proteínas provocando al entrar en contacto con ellas coagulación y consiguiente precipitación. Esta propiedad se traduce farmacológicamente en un efecto astringente, antiinflamatorio y hemostático.

Los taninos están ampliamente repartidos entre las plantas, y parece ser que juegan un papel disuasorio para insectos y herbívoros, ya que dotan de sabor desagradable a las partes de la planta que los contienen. También son muy frecuentes en los frutos inmaduros, siendo los responsables del sabor astringente y desagradable de estos. (Debenedetti. y Wilson, 2002)

2.6.5 Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas.

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

Entre los triterpenos se encuentran esteroides y esteroles derivados del escualeno, una molécula de cadena lineal de 30C de la que derivan todos los triterpenos cíclicos. Los esteroides que contienen un grupo alcohol, y es el caso de casi todos los esteroides vegetales, se denominan esteroles. Los más abundantes en plantas son el estigmasterol y el sitosterol, que sólo difiere del estigmasterol en la ausencia del doble enlace entre 22C y 23C.

La principal función de los esteroles en plantas es formar parte de las membranas y determinar su viscosidad y su estabilidad. Algunos esteroles tienen funciones protectoras frente a insectos como en el caso de la ecdisona aislada del helecho común. (Avalos y Pérez, 2009)

2.6.6 Emodinas

Es una antraquinona usada tradicionalmente como laxante desde hace mucho tiempo se conocen sus efectos anti-bacterianos, anti-inflamatorios, anti-ateroescleróticos, vaso relajantes e inmunosupresores, además a lo largo de las últimas décadas, numerosos estudios han demostrado que la EM es un agente activo contra el cáncer. Las antraquinonas inhibe algunas proteínas quinasas como CK (caseína quinasa, implicada en el control del ciclo celular, reparación del ADN y otros procesos celulares, P561ck (proteína tirosina quinasa específica de leucocitos), Here-2/neu (protooncogen del cromosoma 17 que codifica una glicoproteína con una actividad tirosina quinasa) y Janus (JAK, tirosina quinasa no específica destinada a la regulación de la expresión genética) evitando la proliferación de las células cancerosas en muchos tipos de cáncer: mama, hepático, pulmón, páncreas y leucemia.

No presenta efectos secundarios importantes aunque en ciertas ocasiones puede ocasionar con uso prolongado en algunos pacientes, al igual que pasa con otras antraquinonas, náuseas o vómitos, provocando la disminución del apetito, diarreas repentinas.

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

2.6.7 Antracenosidos

Desde tiempo muy antiguos se conocían distintas especies vegetales como por ejemplos, son cáscara sagrada, frángula, ruibarbo, áloe, cana fistula, que presentan constituyentes con acción farmacológica muy definida como es la de laxante o purgante.

Al investigar su composición química se estableció en todos ellos, la presencia de compuesto de naturaleza antracénica. Como los heterósidos (denominados antracenosidos), por lo general se hidroliza fácilmente, los primeros investigadores obtenían los productos de hidrólisis más que los heterósidos primarios.

Los antracenosidos se consideran laxantes estimulantes porque estimulan la secreción a la luz intestinal de manera que esa secreción de electrolitos produce un arrastre de agua y un aumento del líquido intestinal que es el que estimula el peristaltismo (bomba Na/K-ATP-asa). Los laxantes se clasifican en: formadores de masa (aumentan el tamaño del bolo intestinal) osmóticos, estimulantes y lubricantes.

2.7 Tipos de extracción

2.7.1 Extracción por equipo Soxhlet

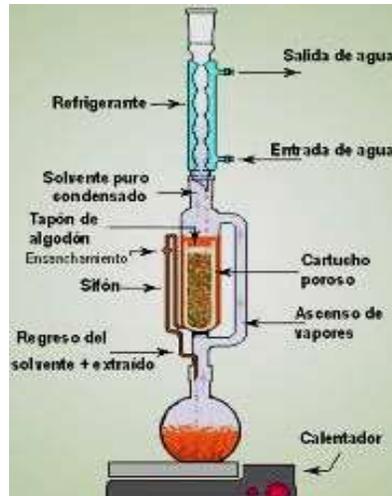
Lo que hace el extractor Soxhlet es realizar un sinfín de extracciones de manera automática con el mismo solvente que se evapora y condensa llegando siempre de manera pura al material.

La extracción soxhlet se fundamenta en las siguientes etapas:

- Colocación del solvente en un balón.
- Ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo.
- El condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior.

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

- Ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo que vuelve el solvente con el material extraído al balón.
- Se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesarias para que la muestra quede agotada. (Salazar y Jaime, 2011: 45)



Fuente: (Salazar y Jaime, 2011: 45)
Figura 1. Equipo Soxhlet

2.7.2 Extracción por reflujo

Es una técnica para extraer y preservar los compuestos esenciales en los extractos de especies vegetales; está formado por un condensador que es usado para condensar y retener los componentes volátiles. Durante el reflujo la vaporización de la mezcla que se hierve es seguida por la condensación de estos vapores sobre las paredes interiores de un condensador, este se refrigera con el agua que fluye por una camisa envolvente a su alrededor.

Esta técnica nos permite retener los compuestos volátiles aromáticos como los aceites esenciales. Algunas veces el reflujo no puede ayudar con la desnaturalización de ciertos compuestos sensibles al calor y al recalentamiento. (Salazar y Jaime, 2011: 46)

2.8 Bioensayo

Los bioensayos son herramientas ampliamente utilizadas en el campo de la ecotoxicología, la cual se ocupa del estudio del efecto y destino de los agentes tóxicos de origen antropogénico a los ecosistemas acuícolas y terrestres. Estas pruebas de toxicidad permiten realizar mediciones experimentales del efecto de agentes químicos o físicos en sistemas biológicos, estableciendo relaciones concentración-respuesta bajo condiciones controladas en terreno o en laboratorio.

Al implementar bioensayos y pruebas de toxicidad es necesario efectuar su estandarización, que consiste en establecer la sensibilidad de las especies y la reproducibilidad del experimento frente a un tóxico de referencia. Lo anterior es útil para asegurarse que la respuesta de la población expuesta a cierto agente tóxico se deba al efecto de éste y no a variaciones de la sensibilidad de los organismos. (Larraín 1995)

2.9 Artemia Franciscana

La *Artemia franciscana* es una especie primitiva de crustáceo perteneciente al orden anostraca, distribuida en los lagos de agua salada y mares de todo el mundo y está adaptada a sobrevivir en cuerpos de agua que sufren grandes variaciones de sal que van desde 5 a 150 ups.

Esta especie es capaz de depositar huevos que constan de un quiste integrado por aproximadamente 4000 células, las cuales le confieren gran resistencia en condiciones extraordinarias de estrés fisiológico. Mientras los huevos permanezcan bajo condiciones de estrés, estarán metabólicamente inactivos (Criptobiosis); una vez dadas las condiciones ambientales específicas, los huevos reanudan su metabolismo y desarrollo, hasta finalmente emerger en forma de nauplios. (Gómez, 2011)

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

La *Artemia franciscana* ha sido utilizada para la realización de diversas investigaciones por ser un efectivo indicador para bioensayos, es utilizada principalmente para valorar contaminantes tóxicos en agua marina, entre los indicadores usados para medir dicha toxicidad se pueden evaluar: la alteración de la velocidad de nado de los nauplios (estado larvario de la *Artemia*), mortalidad en soluciones con el toxico entre otros. También se realizan bioensayos con *Artemia* para valorar toxicidad celular. (Manfra, 2015.)

Es importante recalcar que la disponibilidad del organismo, el bajo costo del bioensayo la sencillez de la técnica y el uso de instrumentos poco sofisticados le brindan una gran ventaja a *Artemia* para su uso en la validación de medicamentos naturales. (Manfra, 2012)

Tabla 4. Parámetros y Criterios para la eclosión y mantenimiento de *Artemia Franciscana*

PARÁMETROS	CRITERIO
Temperatura	La temperatura deberá mantenerse en el intervalo de 25–30°C. A temperatura por debajo de 25°C la eclosión es más lenta y por encima de 30°C los quistes detienen su metabolismo irreversiblemente.
Salinidad y pH	Por razones de conveniencia práctica, usado mayormente el agua de mar para la eclosión de los quistes. Sin embargo, a una salinidad de 5‰ aumenta la tasa de eclosión.
Oxígeno	A fin de lograr una eclosión máxima (tanto en tasa como en eficiencia), es recomendable mantener unos niveles de oxígeno por encima de 2 mg/L.
Densidad de quistes	Es recomendable no sobrepasar densidades de 5 gramos de quistes por litro.
Iluminación	La iluminación de los quistes, al menos durante las primeras horas tras su hidratación es esencial para lograr una eclosión máxima. Es aconsejable para obtener unos resultados óptimos, mantener una iluminación de aproximadamente unos 2000 lux.

Fuente: Determinación de la toxicidad aguda (CI_{50}) del extracto de polvillo de carbón frente a larvas de *Artemia franciscana*.

2.10 Regresión Lineal

Expresándolo en forma simple, la regresión lineal es una técnica que permite cuantificar la relación que puede ser observada cuando se grafica un diagrama de puntos dispersos correspondientes a dos variables, cuya tendencia general es rectilínea; relación que cabe compendiar mediante una ecuación “del mejor ajuste” de la forma:

$$y = a + bx \text{ (ecuación 1)}$$

En esta ecuación, “y” representa los valores de la coordenada a lo largo del eje vertical en el gráfico (ordenada); en tanto que “x” indica la magnitud de la coordenada sobre el eje horizontal (abscisa). El valor de “a” (que puede ser negativo, positivo o igual a cero) es llamado el intercepto; en tanto que el valor de “b” (el cual puede ser negativo o positivo) se denomina la pendiente o coeficiente de regresión. (Pauly, 1983)

2.10.1 El coeficiente de correlación momento producto

Para estimar la bondad con que se ajustan los puntos experimentales a una línea recta, se calcula el coeficiente de correlación momento-producto, r . para simplificar a este dato estadístico se le denomina «coeficiente de correlación» debido a que en las ciencias cuantitativas es con mucho el tipo de coeficiente de correlación más usado. El valor de r viene dado por:

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}} \text{ (ecuación 2)}$$

En algunos casos los valores de r obtenidos en el análisis son normalmente muy altos, de manera que un valor calculado, junto con la gráfica de calibrado, suele ser a menudo suficiente para asegurar al analista que de hecho ha obtenido una relación

lineal útil. Sin embargo, en algunas circunstancias, se obtienen valores de r mucho más bajos; en estos casos será necesario emplear un contraste estadístico adecuado para ver si el coeficiente de correlación es realmente significativo, teniendo en cuenta el número de puntos usados en el cálculo. El método más simple de hacer esto es calcular un valor de t , usando la siguiente ecuación:

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (\text{ecuación 3})$$

El valor de t calculado se compara con el valor de t tabulado al nivel de significación deseado, utilizando un contraste t de *dos colas* y $(n-2)$ grados de libertad. La hipótesis nula en este caso es que no existe correlación entre X e Y . si el valor calculado de t es mayor que el valor tabulado, se rechaza la hipótesis nula y se concluye en tal caso que existe una correlación significativa.

2.10.2 La recta de regresión de Y sobre X

Supone que existe una relación lineal entre la señal analítica (y) y la concentración (x), se muestra como calcular la «mejor» línea recta a través de los puntos de la gráfica de calibrado, cada uno de los cuales está sujeto a un error experimental. Ya que se ha supuesto que todos los errores se encuentran en y , ahora se trata de buscar la recta que minimice las desviaciones en la dirección y , entre los puntos experimentales y los calculados por la línea.

Ya que algunas de estas desviaciones serán positivas y algunas negativas (conocidas técnicamente como los residuos de y) es razonable intentar minimizar la suma de los cuadrados de los residuos, debido a que estos cuadrados serán todos positivos. La línea recta buscada se calcula basándose en este principio: como

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

resultado se encuentra que la línea debe pasar por el «centro de gravedad» de los puntos (\bar{X}, \bar{y}) .

Se puede demostrar que la recta de mínimos cuadrados viene dada por:

Pendiente de la recta de mínimos cuadrados

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Ordenada en el origen de la recta de mínimos cuadrados:

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (\text{Ecuación 5})$$

La línea determinada por las ecuaciones anteriores se conoce como recta de regresión de Y sobre X, es decir, la recta que indica como varía Y cuando X se ajusta a los valores elegidos. Es muy importante hacer constar que la recta de regresión de X sobre Y no es la misma recta (excepto en el caso muy improbable en que todos los puntos caigan sobre la línea recta, exactamente cuándo $r=1$ ó $r=-1$).

2.8.3 Errores en la pendiente y ordenada en el origen de la recta de regresión

Los errores aleatorios en los valores de la pendiente y ordenada en el origen son importantes, considerándose ahora las ecuaciones utilizadas para calcularlos. En primer lugar se debe calcular el estadístico $S_{y/x}$, que estima los errores aleatorios en la dirección de Y.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

Donde los valores de \hat{y}_i son los puntos sobre la recta de regresión calculada correspondiente a los valores individuales de X , es decir, los valores de Y «ajustados». El valor de \hat{y}_i para un valor de X dado se calcula rápidamente a partir de la ecuación de regresión.

2.10.4 Calculo de una concentración y su error aleatorio

Una vez que han sido determinadas la pendiente y la ordenada en el origen de la recta de regresión, es fácil calcular la concentración (valor de X) a partir de un valor dado de Y utilizando la ecuación de la regresión $Y = bx + a$. sin embargo, también será necesario estimar el error asociado a la concentración calculada.

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Ecuación 7})$$

En esta ecuación Y_0 es el valor experimental de y a partir del cual se determina el valor de la concentración X_0 , S_{x_0} es la desviación estándar estimada de X_0 , y los otros símbolos tienen su significado habitual. En algunos casos un analista puede realizar varias réplicas para obtener el valor de Y_0 , lo que se representa en la ecuación como m .

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

Hipótesis

Se comprobara que las especies seleccionadas como muestra de estudio: *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, y *Eucalyptus camaldulenses Dehnh.*, presentan toxicidad, Si se aplica el Bioensayo con *Artemia Franciscana* a los extractos alcohólico, etéreo y acuoso obtenidos.

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

Capitulo III

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

3.1 Diseño Metodológico

3.1.1 Descripción del Ámbito de Estudio

Las extracciones de las Plantas en estudio, posteriormente el Tamizaje Fitoquímico al igual que el Bioensayo en *Artemia Franciscana* se realizaron en el Laboratorio 101 del departamento de Química, ubicado en la Facultad de Ciencias e Ingenierías de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN-Managua, en el mes de Julio del año 2017.

3.1.2 Tipo de Estudio

El presente estudio según Piura López (2006) es de tipo Explicativo no experimental ya que tiene relación causal; no sólo persigue describir o acercarse a un problema, sino que intenta encontrar las causas del mismo y porque se realiza un estudio sin manipular deliberadamente las variables

3.1.3 Población Y Muestra

3.1.3.1 Población

Peso de las hojas secas de *Citrus Aurantium*: 20 g

Peso de las hojas secas de *Ruta Chalepensis*: 22 g

Peso de las hojas secas de *Eucalyptus Camaldulensis*: 24 g

3.1.3.2 Muestra

Peso en polvo de las tres especies en estudio: 7 g

Criterios de inclusión

Hojas verdes frescas, en buen estado, completas, sin alteraciones morfológicas.

Criterios de Exclusión

Hojas secas, en mal estado, incompletas, con alteraciones morfológicas.

Determinación de DL₅₀, aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

3.1.4 Variables y Operacionalización

3.1.4.1 Variables Independientes

- ❖ Extractos
- ❖ Metabolitos secundarios.

3.1.4.2 Variables Dependientes

- ❖ Concentración
- ❖ Toxicidad

3.1.4.3 Operacionalización de las Variables

Variables independientes.	Definición de Variable	Indicador	Medición
Extracto	Sustancia muy concentrada obtenida de una planta, semilla u otra materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua.	Color Olor Aspecto	Presencia de principios activos
Concentración	Proporción o relación que hay entre la cantidad de soluto y la cantidad de disolución o de disolvente en una solución.	Rango (mayor, menor o igual)	Ppm
<i>Variables dependientes</i>			
Metabolitos Secundarios	Compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas.	Coloración Precipitación	Alcaloides Saponinas Triterpenos Flavonoides Emodinas
Toxicidad	Es la capacidad de alguna sustancia química de producir un efecto nocivo sobre un organismo.	Nauplios muertos	Porcentaje de Mortalidad

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

3.1.5 Material y Método

3.1.5.1 Materiales para recolectar información

- ❖ Fichas de redacción
- ❖ Cámara: imágenes
- ❖ Tablas
- ❖ Computadora

3.1.5.2 Material para procesar información

- ❖ Microsoft Excel 2010
- ❖ Microsoft Power Point
- ❖ Tablas
- ❖ Gráficos
- ❖ Imágenes

Determinación de DL₅₀, aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

3.1.5.3 Equipos, Reactivos y Materiales de laboratorio

Materiales	Marca	Reactivos	Marca	Equipo	Marca
Agitador de vidrio	----	Ácido clorhídrico	MERCK	Balanza analítica	OHAUS, ADVENTURE
Balón 100 ml 50 ml	PYREX VISTA	Ácido sulfúrico	MERCK	Cocina de plato	BUNSEN
Beacker 100 ml, 250 ml y 500 ml	PYREX VISTA	Agua destilada	---	Destilador simple	PYREX
Erlenmeyer 250 ml	KIMAX	Acetona	---	Sistema de extracción Soxhlet	PYREX
Pipeta 1 ml	PYREX	Etanol	MERCK	Horno	OPTIC, IVYMEN SYSTEM
Probeta 100 ml	KIMAX	Éter de petróleo	MERCK	Bomba de oxígeno	RESUN
Pipeta 5 ml y 10 ml	PYREX	Bitrartato de sodio y potasio	MERCK	Bomba de agua	
Probeta 50 ml	KIMAX	Cloroformo	MERCK		---
Tubos de ensayo	PYREX USA	Cloruro mercúrico	MERCK		
Termómetro	FISHERBRAND	Hematoxicillina	MERCK		
Gotero	BIOLOGIX	Hidróxido de potasio	FISHER CHEMICAL		
Micropipetas 200 µL	COMECTA	Hidróxido de amonio	MERCK		
Pinzas de 3 dedos	FISHERBRAND	Metanol	FISHER CHEMICAL		
Espátula		Sulfato cúprico	JET. BAKER		
Gradilla		Tricloruro de antimonio III	MERCK		
Recipiente de plástico		Yoduro de potasio	MERCK		
Microplaca con 96 pozos		Agua de mar	---		
Guantes	GENIAL GLOBE				
Boquillas	GENIAL				

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

Reactivos reveladores:

***Reactivo de Carr-Price:** Solución saturada de tricloruro de antimonio III en cloroformo.

***Reactivo de Mayer:** Disolver 1.35 g de Cloruro mercúrico en 60 ml de agua, disolver 7g de yoduro de potasio en 20 ml de agua, mezclar, agitar y filtrar.

***Reactivo Lieberman-Burchard:** mezclar 1 ml de cloroformo y 1 ml de Anhídrido Acético y 3-4 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

***Reactivo de Lugol:** mezclar 1 g de yodo con 2 g de yoduro de potasio, disolver en 300 ml de agua y guardar en un frasco ámbar.

***Reactivo de Fehling:** Solución A, disolver 34.65 g de cloruro mercúrico en 500 ml de agua. Solución B, disolver una mezcla de 173 g de bitartrato de sodio y potasio y 125 g de hidróxido de potasio en 500 ml de agua. Mezclar cantidades iguales antes de usar.

3.1.5.4 Método CIULEI (método modificado conforme a las condiciones del laboratorio)

a. Recolección e identificación de la especie en estudio.

Las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, y *Eucalyptus camaldulenses Dehnh.* Fueron recolectadas el 10 de Julio del año 2017, en distintas zonas de Nicaragua, la Naranja agria (*Citrus aurantium L.*) fue recolectada en los jardines de la Universidad nacional Autónoma de Nicaragua, el Eucalipto (*Eucalyptus camaldulenses Dehnh.*), fue recolectado en el instituto Nacional de Medicina Natural y la Ruda (*Ruta chalepensis L.*) fue recolectada en Catarina en el vivero ecológico La Gallina. (Ver Anexo 1 para certificación de las especies)

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

Preparación de las muestras para el tamizaje

Para la preparación de los extractos alcohólicos, acuoso y etéreos se procedió a la recolección de las hojas. Las hojas recolectadas se disecaron en un horno a 100°C por aproximadamente 30 minutos, luego se trituraron en un mortero hasta obtener un polvo fino con un peso de entre 20 a 24 g.

Para las muestras se utilizaron 7g de la droga, se procedió a las extracciones en el equipo Soxhlet, utilizando balones de 500 ml y 250 ml. Así mismo, se realizaron los cálculos para determinar las concentraciones para cada extracto las cuales varían de acuerdo al Volumen del balón utilizado para la extracción. (Véase el anexo 4 para ver los cálculos).

b. Tamizaje fitoquímico.

Se extrae la droga seca y molida con éter, utilizando un Soxhlet. El residuo se seca y se extrae, en el Soxhlet, con alcohol. Finalmente, la droga se extrae con agua, bajo reflujo durante 30 minutos. Los extractos etéreo, alcohólico y acuoso se someten a una secuencia de pruebas químicas. (Ver Anexo 2)

b.1 Extracto Etéreo:

- i. 20 ml extracto + 10 ml KOH 0.5 M + 20ml H₂O, separar el éter de los demás componentes y dividir en 2 tubos de ensayos.
Tubo 1: 5 ml del extracto + 5 ml del *Reactivo de Lieberman* se observara una coloración *verde oscura* la cual representara **Triterpenos y esteroides**.
Tubo 2: 5 ml del reactivo de Carr Price se observara una coloración *verde oscura* la cual representara **Carotenoides**.
- ii. 10 ml extracto evaporar a sequedad disolver con 3 ml HCl 2%. Agregar en un tubo de ensayo 3 ml + reactivo de Mayer. Se espera la aparición de precipitado indicando la presencia de **Alcaloides**.

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

- iii. Prueba Shinoda: 5ml extracto, se evapora a sequedad + 2 ml metanol + limadura de magnesio + 1 ml de HCl concentrado, después de 10 minutos presenta una coloración rojiza la que representara las **Agliconas de flavonoides**.
- iv. 5 ml del extracto se evapora a sequedad + 1ml de cloroformo y 4 - 7gotas del reactivo *Carr Price*, se observara una coloración *verde oscura*, lo cual representa la presencia de **Carotenoides**.
- v. 5 ml del extracto evaporar a sequedad + 1 ml cloroformo + reactivo *Lieberman-bucher* la cual se observara *formación de un anillo verde*, lo cual representa presencia de **Triterpenos y Esteroles**.

b.2 Extracto Alcohólico:

- i. 5 ml del extracto + 2 ml H_2O + 5 gotas $FeCl_3$ se observara una *coloración azul o coloración verde*, lo que representa la presencia de **taninos gálicos o catequicos** respectivamente.
- ii. 5 ml del extracto + 2ml H_2O + 5 ml reactivo de *Fehling 1%* (reflujo por 30minutos) se observara una *precipitación de color rojo ladrillo*, lo que representa la presencia de **compuestos reductores**.
- iii. 10 ml del extracto evaporar a sequedad disolver con metanol al 50% + limadura de magnesio + 1 ml HCl concentrado, se observara una coloración *rojiza*, lo cual representa la presencia de **Flavonoides**.
- iv. 10 ml del extracto evaporar a sequedad + reactivo de Lieberman-Burchard se observara una *coloración verde oscura*, la cual representa la presencia de **triterpenos y esteroles**.

b.3 Extracto Acuoso:

- i. 5 ml extracto + 3 ml H_2O + 2 gotas de Lugol se observara una *coloración azul*, que representa la presencia de **Almidón**.

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

- ii. 5 ml del extracto + 10 ml acetona + 2 gotas de *Hematoxicillina*, agitamos y filtramos se observara una *coloración violeta*, que representa la presencia de **Mucilagos**.
- iii. 5 ml extracto + 45 ml H_2O , agitar por 10 min se observara *espuma*, la cual representara la presencia de **Saponinas**.
- iv. 5 ml del extracto + 1ml Reactivo Fehling (reflujo por 30 min) se observara *color rojo ladrillo*, la cual representa la presencia de **compuestos reductores**.
- v. 5ml del extracto + 2 ml de H_2O + 3 a 4 gotas de $FeCl_3$ se observara una *coloración azul o verde*, la cual representara la presencia de **Taninos gálicos o Catequicos**.

3.1.5.4 Bioensayo con *Artemia Franciscana*

El protocolo por solis et al. (Planta med, 1993,59:250-252). Los huevos se incuban en agua salina. Después de 72 horas a 22-29°C, se recolectan los nauplios de la parte iluminada de un erlenmeyer de 1000 ml .las muestras se preparan disolviendo 2 mg/ml en agua salina. Los extractos insolubles se disuelven en 50 μL de DMSO, antes de añadir el agua salina.

Se realizan diluciones seriales en microplatos de 96 pozos, en triplicados, con 100 μL de las muestras. Se hacen disoluciones, sucesivas y se añade a cada pozo una Suspensión 10-15 nauplios (100 μL). Los microplatos se incuban 22-29°C por 24 horas.

Se examina los microplatos con una lupa y se cuenta el número de nauplios muertos, se añade metanol (50 μL) a cada pozo, después de 30 minutos se cuenta el total de muertos. Se calculan los valores de DI_{50} con el análisis de Regresión Lineal, mediante la ecuación $y= bx + a$.

a) Preparación del Agua de mar

1. Recolección de agua clara de mar libre de arena.

El agua de mar se obtuvo naturalmente de las costas de san juan del sur.

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

2. Esterilización del agua 100 °C por 30 minutos.

El agua de mar se filtró y se transfirió a un beacker de 500ml, para esterilizarla dejándose hervir por 30 minutos. Refrigerándose hasta el momento de su uso.

b) Preparación de las muestras

Se utilizaron los extractos obtenidos en el tamizaje fitoquímico con concentraciones iniciales de 14.000 ppm y 28.000 ppm para las especies *Citrus aurantium* y *Eucalyptus camaldulensis* y para la especie *Ruta chalepensis* 7.000 ppm y 14.000 ppm.

c) Preparación del blanco

En este bioensayo la solución blanco que se utilizo fue el agua de mar esterilizada previamente.

d) preparación del patrón ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

Para las concentraciones de prueba $CuSO_4$ se partió de una concentración de 256 ppm para esto se pesó 0.025 g de Sulfato de Cobre II pentahidratado en un vidrio de reloj, se disolvieron en 100 ml de agua destilada. Haciendo uso de la ecuación de la disolución se obtuvieron concentraciones de 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 ppm (**diríjase al Anexo 5 para ver los cálculos**)

2. Incubación de los Nauplios

Se pesó 1g de huevecillos de *Artemia Franciscana* y se procedió a su incubación en un Erlenmeyer de 500 ml, siguiendo las siguientes condiciones.

- ✓ T= 26 a 28° C.
- ✓ Tiempo de 24 a 72 horas de incubación.
- ✓ Oxigenación casi a saturación (Bomba de oxígeno)

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

c. Montaje del ensayo con *Artemia franciscana*

En un plato de 96 micropozos de 300 μL , se colocaron 100 μL de agua de mar, excepto en línea A.

En los micropozos A1 – A3 se adiciono la solución blanco, en los micropozos A4 - A6 se adicionaron 200 μL de la solución patrón y en los micropozos A7 – A12 se adicionaron 200 μL del extracto (etéreo, alcohólico y acuoso) de cada especie.

Usando micropipetas de 100 μL a lo largo de la línea A (pozos del A1 al A12), se removió 100 μL de la solución y se colocó en la línea B, mezclando por succiones repetidas la solución. Repitiendo este procedimiento hasta llegar al final del plato, realizando soluciones seriadas a lo largo del plato de micropozos. Al finalizar los 100 μL de solución restante se descartan. Se adiciono a cada pozo una cantidad de 10 - 15 nauplios. **(Ver anexo 6 para distribución del ensayo)**

Se incubo a temperatura ambiente durante 24 horas. Luego se contaron los nauplios muertos utilizando una lupa y se anotaron los datos en un cuadro simulando la placa de 96 pozos. El criterio para considerar la muerte de las *Artemia franciscana* fue la inmovilidad por más de 10s (Arencibia Carballo & Tizol C, 2010). El valor de la DL_{50} y los límites de confianza se calculan mediante el Método de Regresión Lineal.

Determinación de DL_{50} , aplicando bioensayo con *Artemia Franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.* Laboratorio de química, UNAN MANAGUA Enero-Octubre 2017

CAPITULO IV

4.1 Resultados y Discusión de resultados

Tamizaje fitoquímico

Según Aristizábal, J. 2011. **Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de las cáscaras y semillas de tres especies de cítricos contra el hongo fitopatógeno *Fusarium roseum***. El método utilizado fue maceración y se reconcentro con un rota vapor a diferencia del presente estudio donde los extractos se obtuvieron mediante el uso del equipo Soxhlet y se reconcentraron utilizando un destilador simple.

Según Arteché et al., 1998: 338 la especie vegetal *Citrus aurantium* L., contiene en las hojas hidrocarburos terpénicos (limoneno), alcoholes (linalol, nerol, antranilato de metilo, betaina) flavonoides (hesperidina, limonina). En nuestro estudio siguiendo la marcha analítica propuesta en el método CIULEI y adecuándolas a nuestro laboratorio identificamos la presencia de Triterpenos/esteroles, alcaloides, carotenoides, taninos Catequicos, antracenosidos, flavonoides. (Tabla 8)

Los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico fueron agrupados según el tipo de extracto (etéreo, alcohólico y acuoso), observando los metabolitos secundarios identificados según el tipo de reacción o coloración que dieron las pruebas preliminares expuestas en la Tabla 8 para la especie *Citrus aurantium* L.:

Bioensayo con *Artemia*

Según Sánchez, L. Neira, A. (2005). Siguiendo la metodología propuesta por Gualdrón, R (1994); CYTED (1995); Martínez, C. (1999) y McLaughling, J. (1997). Se adecuó un recipiente que hiciera las veces de cámara de incubación para el desarrollo (eclosión) de 45 mg de huevo de *Artemia Salina* en 450 ml de medio artificial, se sometió a un burbujeo con una bomba de oxígeno por una hora y se utilizaron tubos de ensayos. En el presente estudio siguiendo la metodología de CIULEI se agregó 1 g de huevecillos en 500 ml de Agua de mar y se sometió al burbujeo durante 72 horas, y se utilizó una placa de 96 micropozos para el montaje.

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Tabla 8. Resultados obtenidos en el Tamizaje Fitoquímico de los Extractos de la Especie *Citrus Aurantium*

<i>Citrus aurantium</i>		Extractos		
Metabolitos	Indicador	Etéreo	Alcohólico	Acuoso
Triterpenos/Esteroles	Color	(+ +)	(--)	
Alcaloides	↓↓ Precipitado	(+ +)	(--)	
Agliconas flavonoides	Color	(--)		
Taninos Gálicos	Color		(--)	(--)
Taninos Catequicos	Color		(+ +)	(+ +)
Compuestos reductores	↓↓ Precipitado		(--)	(--)
Emodinas	Color	(--)		
Antracenosidos	Color		(+ +)	
Almidón	Color			(--)
Mucilago	↓↓Precipitado			(--)
Saponina	Efervescencia			(--)
Carotenoides	Color	(+ +)		
Flavonoides	Color		(+ +)	

Fuente: propia

Los espacios en blanco significan que esos ensayos no se le realizaron al extracto
 El signo (++) significa que se obtuvo una respuesta positiva, presencia.
 El signo (--) significa que se obtuvo una respuesta Negativa, Ausencia.

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

En la especie vegetal *Ruta chalepensis L.* según Arteché et al., 1998: 338 identificó la presencia en las hojas de los metabolitos secundarios como: alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, aceites volátiles, esteroides y triterpenos, en nuestro estudio identificamos otros metabolitos secundarios como: compuestos reductores, antracenosidos, los resultados del tamizaje fitoquímico de esta especie vegetal la resumimos en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados obtenidos en el Tamizaje Fitoquímico de los extracto de la especie *Ruta Chalepensis*.

<i>Ruta chalepensis</i>		<i>Extractos</i>		
Metabolitos	Indicador	Etéreo	Alcohólico	Acuoso
Triterpenos/Esteroides	Color	(++)	(++)	
Alcaloides	↓↓Precipitado	(++)	(++)	
Agliconos flavonoides	Color	(--)		
Taninos Gálicos	Color		(--)	(--)
Taninos Catequicos	Color		(++)	(++)
Compuestos reductores	↓↓Precipitado		(++)	(++)
Emodinas	Color	(--)		
Antracenosidos	Color		(++)	
Almidón	Color			(--)
Mucilago	↓↓Precipitado			(--)
Saponina	Espuma			(--)
Carotenoides	Color	(--)		
Flavonoides	Color		(++)	

Fuente: propia

Los espacios en blanco significan que esos ensayos no se le realizaron al extracto
 El signo (++) significa que se obtuvo una respuesta positiva, presencia.
 El signo (--) significa que se obtuvo una respuesta Negativa, Ausencia.

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Siguiendo la metodología de Naranjo, J. (2009). En un estudio realizado en la especie vegetal *Eucalyptus citriodora Hook.*, identificaron en las hojas adultas mediante un tamizaje fitoquímico la presencia de los metabolitos secundarios: alcaloides, triterpenos/esteroides, aceites/grasas, azúcares reductores, fenoles/taninos y flavonoides en comparación en nuestro estudio con la especie vegetal *Eucalyptus camaldulensis Dehnh.*, identificamos la presencia de otros metabolitos secundarios como: emodinas y antracenosidos.

Tabla 10. Resultados obtenidos en el Tamizaje Fitoquímico de los extractos de la especie *Eucalyptus camaldulensis*

<i>Eucalyptus camaldulensis</i>		<i>Extractos</i>		
Metabolitos	Indicador	Etéreo	Alcohólico	Acuoso
Triterpenos/Esteroles	Color	(++)	(++)	
Alcaloides	↓↓Precipitado	(++)	(--)	
Agliconos flavonoides	Color	(--)		
Taninos Gálicos	Color		(++)	(++)
Taninos Catequicos	Color		(--)	(--)
Compuestos reductores	↓↓Precipitado		(++)	(++)
Emodinas	Color	(++)		
Antracenosidos	Color		(++)	
Almidón	Color			(--)
Mucilago	↓↓Precipitado			(--)
Saponina	Efervescencia			(--)
Carotenoides	Color	(--)		
Flavonoides	Color		(++)	

Fuente: propia

Los espacios en blanco significan que esos ensayos no se le realizaron al extracto

El signo (++) significa que se obtuvo una respuesta positiva, presencia.

El signo (--) significa que se obtuvo una respuesta Negativa, Ausencia.

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Bioensayo con *Artemia franciscana*

Tabla 11. Supervivencia y mortalidad de *Artemia Franciscana* frente al control positivo (Patrón) y el control Negativo (Blanco).

Concentración (ppm)	Patrón		Blanco	
	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos
256	18	16	30	0
128	16	14	32	0
64	15	13	31	0
32	24	8	31	0
16	29	1	30	0
8	31	0	30	0
4	30	0	32	0
2	32	0	33	0

Antes de proceder a los análisis, se debía demostrar que los datos recolectados durante el Bioensayo con *Artemia franciscana* eran admisibles. Para que los datos recolectados fueran aceptados y considerados confiables, la mortalidad del control negativo (agua) no debía exceder el 10%. (Castillo, 2004)

Se procedió a construir la tabla 11 con los siguientes datos:

- ✓ Números de organismos vivos usados en el control negativo (Blanco)
- ✓ Numero de organismos muertos en el Blanco después de 24 horas de exposición.
- ✓ Porcentaje de mortalidad en el control negativo.

Los primeros dos datos se obtienen del bioensayo y el último dato se calcula con una sencilla regla de tres:

$$\% \text{ de Mortalidad} = \frac{\text{organismos muertos}}{\text{total organismos usados}} \times 100 \quad (\text{Ecuación. 8})$$

Tabla 12. Porcentaje de mortalidad en el Control Negativo (Blanco)

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Vivos	Muertos	% de Mortalidad
30	0	0
32	0	0
31	0	0
30	0	0
30	0	0
30	0	0
33	0	0

Tal como muestra la tabla 12, los datos son confiables puesto que la mortalidad en el control negativo es menor de 10 %.

Con los datos tabulados en la tabla tal se realizó la gráfica 1, que muestra la tendencia de muerte de las Artemias sometidas a análisis. El grafico muestra que la cantidad de Artemias muertas en el control negativo es cero y esto se debe a que las condiciones en que se desarrolla el organismo son óptimas para su supervivencia. Sin embargo cuando los organismos son expuestos a un toxico la mortalidad de estos aumenta al aumentar la concentración.



Figura 1. Tendencia de muerte Artemia F. en las diferentes concentraciones

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Utilizando la ecuación de regresión lineal, se determinaron las dosis letal media para cada extracto. Aplicando un despeje simple del valor de X de la ecuación: $Y = bX + a$ donde el valor de Y se toma como la muerte del 50% de la población expuesta, a (intercepto) y b (pendiente) se calculan con las ecuaciones 4 y 5 respectivamente. Una vez obtenidas las dosis se clasificaron según la tabla de toxicidad del CYTED. (ver anexo 10 para cálculos)

Tabla 13. DL₅₀ obtenidas y su respectiva clasificación según el CYTED.

Especie vegetal	Extracto etéreo	Extracto Alcohólico	Extracto Acuoso
<i>Citrus Aurantium</i>	605,23ppm Ligeramente tóxica	87,09 ppm Altamente tóxico	1947,67 ppm Relativamente inocuo
<i>Ruta Chalepensis</i>	193,935 ppm Moderadamente tóxico	17,82 ppm Altamente toxico	783,14 ppm Ligeramente tóxico
<i>Eucalyptus Camaldulensis</i>	387,22 ppm Moderadamente tóxico	247,65 ppm Moderadamente toxico	655,46 ppm Ligeramente tóxico

Como se puede observar en la tabla anterior, donde se presentó mayor toxicidad fue en el extracto alcohólico para las tres especies lo que nos da una idea, tomando en cuenta los metabolitos secundarios identificados en este, que los Flavonoides o los Alcaloides podrían ser los causantes de dicha actividad citotóxica, no obstante hay que recordar que en este estudio no se identificaron grupos de compuestos químicos en específico, ni se identificaron todos los metabolitos que podrían estar presentes en estas especies, debido a falta de instrumentos y reactivos.

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh*
laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

CAPITULO V

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos podemos concluir:

Se identificaron la presencia de Alcaloides, Carotenoides, Flavonoides, Triterpenos/Esteroles, compuestos reductores, taninos, Antarcenocidos y Emodinas en las especies vegetales seleccionadas para el estudio.

Se determinó la DL₅₀, utilizando la ecuación de regresión lineal para cada especie vegetal en *Citrus aurantium L.*, en el extracto etéreo fue de 605,23 ppm, extracto alcohólico con 87,09 ppm y extracto acuoso con 1947,67 ppm. Para la especie vegetal *Ruta Chalepensis L.* en el extracto etéreo con 193,935 ppm, extracto alcohólico con 17,82 ppm y extracto acuoso con 783,14 ppm. En la especie vegetal *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* extracto etéreo con 387,22 ppm, extracto alcohólico con 247,65 ppm y el extracto acuoso con 655,46 ppm.

Se compararon las dosis obtenidas y se concluyó que La especie vegetal que presenta mayor actividad citotóxica según la DL₅₀ fue la *Ruta chalepensis* con una concentración de 17,82 ppm. Y una clasificación de *Altamente tóxica* según el CYTED. (Entre 10-100 µg/ ml), según el CYTED, la DL₅₀ es la concentración que inhibe el 50% de la población. (Rodríguez, 1999). Es importante señalar que los valores obtenidos de DL₅₀ no advierten una toxicidad como tal en humanos, sino que son indicadores de toxicidad a nivel celular.

.

RECOMENDACIONES

Este estudio representa el primer reporte de las especies vegetales *Citrus Au.*, *Ruta Ch.* y *Eucalyptus C.* con análisis de la composición química utilizando reacciones químicas y bioensayo con *Artemia Franciscana* utilizando el método de regresión para la determinación de la DL₅₀.

En base a los resultados obtenidos se recomienda a futuras investigaciones:

1. Se recomienda para la identificación de metabolitos secundarios contar con los equipos y reactivos necesarios para realizar las marchas analíticas de manera completa propuestas en el método de CUILEI.
2. Al momento de realizar el bioensayo se recomienda seguir los pasos indicados en el protocolo de laboratorio, según las nuevas metodologías se puede utilizar un estereoscopio para mejorar el conteo de nauplios vivos y muertos, ya que facilita la visualización de estos organismos.
3. Fomentar la elaboración de estudios científicos y sociales de plantas que son utilizadas comúnmente por la población nicaragüense y de las que aún no se conocen sus propiedades medicinales o su grado de toxicidad.

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Bibliografía

Arteche, A., Vanalucha, B. y Guenechea, J. (1998). *Fitoterapia vademécum de prescripción*. (3a. ed.). Barcelona: MASSON

Avalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*. Recuperado de: http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf

Brüssel, J. (1998). *Manual de plantas medicinales para el promotor de medicina preventiva y salud comunitaria*, Estelí: ISNAYA

Castillo, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y Métodos de evaluación de calidad de aguas*. México: Instituto Mexicano de tecnología del agua. Disponible en: https://pridrc.azureedge.net/sites/default/files/openebooks/147-7/#page_104 "

Condori, R. y Paredes, E. (2012). *Actividad toxicológica de la fracción alcaloidea de los tallos de la jatropha macrantha M. Arg. (Huanarpo macho) en Artemia salina (brine Shrimps)*. [En línea]. Perú: universidad Nacional San Agustín de Arequipa. Disponible en: <https://es.slideshare.net/reneecapaza/rene-condori-apaza-actividad-toxicologica-de-la-fraccion-alcaloidea-de-los-tallos-de-la-jatropha-macrantha-m-arg-huanarpo-macho-en-artemia-salina-brine-shrimps>

Cruz, J. y Gutiérrez, K. (2015). *Evaluación fitoquímica de los metabolitos secundarios para la determinación de la DL₅₀, en la raíz de la especie vegetal Mata de piedra (Arthurium cubense), tilgÜe, isla de Ometepe*. Tesis de licenciatura en química farmacéutica, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua.

Debenedetti, S. y Wilson, E. (2002). *Farmacognosia clases teóricas y presentaciones*. [En línea]. Buenos Aires: Universidad de Belgrano. Disponible en: <http://184.168.109.199:8080/jspui/bitstream/123456789/6078/1/4310%20-%20completo%20-%20Farmacognosia%20-%20debenedetti.pdf>

Girón, L. y Cáceres, A. (1996). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*: Editorial Universitaria

Guadamuz, G. (2015). *Evaluación de la toxicidad del fungicida Vandozeb 80 wp, utilizando como bioindicadores Allium cepa, Artemia Salina*. Tesis de licenciatura en química farmacéutica, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua.

Herbari virtual del Mediterrani occidental (2007, 19 de Junio). Valencia: Fundación biodiversidad. Disponible en: <http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/index.html>

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

López, F. (2010). *Tamizaje fitoquímico en las hojas frescas de laurelillo cordia inermis*. Tesis de licenciatura en química farmacéutica, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León.

Miller, J. N. y Miller, J.C. (2011). *Estadística y Quimiometría para química analítica*. Madrid: PEARSON

Miller, J.N. & Miller, J.C. (2010). *Statistics and chemometric analytical chemistry*. Harlow, England: PEARSON

Morales, M. y Uriarte, A. (1999). *Medicinas el campo. Plantas medicinales usadas en la IV región de Nicaragua*. Estelí: enlace

Pacheco, J. (2011). *Determinación de la toxicidad aguda (Cl₅₀) del extracto de polvillo de carbón a larvas de Artemia Franciscana*. Tesis de Maestría en toxicología, Universidad Nacional de Colombia, Cartagena. Recuperado de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/4320/1/598923.2011.pdf>

Pauly, Daniel. (1983). *Algunos métodos simples para la evaluación de recursos pesqueros tropicales*. FAO documento técnico de pesca. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/003/X6845S/X6845S02.htm>

Pérez, L., Picado, G., Reyes, S. (2010). *Actividad citotóxica del aceite esencial presente en la hoja de Ocimum basilium (albahaca) mediante el bioensayo con Artemia Salina*. Tesis de licenciatura en química farmacéutica, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León.

Pino, O. y Lazo, F. (2010). *Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicológicos y químicos de productos naturales*. *Revista de protección vegetal*. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522010000100008

Robineau, L. (2005). *Farmacopea vegetal caribeña* (2ª. Ed). Santo Domingo: Enda-caribe

Rodríguez, Y., Pereira, S., Vega, D., Almeida, M. y Reyes, D. (2010). *Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas y tallo de colubrina arborescens M.* *Revista Química viva*. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/html/863/86312852006/>

Salazar, F. y Jaime, M. (2011). *Tamizaje fitoquímico en las hojas frescas de laurelillo [Cordia inermis (Mill.) I. M. Johnst.]*. Laboratorio de control de calidad de Medicamentos. UNAN-León. Agosto-Octubre 2010.(licenciatura). UNAN-León. Nicaragua

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Sánchez, L. y Neira, A. (2005). *Bioensayo general de letalidad en Artemia Salina a las fracciones del extracto etanólico de Psidium guayaba. L y Psidiumguineense. Cultura científica.*

Recuperado de: <http://www.revistasjdc.com/main/index.php/ccient/article/view/76>

Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos Fitoterapéuticos*. [En línea]. Colombia: Área de ciencia y tecnología del convenio Andrés Bello. Disponible en: https://books.google.com.ni/books?id=XH2HzSIJPwC&pg=PA198&lpg=PA198&dq=metodo+d+e+ciulei&source=bl&ots=iTwxEWQzzk&sig=_2hOmnFln3AbQmqMbFjy5XH28zl&hl=es-

Silva, J., Torrejón, G., Bay-Schmith, E. y Larrain, A. (2003). *Calibración del bioensayo de toxicidad aguda en Daphnia pulex (crustacea cladóceras) usando un toxico de referencia. Gayana.* Recuperado de: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-65382003000100011

Sosa, R. (1997). *Plantas*. Managua: Asociación editora interamericana

Zin, J. y Weiss, C. (2003). *La salud por medio de las plantas medicinales*. Chile: Don Bosco S.A

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

ANEXO 1



Facultad de Ciencia Tecnología y Ambiente
Herbario Nacional de Nicaragua

CERTIFICACION DE IDENTIFICACION

Facultad Ciencias e Ingeniería

Química Farmacéutica

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

UNAN Managua, Managua

Certificamos que las muestras botánicas traída por los estudiantes de Química Farmacéutica: Alba Deniss Morales Arauz, Jessica Ulloa Jiménez y Reynier Omar Mairena Flores, al Herbario Nacional para su identificación, el pasado de Febrero, corresponde a las siguientes especies:

Eucalipto *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., de la familia Myrtaceae

Naranja agria *Citrus x aurantium* L., de la familia Rutaceae, y

Ruda *Ruta chalepensis* L., de la familia Rutaceae.

Dicho material queda depositado en el Herbario Nacional, como material de respaldo a dicha investigación: Ensayo biodirigido a las especies vegetales, *Citrus aurantium*, *Ruta chalapensis* y *Eucalyptus camaldulensis*, para la determinación de metabolitos y citotoxicidad basal en el laboratorio de Química. Noviembre.-Abril 2017.

Se extiende el siguiente certificado, en la ciudad de Managua, a los quince días del mes de Febrero del año dos mil diez y siete.


MSc. Alfredo Grijalva Pineda

Director Herbario Nacional de Nicaragua

Universidad Centroamericana UCA.



Anexo 2

Fracción etérea



Separación de Éter de los demás componentes



Presencia de Triterpenos y esteroles



Presencia de Alcaloides (precipitado)



Presencia de Carotenoides (coloración)



Presencia de T. y esteroles verde oscuro)
formación de Anillo verde

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Fracción Alcohólica



Presencia de Taninos gálicos y Catequicos



Presencia de compuestos reductores
(precipitado color Rojo ladrillo)



Presencia de flavonoides (coloración rojiza)



Presencia de Triterpenos y esteroles
(coloración verde oscuro)

:

Determinación de la DL_{50} aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Fracción Acuosa



Presencia de compuestos reductores
(coloración rojiza)



Presencia de taninos Cateticos

Determinación de la DL_{50} aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Extracción con Soxhlet



Sistema de Destilación



Determinación de la DL_{50} aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Anexo 3

Bioensayo



Incubación de los Nauplios



Dilución del extracto.

Anexo 4

Extracto etéreo (Ruta Chalepensis)

Peso de la droga (polvo)= 7g

$$1\text{g} \text{-----} 1000\text{mg}$$

$$7\text{g} \text{-----} \mathbf{x= 7000\text{mg}}$$

Solvente (V)= 500 ml

$$1\text{L} \text{-----} 1000\text{ml}$$

$$\mathbf{X=0.5L} \text{-----} 500\text{ml}$$

Concentración del extracto = 7000mg/0.5L= **14,000 ppm**

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 / V_2 = (14,000 \text{ mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$$

$$C_2 = \mathbf{7000 \text{ ppm}}$$

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 / V_2 = (7000 \text{ mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$$

$$C_2 = \mathbf{3500 \text{ ppm}}$$

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 / V_2 = (3500\text{mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$$

$$C_2 = \mathbf{1750 \text{ ppm}}$$

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 / V_2 = (1750\text{mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$$

$$C_2 = \mathbf{875 \text{ ppm}}$$

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 / V_2 = (875 \text{ mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$$

$$C_2 = \mathbf{437.5 \text{ ppm}}$$

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 / V_2 = (437.5\text{mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$$

$$C_2 = \mathbf{218.75 \text{ ppm}}$$

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 / V_2 = (218.75\text{mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$$

$$C_2 = \mathbf{109.375\text{ppm}}$$

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 / V_2 = (109.375\text{mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$$

$$C_2 = \mathbf{54.68 \text{ ppm}}$$

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 / V_2 = (109.375\text{mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$$

$$C_2 = \mathbf{54.68 \text{ ppm}}$$

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 / V_2 = (54.68\text{mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

C₂=27.34 ppm

Extracto alcohólico y Acuoso (Ruta Chalepensis)

Peso de la droga (polvo)= 7g

1g_____1000mg

7g_____x= **7000mg**

Solvente (V)= 500 ml

1L_____1000ml

X=0.5L_____500ml

Concentración del extracto = 7000mg/0.5L= **14,000 ppm**

$C_1V_1 = C_2V_2$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (14,000 \text{ mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

C₂ =7000 ppm

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (7000 \text{ mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

C₂= 3500 ppm

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (3500\text{mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

C₂= 1750 ppm

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (1750\text{mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

C₂= 875 ppm

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (875 \text{ mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

C₂= 437.5 ppm

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (437.5\text{mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

C₂= 218.75 ppm

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (218.75\text{mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

C₂= 109.375ppm

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (109.375\text{mg/L} \cdot 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

C₂=54.68 ppm

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Extracto etéreo (*Citrus Aurantium*, *Eucalyptus Camaldulensis*)

Peso de la droga (polvo)= 7g

1g_____1000mg

7g_____x= **7000mg**

Solvente (V)= 500 ml

1L_____1000

X=0.25L_____250ml

Concentración del extracto = 7000mg/0.25L= **28,000 ppm**

$C_1V_1 = C_2V_2$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (28,000 \text{ mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 14,000 \text{ ppm}$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (14000 \text{ mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 7000 \text{ ppm}$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (7000\text{mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 3500 \text{ ppm}$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (3500\text{mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 1750 \text{ ppm}$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (1750 \text{ mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 875 \text{ ppm}$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (875 \text{ mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 437.5 \text{ ppm}$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (437.5\text{mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 218.75\text{ppm}$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (218.75\text{mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 109.37 \text{ ppm}$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (109.37\text{mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 54.68\text{ppm}$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Extracto alcohólico y Acuoso (*Citrus Aurantium, Eucalyptus Camaldulensis*)

Peso de la droga (polvo)= 7g

1g_____1000mg

7g_____x= 7000mg

Solvente (V)= 500 ml

1L_____1000ml

X=0.25L_____250ml

Concentración del extracto = 7000mg/0.25L= **28,000 ppm**

$C_1V_1 = C_2V_2$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (28,000 \text{ mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 14,000 \text{ ppm}$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (14000 \text{ mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 7000 \text{ ppm}$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (7000\text{mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 3500 \text{ ppm}$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (3500\text{mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 1750 \text{ ppm}$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (1750 \text{ mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 875 \text{ ppm}$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (875 \text{ mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 437.5 \text{ ppm}$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (437.5\text{mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 218.75\text{ppm}$

$C_2 = c_1 \cdot v_1 / v_2 = (218.75\text{mg/L} * 100\mu\text{L}) / 200 \mu\text{L}$

$C_2 = 109.37 \text{ ppm}$

Anexo 5

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Preparación de las concentraciones de Sulfato de cobre (III) pentahidratado, para el bioensayo de Artemia Franciscana.

Solución madre:

Se pesó 0.0256 g de Sulfato de cobre y se agregaron 100 ml de agua destilada, y se obtuvo una solución cuya concentración es de: 0.000256 g/ml; expresándola en partes por millón (ppm).

$$0.000256 \frac{g}{mL} \times \frac{1000 mg}{1 g} = 0.256 \frac{mg}{mL} \times \frac{1000 \mu g}{1 mg} = 256 \frac{\mu g}{mL} \rightarrow \mathbf{256 ppm}$$

De la solución madre preparada, se tomaron 100 μ L, se depositaron en un pozo de la microplaca utilizada y se adicionaron 100 μ L de agua de mar, para conocer la nueva concentración se hace uso de la ecuación de la dilución:

$$[]_1 V_1 = []_2 V_2$$

La concentración 1 corresponde a la solución madre, el volumen 1 corresponde al volumen que se toma de la solución madre, la concentración 2 es lo que se desea conocer y el volumen 2 es el volumen total contenido en el micropozo de la placa (100 μ L agua + 100 μ L de solución madre).

$$[]_2 = \frac{[]_1 V_1}{V_2}$$

$$[]_2 = \left(256 \frac{\mu g}{mL} + 100 \mu L \right) / 200 \mu L = 128 \frac{\mu g}{mL} = \mathbf{128 ppm}$$

$$[]_2 = \left(128 \frac{\mu g}{mL} + 100 \mu L \right) / 200 \mu L = 64 \frac{\mu g}{mL} = \mathbf{64 ppm}$$

$$[]_2 = \left(64 \frac{\mu g}{mL} + 100 \mu L \right) / 200 \mu L = 32 \frac{\mu g}{mL} = \mathbf{32 ppm}$$

$$[]_2 = \left(32 \frac{\mu g}{mL} + 100 \mu L \right) / 200 \mu L = 16 \frac{\mu g}{mL} = \mathbf{16 ppm}$$

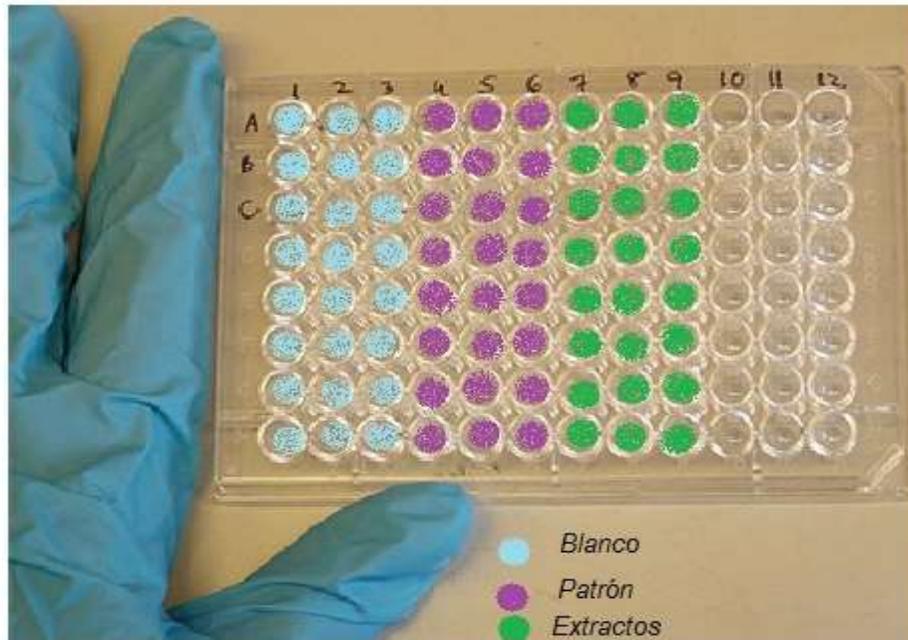
$$[]_2 = \left(16 \frac{\mu g}{mL} + 100 \mu L \right) / 200 \mu L = 8 \frac{\mu g}{mL} = \mathbf{8 ppm}$$

$$[]_2 = \left(8 \frac{\mu g}{mL} + 100 \mu L \right) / 200 \mu L = 4 \frac{\mu g}{mL} = \mathbf{4 ppm}$$

$$[]_2 = \left(4 \frac{\mu g}{mL} + 100 \mu L \right) / 200 \mu L = 2 \frac{\mu g}{mL} = \mathbf{2 ppm}$$

Determinación de la DL_{50} aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Anexo 6



Montaje del Ensayo

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Anexo 7

Calculo del porcentaje de mortalidad para cada especie y cada extracto.

$$\% = \frac{\text{Muertos}}{\text{Tratados}} \times 100$$

Extracto etéreo (*Citrus Aurantium*)

- 1) $\frac{32}{32} \times 100 = 100$
- 2) $\frac{32}{32} \times 100 = 100$
- 3) $\frac{14}{32} \times 100 = 43,75$
- 4) $\frac{12}{32} \times 100 = 37,50$
- 5) $\frac{9}{32} \times 100 = 28,13$
- 6) $\frac{6}{32} \times 100 = 18,75$
- 7) $\frac{3}{32} \times 100 = 9,38$
- 8) $\frac{1}{32} \times 100 = 3,13$

Extracto Alcohólico (*Citrus Aurantium*)

- 1) $\frac{30}{30} \times 100 = 100$
- 2) $\frac{30}{30} \times 100 = 100$
- 3) $\frac{30}{30} \times 100 = 100$
- 4) $\frac{24}{30} \times 100 = 80,00$
- 5) $\frac{23}{30} \times 100 = 76,67$
- 6) $\frac{21}{30} \times 100 = 70,00$
- 7) $\frac{17}{30} \times 100 = 56,67$
- 8) $\frac{15}{30} \times 100 = 50,00$

Extracto Acuoso (*Citrus Aurantium*)

- 1) $\frac{20}{20} \times 100 = 100$
- 2) $\frac{16}{20} \times 100 = 80,00$
- 3) $\frac{13}{20} \times 100 = 65,00$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

$$4) \frac{10}{20} x 100 = \mathbf{50,00}$$

$$5) \frac{7}{20} x 100 = \mathbf{35,00}$$

$$6) \frac{4}{20} x 100 = \mathbf{20,00}$$

$$7) \frac{2}{20} x 100 = \mathbf{10,00}$$

$$8) \frac{1}{20} x 100 = \mathbf{5,00}$$

Extracto etéreo (Ruta Chalepensis)

$$1) \frac{32}{32} x 100 = 100$$

$$2) \frac{32}{32} x 100 = 100$$

$$3) \frac{22}{32} x 100 = 68.75$$

$$4) \frac{17}{32} x 100 = 53.12$$

$$5) \frac{14}{32} x 100 = 43.75$$

$$6) \frac{10}{32} x 100 = 31.25$$

$$7) \frac{8}{32} x 100 = 25$$

$$8) \frac{6}{32} x 100 = 18.75$$

Extracto alcohólico (Ruta Chalepensis)

$$1) \frac{30}{30} x 100 = 100$$

$$2) \frac{30}{30} x 100 = 100$$

$$3) \frac{30}{30} x 100 = 100$$

$$4) \frac{26}{30} x 100 = 86.66$$

$$5) \frac{23}{30} x 100 = 76.66$$

$$6) \frac{22}{30} x 100 = 73.33$$

$$7) \frac{20}{30} x 100 = 66.66$$

$$8) \frac{18}{30} x 100 = 60$$

Extracto acuoso (Ruta Chalepensis)

$$1) \frac{19}{19} x 100 = 100$$

$$2) \frac{9}{19} x 100 = 47.36$$

Determinación de la DL_{50} aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

$$3) \frac{8}{19} \times 100 = 42.10$$

$$4) \frac{6}{19} \times 100 = 31.57$$

$$5) \frac{4}{19} \times 100 = 21.05$$

$$6) \frac{3}{19} \times 100 = 15.78$$

$$7) \frac{2}{19} \times 100 = 10.52$$

$$8) \frac{1}{19} \times 100 = 5.26$$

Extracto etéreo (*Eucalyptus camaldulensis*)

$$\frac{34}{34} \times 100 = 100$$

$$\frac{34}{34} \times 100 = 100$$

$$\frac{8}{34} \times 100 = 23.53$$

$$\frac{7}{34} \times 100 = 20.59$$

$$\frac{5}{34} \times 100 = 14.71$$

$$\frac{4}{34} \times 100 = 11.76$$

$$\frac{3}{34} \times 100 = 8.8$$

$$\frac{2}{34} \times 100 = 5.9$$

Extracto alcohólico (*Eucalyptus camaldulensis*)

$$1) \frac{32}{32} \times 100 = 100$$

$$2) \frac{32}{32} \times 100 = 100$$

$$3) \frac{29}{32} \times 100 = 90.63$$

Determinación de la DL_{50} aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

$$4) \frac{28}{32} \times 100 = 87.50$$

$$5) \frac{23}{32} \times 100 = 71.88$$

$$6) \frac{20}{32} \times 100 = 62.50$$

$$7) \frac{17}{32} \times 100 = 53.13$$

$$8) \frac{14}{32} \times 100 = 43.75$$

Extracto acuoso (*Eucalyptus camaldulensis*)

$$1) \frac{25}{25} \times 100 = 100$$

$$2) \frac{13}{25} \times 100 = 52$$

$$3) \frac{11}{25} \times 100 = 44$$

$$4) \frac{10}{25} \times 100 = 40$$

$$5) \frac{9}{25} \times 100 = 36$$

$$6) \frac{28}{25} \times 100 = 32$$

$$7) \frac{5}{25} \times 100 = 20$$

$$8) \frac{4}{25} \times 100 = 16$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Anexo 8



Figura 2, Extracto etéreo (Citrus Aurantium)

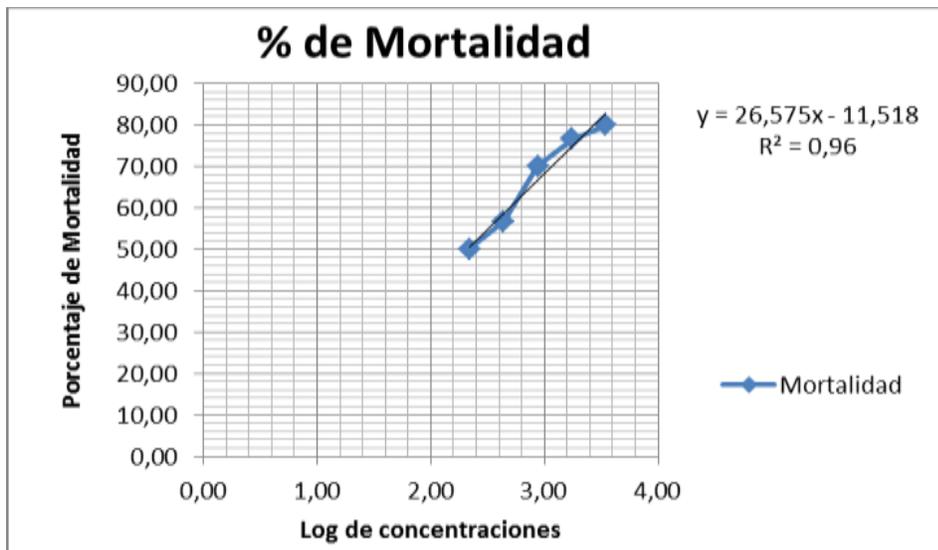


Figura 3, Extracto alcohólico (Citrus Aurantium)

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

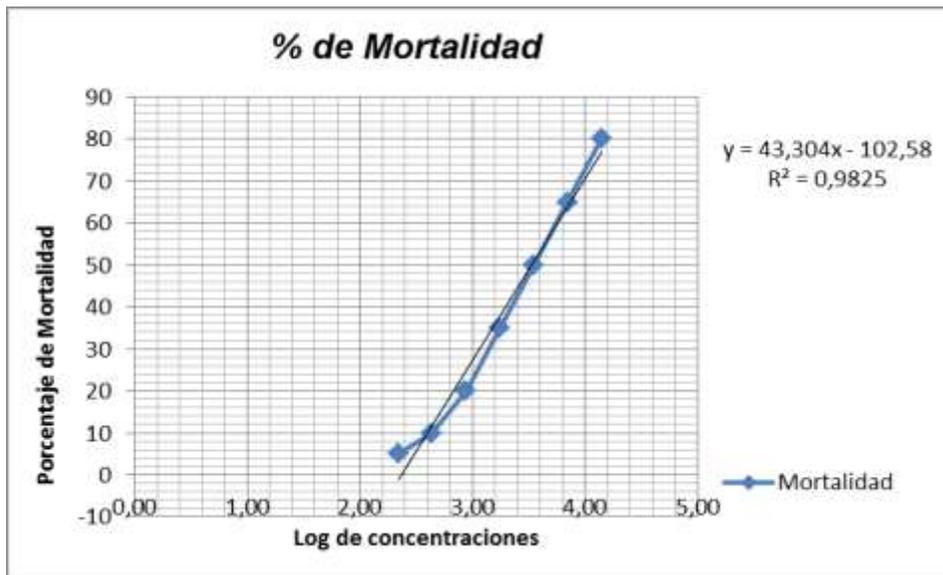


Figura 4, Extracto acuoso (*Citrus Aurantium*)

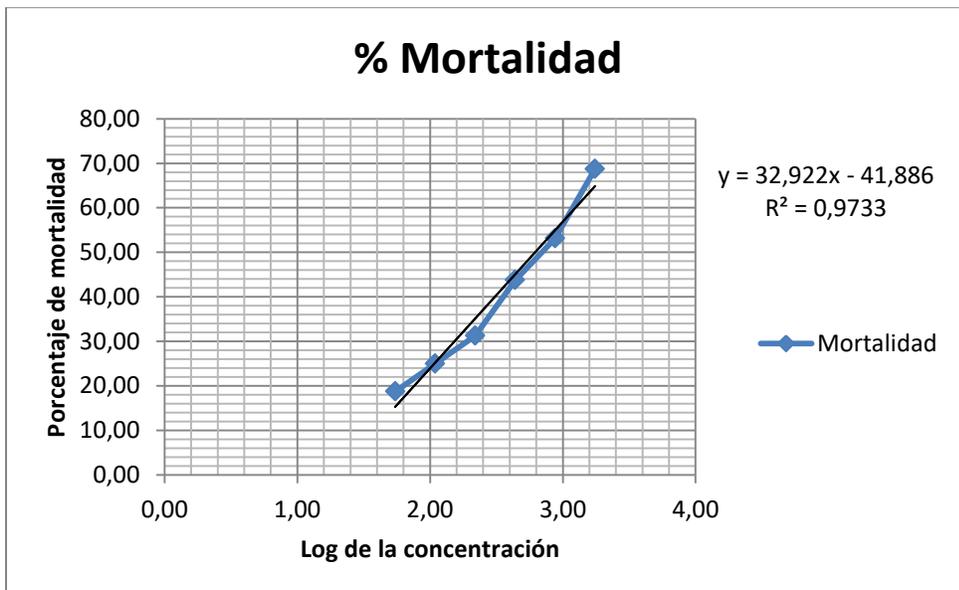


Figura 5, Extracto etéreo (*Ruta Chalepensis*)

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

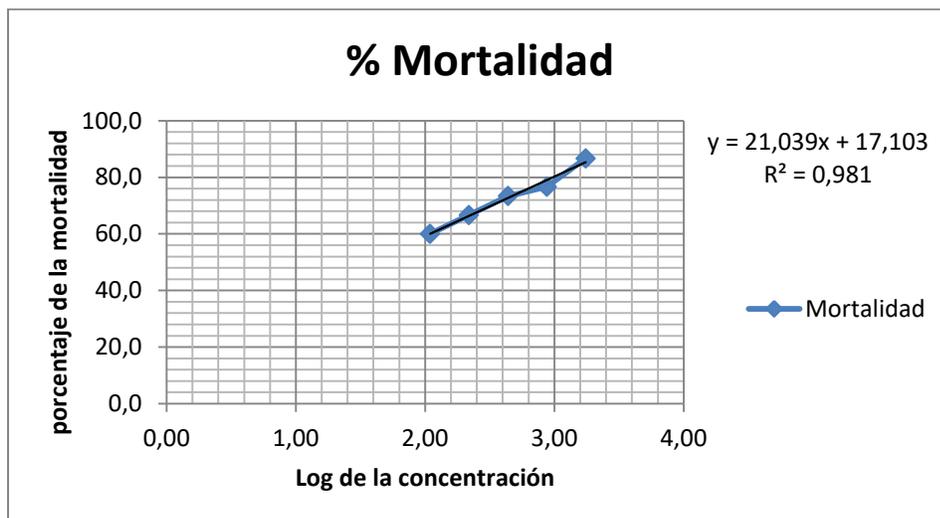


Figura 6. Extracto alcohólico (Ruta Chalepensis)

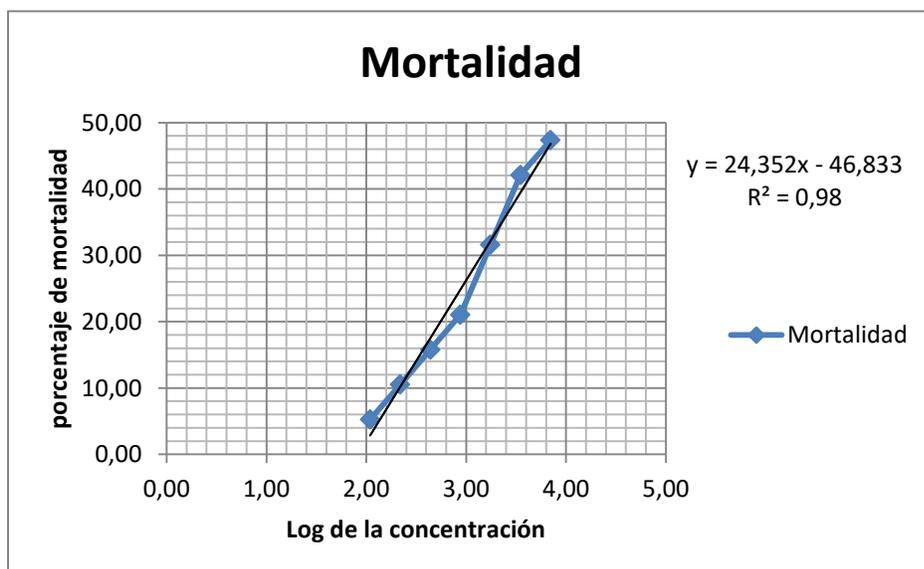


Figura 7, Extracto acuoso (Ruta Chalepensis)

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

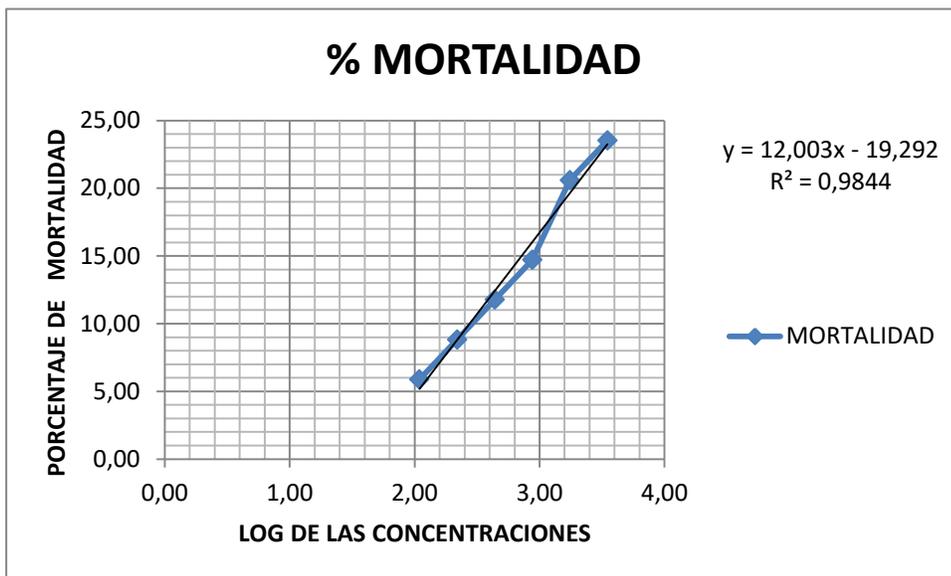


Figura 8, Extracto etéreo (*Eucalyptus Camaldulenses*)

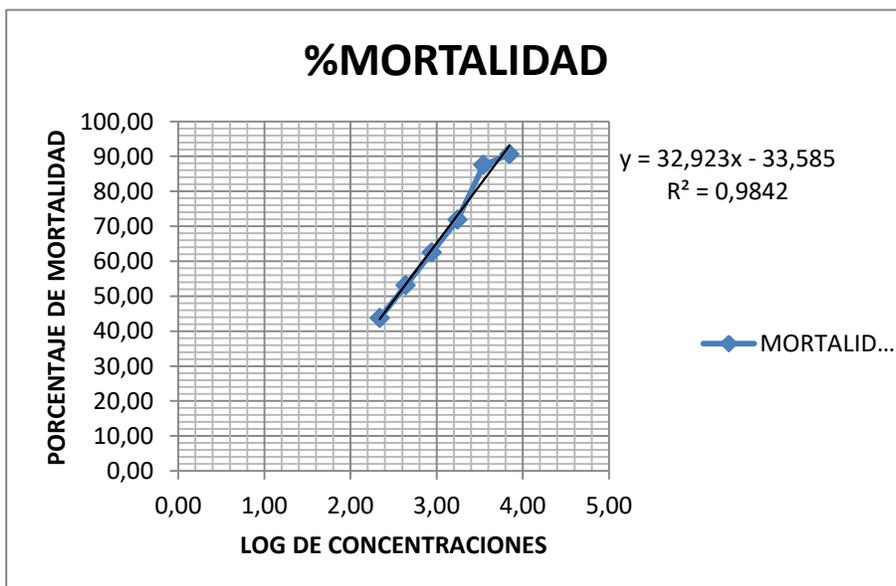


Figura 9, Extracto alcohólico (*Eucalyptus camaldulenses*)

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

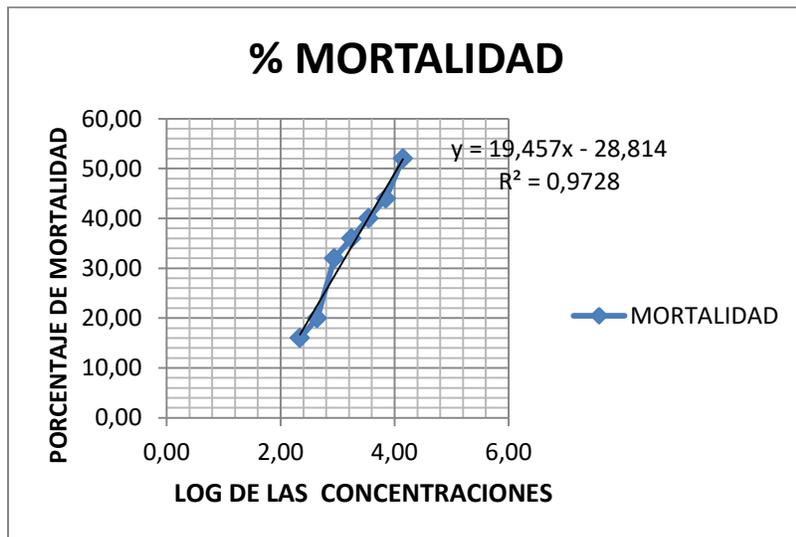


Figura 10, Extracto acuoso (*Eucalypto Camaldulenses*).

Anexo 9

Tabla 2. Clasificación toxicidad según CYTED

I	Extremadamente tóxico	1-10	µg/ml
II	Altamente tóxico	10-100	µg/ml
III	Moderadamente tóxico	100-500	µg/ml
IV	Ligeramente tóxico	500-1000	µg/ml
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500	µg/ml
VI	Relativamente inocuo	> 1500	µg/ml

Sánchez y Neira (2005:43)

Anexo 10

Calculo de la Dosis letal media (DL₅₀) Especie Vegetal *Citrus aurantium*

Tabla 13. Datos obtenidos en el Bioensayo (Extracto etéreo)

[X] ppm	Log de X	Vivos	Muertos	Tratados	% Mortalidad
14000	4,15	0	32	32	100
7000	3,85	0	32	32	100
3500	3,54	17	14	32	43,75
1750	3,24	20	12	32	37,50
875	2,94	23	9	32	28,13
437,5	2,64	26	6	32	18,75
218,75	2,34	29	3	32	9,38
109,375	2,04	31	1	32	3,13

Ver (Figura 2)

Según los datos obtenidos en el conteo del Bioensayo, se realizó la tabla No. 13, donde:

[X] ppm= las concentraciones utilizadas en ppm

Log de X= logaritmo de las concentraciones

Vivos= número de organismos que sobrevivieron a las concentraciones expuestas

Muertos: número de organismos que murieron a las concentraciones expuestas

Tratados= número total de organismos usados

% Mortalidad= mortalidad representada en porcentaje, se calcula a partir de la Ecuación 1

Tabla 13.1 valores de X y Y para calcular coeficiente de correlación

Xi	Yi	Xi- \bar{X}	(Xi- \bar{X}) ²	Yi- \bar{y}	(Yi- \bar{y}) ²	(Xi- \bar{X})(Yi- \bar{y})
3,54	43,75	0,75	0,57	20,31	412,60	15,29
3,24	37,50	0,45	0,20	14,06	197,75	6,35
2,94	28,13	0,15	0,02	4,69	21,97	0,71
2,64	18,75	-0,15	0,02	-4,69	21,97	0,71
2,34	9,38	-0,45	0,20	-14,06	197,75	6,35
2,04	3,13	-0,75	0,57	-20,31	412,60	15,29
$\bar{X}=2,79$	$\bar{y}=23,44$		$\Sigma=1,59$		$\Sigma=1264,35$	$\Sigma=44,53$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

A partir de la tabla 13 se elaboró la tabla 13.1 donde:

X_i= Log de las concentraciones

Y_i= % Mortalidad

\bar{X} = promedio de X_i (log de las concentraciones)

\bar{Y} = promedio de Y_i (Mortalidad)

Nótese que los datos para las mortalidades del 100 por ciento, no se toman en cuenta ya que para el análisis de la DL₅₀ no son significativas.

Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

(Ecuación 2)

$$r = 44.68 / \sqrt{1.59 * 1264,65} = \mathbf{0.9978}$$

Dado que el valor de *r* es menor a 1 y muy cercano, indica que existe correlación positiva entre las variables. Esto quiere decir que al crecer o decrecer X, crece o decrece Y).

Ajuste del cálculo de la DL₅₀

Calculo de la pendiente de la recta:

$$b = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

(Ecuación 4)

$$b = 44,68 / 1.59 = \mathbf{28,27}$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con Artemia franciscana en las especie vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Calculo de la Ordenada en el origen

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

(Ecuación 5)

$$a = 23,44 - (28,18 \cdot 2,79) = -56,77$$

La ecuación para la recta de regresión es $Y = 28,27x - 56,77$

Calculo del error en la DL₅₀

Tabla 13.2 Valores para calcular la desviación

Xi	Yi	(Xi)2	ŷ	 Yi-ŷ 	(Yi-ŷ)2
3,54	43,75	12,56	44,64	0,89	0,79
3,24	37,50	10,52	36,16	1,34	1,80
2,94	28,13	8,66	27,68	0,45	0,20
2,64	18,75	6,97	19,2	0,45	0,20
2,34	9,38	5,48	10,72	1,35	1,81
2,04	3,13	4,16	2,24	0,89	0,78
Σ=48,28				Σ=5,58	

Estadístico $S_{y/x}$; estima los errores aleatorios en la dirección Y.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

(Ecuación 6)

$$S_{x/y} = \sqrt{5,5804 / 4} = 1,1811$$

Calculo de la DL₅₀ y su error aleatorio

El valor de y_0 (% de Mortalidad) calculado para el 50% de nuestra población se calcula de la siguiente manera:

$$y_0 = (\% \text{ superior} / 2)$$

$$y_0 = (43,75 / 2) = 21,875$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_{x_0} = 1,18 / 28,27 \sqrt{1/3 + 1/6 + (23,44 - 23,44)^2 / (28,18)^2} * 1.59$$

$$S_{x_0} = 0,042 \sqrt{0.055 + 0 / 1258,7733} = \mathbf{0.0295} \rightarrow \mathbf{1.070}$$

Los valores de la DL₅₀ se calculan utilizando la ecuación de regresión determinada anteriormente: $Y = 28,27x - 56,77$, sustituyendo el valor de Y_0 por 21,875 que corresponde al 50% de mortalidad de la población tratada.

$$21,875 = 28,27x - 56,77$$

$$DL_{50} = 21,875 + 56,77 / 28,27 = \mathbf{2.78} \rightarrow \mathbf{[605, 23 \text{ ppm}]}$$

$$DL_{50} \approx \mathbf{605, 23 \text{ ppm} \pm 1.070}$$

[604, 16 --- 606,30] ppm

605, 23 ppm según la clasificación de Toxicidad del CYTED, el extracto etéreo de la especie *Citrus Aurantium* es *ligeramente toxica*. Sánchez y Neira (2005:43)

Tabla 14. Extracto Alcohólico (*Citrus aurantium*)

Concentración [x] ppm	Log de la concentración	Vivos	Muertos	Tratados	% Mortalidad
28000	4,45	0	30	30	100
14000	4,15	0	30	30	100
7000	3,85	0	30	30	100
3500	3,54	6	24	30	80,00
1750	3,24	7	23	30	76,67
875	2,94	9	21	30	70,00
437,5	2,64	13	17	30	56,67
218,75	2,34	15	15	30	50,00

Según los datos obtenidos en el conteo del Bioensayo, se realizó la tabla No. 14, donde:

[X] ppm= las concentraciones utilizadas en ppm

Log de X= logaritmo de las concentraciones

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Vivos= número de organismos que sobrevivieron a las concentraciones expuestas

Muertos: número de organismos que murieron a las concentraciones expuestas

Tratados= número total de organismos usados

% Mortalidad= mortalidad representada en porcentaje, se calcula a partir de la Ecuación 1

Tabla 14.1 valores de X y Y para calcular coeficiente de correlación

Xi	Yi	Xi-X	(Xi-X) ²	Yi-Y	(Yi-Y) ²	(Xi-X)(Yi-Y)
3,54	80,00	0,60	0,36	13,33	177,69	7,99
3,24	76,67	0,30	0,09	10,00	100,00	3,01
2,94	70,00	0,00	0,00	3,33	11,11	0,00
2,64	56,67	-0,30	0,09	-10,00	100,00	3,00
2,34	50,00	-0,60	0,36	-16,67	277,78	10,02
$\bar{X}=2,94$	$\bar{Y}=66,67$		$\Sigma=0,90$		$\Sigma=666,67$	$\Sigma=24,00$

A partir de la tabla 14 se elaboró la tabla 14.1 donde:

Xi= Log de las concentraciones

Yi= % Mortalidad

\bar{X} = promedio de Xi (log de las concentraciones)

\bar{Y} = promedio de Yi (Mortalidad)

Nótese que los datos para las mortalidades del 100 por ciento, no se toman en cuenta ya que para el análisis de la DL₅₀ no son significativas.

Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

$$r = 24,00 / \sqrt{0,90 * 666,67} = \mathbf{0.9798}$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con Artemia franciscana en las especie vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

La recta de regresión de Y sobre X

Pendiente de la recta de mínimos cuadrados

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$b = 24,00 / 0,90 = \mathbf{26,67}$$

Ordenada en el origen de la recta de mínimos cuadrados

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$a = 66,67 - 26,67 * 2,94 = \mathbf{-11,74}$$

La ecuación para la recta de regresión es $Y = 26,67x - 11,74$

Calculo del error de la DL₅₀

Tabla 14.2 valores para calcular las desviaciones

X_i	Y_i	$(X_i)^2$	\hat{y}	$ Y_i - \hat{y} $	$(Y_i - \hat{y})^2$
3.54	80,00	12,56	82,67	2,67	7,13
3.24	76,67	10,52	74,67	2,00	3,99
2.94	70,00	8,66	66,67	3,33	11,09
2.64	56,67	6,97	58,67	2,00	4,01
2.34	50,00	5,48	50,67	0,67	0,45
$\Sigma = 44,11$				$\Sigma = 26,67$	

Estadístico $S_{y/x}$; estima los errores aleatorios en el porcentaje de Mortalidad.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

$$S_{y/x} = \sqrt{26,67 / 5 - 2} = 2,981$$

Calculo del Error en la DL₅₀

El valor de y₀ (% de Mortalidad) calculado para el 50% de nuestra población se calcula de la siguiente manera:

$$Y_0 = (\% \text{ superior} / 2)$$

$$Y_0 = (80 / 2) = 40$$

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_{x_0} = 2,981 / 26,67 \sqrt{1/2 + 1/5 + (65 - 66,67)^2 / (26,46)^2} * 0.91$$

$$S_{x_0} = 0.113 \sqrt{0.533 + 2,778 / 634,526} = 0.093 \rightarrow 1,24$$

Los valores de la DL₅₀ se calculan utilizando la ecuación de regresión determinada anteriormente: Y = 26,67x - 11,74 se sustituyó el valor de Y₀ por 40, que corresponde al 50% de mortalidad en la población tratada.

$$40 = 26,67x - 11,74$$

$$DL_{50} = 40 + 11,74 / 26,67 = 1,94 \rightarrow [87,09 \text{ ppm}]$$

$$DI_{50} \approx 87,09 \text{ ppm} \pm 1,24$$

$$DI_{50} = [85,85 \text{ --- } 88,33] \text{ ppm}$$

87,09 ppm según la clasificación de Toxicidad del CYTED, el extracto etéreo de la especie *Citrus Aurantium* es Altamente toxica. Sánchez y Neira (2005:43)

Tabla 15. Datos obtenidos en el Bioensayo (Extracto Acuoso)

Concentración [x] ppm	Log de la concentración	Vivos	Muertos	Tratados	% Mortalidad
28000	4,45	0	20	20	100
14000	4,15	4	16	20	80,00
7000	3,85	7	13	20	65,00
3500	3,54	10	10	20	50,00

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

1750	3,24	13	7	20	35,00
875	2,94	16	4	20	20,00
437,5	2,64	18	2	20	10,00
218,75	2,34	19	1	20	5,00

Ver (Figura 4)

Según los datos obtenidos en el conteo del Bioensayo, se realizó la tabla No. 15, donde:

[X] ppm= las concentraciones utilizadas en ppm

Log de X= logaritmo de las concentraciones

Vivos= número de organismos que sobrevivieron a las concentraciones expuestas

Muertos: número de organismos que murieron a las concentraciones expuestas

Tratados= número total de organismos usados

% Mortalidad= mortalidad representada en porcentaje, se calcula a partir de la Ecuación 1

Tabla 15.1 valores de X y Y para calcular coeficiente de correlación

Xi	Yi	Xi- \bar{X}	(Xi- \bar{X}) ²	Yi- \bar{y}	(Yi- \bar{y}) ²	(Xi- \bar{X})(Yi- \bar{y})
4.15	80,00	0,90	0,81	42,14	1775,78	38,35
3.85	65,00	0,60	0,37	27,14	736,58	16,56
3.54	50,00	0,30	0,09	12,14	147,38	3,64
3.24	35,00	0,00	0,00	-2,86	8,18	0,00
2.94	20,00	-0,30	0,09	-17,86	318,98	5,36
2.64	10,00	-0,60	0,36	-27,86	776,18	16,72
2.34	5,00	-0,90	0,81	-32,86	1079,78	29,58
$\bar{X}=3.24$	$\bar{y}=37,86$	0,00	2,55	0,00	4842,86	110,19

A partir de la tabla 15 se elaboró la tabla 15.1 donde:

X_i = Log de las concentraciones

Y_i = % Mortalidad

\bar{X} = promedio de X_i (log de las concentraciones)

\bar{y} = promedio de Y_i (Mortalidad)

Nótese que los datos para las mortalidades del 100 por ciento, no se toman en cuenta ya que para el análisis de la DL₅₀ no son significativas.

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

(Ecuación 2)

$$r = 110.19 / \sqrt{2.55 * 4842.86} = \mathbf{0.9916}$$

Dado que el valor de r es menor a 1 y muy cercano, indica que existe correlación positiva entre las variables. Esto quiere decir que al crecer o decrecer X, crece o decrece Y).

La recta de regresión de Y sobre X

Calculo de la pendiente de la recta de mínimos cuadrados

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$b = 110.1928 / 2.55 = \mathbf{43.21}$$

Calculo de la ordenada en el origen de la recta de mínimos cuadrados

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$a = 37.86 - 43.21 * 2.94 = \mathbf{-102.14}$$

La ecuación para la recta de regresión es $Y = 43,21x - 102,14$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Calculo del error de la DL₅₀

Xi	Yi	Xi- \bar{X}	(Xi- \bar{X}) ²	Yi- \bar{y}	(Yi- \bar{y}) ²	(Xi- \bar{X})(Yi- \bar{y})
4.15	80,00	0,90	0,82	42,14	1776,02	38,06
3.85	65,00	0,60	0,36	27,14	736,73	16,34
3.54	50,00	0,30	0,09	12,14	147,45	3,66
3.24	35,00	0,00	0,00	-2,86	8,16	0,00
2.94	20,00	-0,30	0,09	-17,86	318,88	5,38
2.64	10,00	-0,60	0,36	-27,86	776,02	16,77
2.34	5,00	-0,90	0,82	-32,86	1079,59	29,67
$\bar{X}=3.24$	$\bar{y}=37,86$	0,00	2,54	0,00	4842,86	109,88

Estadístico $S_{y/x}$; estima los errores aleatorios en el porcentaje de Mortalidad.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{26,67 / 5-2} = \mathbf{2,981}$$

Calculo de la DL₅₀ y su error aleatorio:

El valor de y_0 (% de Mortalidad) calculado para el 50% de nuestra población se calcula de la siguiente manera:

$$Y_0 = (\% \text{ superior} / 2)$$

$$Y_0 = (80 / 2) + 5 = \mathbf{40}$$

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_{x_0} = 4.034 / 43.21 \sqrt{1/2 + 1/7 + (42.5 - 37.86)^2 / (43.21)^2 * 2.55}$$

$$S_{x_0} = 0.093 \sqrt{0.4762 + 0.0643 / 0.0045} = \mathbf{0.075 \rightarrow 1,19}$$

Los valores de la DL₅₀ se calculan utilizando la ecuación de regresión determinada anteriormente: $Y = 43.21x - 102.14$ se sustituyó el valor de Y_0 por 40 que corresponde al 50% de mortalidad en la población tratada.

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

$$40 = 43.21x - 102.14$$

$$DL_{50} = 40 + 102.14 / 43.21 = 3, 28 \rightarrow [1947, 67 \text{ ppm}]$$

$$DI_{50} \approx 1947, 67 \text{ ppm} \pm 1, 19$$

$$DI_{50} = [1946, 48 \text{ --- } 1948, 86] \text{ ppm}$$

1947,67 ppm según la clasificación de Toxicidad del CYTED, el extracto etéreo de la especie *Citrus Aurantium* es prácticamente no tóxica. **Sánchez y Neira (2005:43)**

Calculo de la Dosis letal media (DL₅₀) Especie Vegetal *Ruta chalepensis*

Según los datos obtenidos en el conteo del Bioensayo, se realizó la tabla No. 16, donde:

Tabla 16. Extracto Etéreo (*Ruta Chalepensis*)

Concentración [X] ppm	Log de la concentración	vivos	muertos	tratados	% mortalidad
7000	3.85	0	32	32	100
3500	3.54	0	32	32	100
1750	3.24	10	22	32	68.75
875	2.94	15	17	32	53.13
437.5	2.64	18	14	32	43.75
218.75	2.34	22	10	32	31.25
109.375	2.04	24	8	32	25.00
54.68	1.74	26	6	32	18.75

Ver (Figura 5)

[X] ppm= las concentraciones utilizadas en ppm

Log de X= logaritmo de las concentraciones

Vivos= número de organismos que sobrevivieron a las concentraciones expuestas

Muertos: número de organismos que murieron a las concentraciones expuestas

Tratados= número total de organismos usados

% Mortalidad= mortalidad representada en porcentaje, se calcula a partir de la Ecuación 1

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Tabla 16.1 valores de X y Y para calcular coeficiente de correlación

Xi	Yi	Xi-\bar{X}	(Xi-\bar{X})²	(Yi-\bar{Y})	(Yi-\bar{Y})²	(Xi-\bar{X})(Yi-\bar{Y})
3.24	68.75	0.75	0.562	28.65	820.822	21.487
2.94	53.125	0.45	0.202	13.02	169.520	5.861
2.64	43.75	0.15	0.022	3.65	13.322	0.547
2.34	31.25	-0.15	0.022	-8.85	78.322	1.327
2.04	25	-0.45	0.202	-15.10	228.01	6.795
1.74	18.75	-0.75	0.562	-21.35	456.822	16.012
$\bar{X}=2.49$	$\bar{Y}=40.10$	$\sum=0.00$	$\sum=1.575$	$\sum=0.00$	$\sum=1765.820$	$\sum=52.031$

A partir de la tabla 16 se elaboró la tabla 16.1 donde:

Xi= Log de las concentraciones

Yi= % Mortalidad

\bar{X} = promedio de Xi (log de las concentraciones)

\bar{Y} = promedio de Yi (Mortalidad)

Nótese que los datos para las mortalidades del 100 por ciento, no se toman en cuenta ya que para el análisis de la DL₅₀ no son significativas.

Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

$$r = \sqrt{2.031 / \sqrt{(1.575)(1765.820)}} = \mathbf{0.98}$$

Ajuste del cálculo de la DL₅₀

Calculo de la Pendiente de la recta de mínimos cuadrados

$$b = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$b = 8.70 / 0.26 = \mathbf{33.46}$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con Artemia franciscana en las especie vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Calculo de la ordenada en el origen de la recta de mínimos cuadrados

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$a = 40.10 - 33.04 = -42.17$$

La ecuación para la recta de regresión es $Y = 33.04x - 42.1$

Calculo de la DL₅₀

Tabla 16.2 valores para calcular las desviaciones

Xi	Yi	(Xi) ²	ŷ	Yi- ŷ	(Yi- ŷ) ²
3.24	68.75	10.497	64.87	3.88	14.969
2.94	53.125	8.643	54.96	-1.84	3.404
2.64	43.75	6.969	45.05	-1.30	1.714
2.34	31.25	5.475	35.14	-3.89	15.200
2.04	25	4.161	25.23	-0.23	0.056
1.74	18.75	3.027	15.32	3.43	11.714
$\Sigma = 38.775$					$\Sigma = 47.061$

Cálculo del estadístico $S_{y/x}$; estima los errores aleatorios en la dirección Y.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{47.06/4} = 3.43$$

Calculo de la DL₅₀ y su error aleatorio

El valor de y_0 (% de mortalidad) calculado para el 50% de nuestra población:

$$Y_0 = (\% \text{ superior} / 2)$$

$$= (68.75/2) = 34,375$$

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_{x_0} = 3.43/33.04 \sqrt{(1/3) + (1/6) + (43.75 - 40.10)^2 / 1119.57} (0.26)$$

$$S_{x_0} = 0.1025 \sqrt{0.3333 + 0.1666 + 45.76 \cdot 10^{-03}} = 0.074 \rightarrow 1.18$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Los valores de DL₅₀ (X₀) se calculan utilizando la ecuación de regresión determinada anteriormente: $Y = 33.46x - 42.17$ sustituyendo el valor de % de mortalidad por 34,375 que corresponde al 50% de mortalidad de la población tratada.

$$Y = 33,46X - 42,17$$

$$DL_{50} = (34,375 + 42,17) / 33,46 = 2,28 \rightarrow [193,935 \text{ ppm}]$$

$$DL_{50} = 193,935 \pm 1.18$$

$$DL_{50} = [192,75 \text{---} 195,11]$$

193,935 ppm según la clasificación de toxicidades de CYTED, el extracto etéreo de la especie *Ruta chalepensis* es Moderadamente tóxica. **Sánchez y Neira (2005:43)**

Tabla 17. Datos obtenidos en el bioensayo (Extracto Alcohólico)

Concentración [X] ppm	Log de la concentración	vivos	muerdos	tratado	% mortalidad
14000	4.15	0	30	30	100
7000	3.85	0	30	30	100
3500	3.54	0	30	30	100
1750	3.24	4	26	30	86.7
875	2.94	7	23	30	76.7
437.5	2.64	8	22	30	73.3
218.75	2.34	10	20	30	66.7
109.375	2.04	12	18	30	60
		$\Sigma=24$	$\Sigma=239$	$\Sigma=30$	

Ver (Figura 6)

[X] ppm= las concentraciones utilizadas en ppm

Log de X= logaritmo de las concentraciones

Vivos= número de organismos que sobrevivieron a las concentraciones expuestas

Muertos: número de organismos que murieron a las concentraciones expuestas

Tratados= número total de organismos usados

% Mortalidad= mortalidad representada en porcentaje, se calcula a partir de la Ecuación 1

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Tabla 17.1 valores de X y Y para calcular coeficiente de correlación

Xi	Yi	Xi-\bar{X}	(Xi-\bar{X})²	(Yi-\bar{Y})	(Yi-\bar{Y})²	(Xi-\bar{X})(Yi-\bar{Y})
3.24	86.67	0.60	0.36	14.00	196	8.43
2.94	76.67	0.30	0.09	4.00	16	1.20
2.64	73.33	0.00	0.00	0.67	0.435	0.00
2.34	66.67	-0.30	0.09	-6.00	36.00	1.81
2.04	60.00	-0.60	0.36	-12.67	160.528	7.63
$\bar{X}=2.64$	$\bar{Y}=72.67$	$\Sigma=0.00$	$\Sigma=0.90$	$\Sigma=0.00$	$\Sigma=408.964$	$\Sigma=19.07$

A partir de la tabla 17 se elaboró la tabla 17.1 donde:

Xi= Log de las concentraciones

Yi= % Mortalidad

\bar{X} = promedio de Xi (log de las concentraciones)

\bar{Y} = promedio de Yi (Mortalidad)

Nótese que los datos para las mortalidades del 100 por ciento, no se toman en cuenta ya que para el análisis de la DL₅₀ no son significativas.

Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

$$r = 19,002/\sqrt{(0.90)(408.964)} = \mathbf{0.99}$$

Ajuste del cálculo de la DL₅₀

Calculo de la pendiente de la recta de mínimos cuadrados

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$b = 19.002/0.90 = \mathbf{21.113}$$

Cálculo de la ordenada en el origen de la recta de mínimos cuadrados

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$a = 72.67 - 21.113(2.64) = \mathbf{16.93}$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con Artemia franciscana en las especie vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

La ecuación para la recta de regresión es $Y = 21.11x + 16.93$

Calcular el error en la DL₅₀

Tabla 17.2 valores para calcular las desviaciones

Xi	Yi	(Xi)²	ŷ	Yi- ŷ	(Yi- ŷ)²
3.24	86.67	10.51	85.336	1.334	1.779
2.94	76.67	8.65	79.002	-2.332	5.438
2.64	73.33	6.97	72.668	0.662	0.438
2.34	66.67	5.47	66.334	0.336	0.112
2.04	60.00	4.15	60.00	0.00	0.001
Σ=2.64	Ŷ=72.67	Σ=35.78			Σ=7.768

Estadístico $S_{y/x}$; estima los errores aleatorios en la dirección Y.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{7.768/3} = \mathbf{1.61}$$

Cálculo de la DL₅₀ y su error aleatorio

El valor de y_0 calculado para el 50% de nuestra población:

$$Y_0 = (\% \text{ superior}/2)$$

$$Y_0 = (86.67 / 2) = \mathbf{43,35}$$

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_{x_0} = 1.61/21.113 \sqrt{(1/3)+(1/6)+(73.35-72.67)^2/442.63(0.91)}$$

$$S_{x_0} = 0.055 \sqrt{0.3333+0.1666+0.4356}/401.1942 = \mathbf{0.054} \rightarrow \mathbf{1.13}$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Los valores de la DL₅₀ (X₀) se calculan utilizando la ecuación de regresión determinada anteriormente: $Y = 21.113x + 17.103$ *sustituyendo* el valor de % de mortalidad para el 50% de la población (Y₀) por 43,35 que corresponde al 50% de la población tratada.

$$Y = 21.113x + 16.939$$

$$DL_{50} = 43,35 - 16.939/21.113 = 1,25 \rightarrow [17,82 \text{ ppm}]$$

$$DI_{50} = 17,82 \pm 1,13$$

$$DL_{50} = [18,95 \text{---} 16,69]$$

468.80 ppm según la clasificación de toxicidades de CYTED, el extracto acuoso de la especie *ruta Chalepensis* es moderadamente toxica. **Sánchez y Neira (2005:43)**

Tabla 18. Extracto Acuoso (*Ruta Chalepensis*)

Concentración [X] ppm	Log de la concentración	vivos	mueritos	tratados	% mortalidad
14000	4.15	0	19	19	100
7000	3.85	10	9	19	47.37
3500	3.54	11	8	19	42.11
1750	3.24	13	6	19	31.58
875	2.94	15	4	19	21.05
437.5	2.64	16	3	19	15.79
218.75	2.34	17	2	19	10.53
109.375	2.04	18	1	19	5.26

[X] ppm= las concentraciones utilizadas en ppm

Log de X= logaritmo de las concentraciones

Vivos= número de organismos que sobrevivieron a las concentraciones expuestas

Muertos: número de organismos que murieron a las concentraciones expuestas

Tratados= número total de organismos usados

% Mortalidad= mortalidad representada en porcentaje, se calcula a partir de la Ecuación 1

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Tabla 18.1 valores de X y Y para calcular coeficiente de correlación

Xi	Yi	Xi- \bar{X}	(Xi- \bar{X}) ²	(Yi- \bar{Y})	(Yi- \bar{Y}) ²	(Xi- \bar{X})(Yi- \bar{Y})
3.85	47.37	0.91	0.828	22.56	508.953	20.529
3.54	42.11	0.60	0.36	17.29	299.29	10.38
3.24	31.58	0.30	0.09	6.77	45.832	2.31
2.94	21.05	0.00	0.00	-3.76	14.137	0.00
2.64	15.79	-0.30	0.09	-9.02	81.360	2.706
2.34	10.53	-0.60	0.36	-14.29	203.9184	8.568
2.04	5.26	-0.90	0.81	-19.55	382.2025	17.595
$\bar{X}=2.94$	$\bar{Y}=24.81$		$\Sigma=2.538$		$\Sigma=1535.695$	$\Sigma=61.809$

A partir de la tabla 18 se elaboró la tabla 18.1 donde:

Xi= Log de las concentraciones

Yi= % Mortalidad

\bar{X} = promedio de Xi (log de las concentraciones)

\bar{Y} = promedio de Yi (Mortalidad)

Nótese que los datos para las mortalidades del 100 por ciento, no se toman en cuenta ya que para el análisis de la DL₅₀ no son significativas.

Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

$$r = 61.809 / \sqrt{(2.538)(1535.954)} = 0.99$$

Ajuste del Cálculo de la DL₅₀

Calculo de la pendiente de la recta de mínimos cuadrados

$$b = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$b = 61.809 / 2.538 = 24.35$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con Artemia franciscana en las especie vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Calculo de la ordenada en el origen de la recta de mínimos cuadrados

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$a = 24.81 - 24.35(2.94) = -46.78$$

La ecuación para la recta de regresión es $Y = 24.35x - 46.78$

Error en el Cálculo de la DL₅₀

Tabla 18.2 valores para calcular la desviación

X_i	Y_i	$(X_i)^2$	\hat{y}	$Y_i - \hat{y}$	$(Y_i - \hat{y})^2$
3.85	47.37	14.822	46.939	0.431	0.185
3.54	42.11	12.531	39.389	2.721	7.403
3.24	31.58	10.497	32.083	-0.503	0.253
2.94	21.05	8.643	24.778	-3.728	13.897
2.64	15.79	6.969	17.472	-1.682	2.829
2.34	10.53	5.475	10.166	0.364	0.132
2.04	5.26	4.161	2.860	2.4	5.76
$\Sigma = 63.13$				$\Sigma = 30.459$	

Estadístico $S_{y/x}$; estima los errores aleatorios en la dirección Y.

$$S_{y/x} = \sqrt{30.459/5} = 2.47$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Calculo de la DL₅₀ y su error aleatorio

El valor de y_0 para el 50% de nuestra población:

$$Y_0 = (\% \text{ superior} / 2)$$

$$Y_0 = (47.37 / 2) = 23,685$$

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

$$S_{x_0} = 2.75/14.83\sqrt{(1/2)+(1/7)+(26.31-24.81)^2/592.122(2.538)}$$

$$S_{x_0} = 0.1132\sqrt{0.5+0.1428+0.0600124157} = \mathbf{0.0906 \rightarrow 1.22}$$

Los valores de X₀ se calculan utilizando la ecuación de regresión determinada anteriormente: $Y = 24.35x - 46.78$ sustituyendo el valor de % de mortalidad para el 50% de la población (Y₀) por 23,685, que corresponde al 50% de mortalidad de la población tratada.

$$Y = 23.68x - 46.78$$

$$DL_{50} = (23,685+46.78)/24.35 = \mathbf{2,89 \rightarrow [783,14 \text{ ppm}]}$$

$$\mathbf{783,14 \text{ ppm} \pm 1.22}$$

$$DL_{50} = [781,92 \text{-----} 784,36]$$

783,14 ppm según la clasificación de toxicidades de CYTED, el extracto acuoso de la especie *ruta Chalepensis* es ligeramente tóxico. **Sánchez y Neira (2005:43)**

Tabla 19. Extracto Etéreo (*Eucaliptus Camaldulenses*)

CONCENTRACIONES [X] PPM	Log de la Concentraciones	vivo	Muertos	Tratados	% Mortalidad
14000	4.15	0	34	34	100
7000	3.85	0	34	34	100
3500	3.54	26	8	34	23.53
1750	3.24	27	7	34	20.59
875	2.94	29	5	34	14.71
437.5	2.64	30	4	34	11.76
218.75	2.34	31	3	34	8.8
109.37	2.04	32	2	34	5.9

Ver (figura 8)

[X] ppm= las concentraciones utilizadas en ppm

Log de X= logaritmo de las concentraciones

Vivos= número de organismos que sobrevivieron a las concentraciones expuestas

Muertos: número de organismos que murieron a las concentraciones expuestas

Tratados= número total de organismos usados

% Mortalidad= mortalidad representada en porcentaje, se calcula a partir de la Ecu. 1

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Tabla 19.1 valores de X y Y para calcular el coeficiente de correlación

X_i	Y_i	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$	$Y_i - \bar{y}$	$(Y_i - \bar{y})^2$	$(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{y})$
3.54	23.53	0.75	0.57	9.31	86.75	7.01
3.24	20.59	0.45	0.20	6.37	40.61	2.88
2.94	14.71	0.15	0.02	0.49	0.24	0.07
2.64	11.76	-0.15	0.02	-2.45	6.01	0.37
2.34	8.82	-0.45	0.20	-5.39	29.08	2.43
2.04	5.88	-0.75	0.57	-8.33	69.44	6.27
2.79	$\bar{Y} = 14.22$	0.00	1.59	0.00	232.12	19.04

A partir de la tabla 19 se elaboró la tabla 19.1 donde:

X_i = Log de las concentraciones

Y_i = % Mortalidad

\bar{X} = promedio de X_i (log de las concentraciones)

\bar{Y} = promedio de Y_i (Mortalidad)

Nótese que los datos para las mortalidades del 100 por ciento, no se toman en cuenta ya que para el análisis de la DL₅₀ no son significativas.

Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

$$r = 19.04 / \sqrt{1.59 * 232.12} = \mathbf{0.9922}$$

Ajuste de la recta de regresión de Y sobre X

Calculo de la pendiente de la recta de mínimos cuadrados

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$b = 19.04 / 1.59 = \mathbf{12}$$

Calculo de la ordenada del origen

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

$$a = 14.22 - (12)(2.79) = -19.29$$

La ecuación para la recta de regresión es $Y = 12x - 19.2$

Calculo de la DL₅₀

Tabla 19.2 valores para calcular desviaciones.

Xi	Yi	(Xi) ²	ŷ	Yi-ŷ	(Yi-ŷ) ²
3.54	23.53	12.56	23.25	0.28	0.08
3.24	20.59	10.52	19.63	0.96	0.92
2.94	14.71	8.66	16.02	-1.31	1.73
2.64	11.76	6.97	12.40	-0.64	0.40
2.34	8.82	5.48	8.79	0.03	0.00
2.04	5.88	4.16	5.17	0.71	0.51
	85.29				3.64

Estadístico $S_{y/x}$; estima los errores aleatorios en la dirección Y.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

$$S_{x/y} = \sqrt{3.64 / 4} = 0.95$$

Calculo de la DL 50 y su error aleatorio

El valor de y calculado (Y₀) para el 50% de Nuestra población

$$y_0 = (\% \text{superior} / 2)$$

$$y_0 = (23.53) / 2 = 11.76$$

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_{x_0} = 0.95 / 12 * \sqrt{1/3 + 1/6 + (14.71 - 14.22)^2 / (12)^2} = 1.59$$

$$S_{x_0} = 0.0395$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Los valores de X₀ se calculan utilizando la ecuación de regresión determinada anteriormente: Y= 12X - 19.29 sustituyendo el valor de Y₀= 11,76 que corresponde al 50% de mortalidad de la población tratada.

$$11,76 = 12X - 19.29$$

$$X = 11,76 + 19.29 / 12 = 2,58 \rightarrow [387,22 \text{ ppm}]$$

$$DL_{50} = 387,22 \pm 0.039$$

[387,14 ----- 387,22]

387,22 ppm según la clasificación de toxicidad del CYTED el extracto Etéreo de las especie Eucalipto Camaldulenses) moderadamente tóxico. **Sánchez y Neira (2005:43)**

Tabla 20. Extracto Alcohólico (*Eucalyptus Camaldulenses*).

Concentraciones (X) ppm	Log de la concentraciones	vivos	muerdos	tratados	%mortalidad
28000	4.45	0	32	32	100
14000	4.15	0	32	32	100
7000	3.85	3	29	32	90.63
3500	3.54	4	28	32	87.50
1750	3.24	9	23	32	71.88
875	2.94	12	20	32	62.50
437.5	2.64	15	17	32	53.12
218.75	2.34	18	14	32	43.75

Ver (figura 9)

Según los datos obtenidos en el conteo del Bioensayo, se realizó la tabla No. 19, donde:

[X] ppm= las concentraciones utilizadas en ppm

Log de X= logaritmo de las concentraciones

Vivos= número de organismos que sobrevivieron a las concentraciones expuestas

Muertos: número de organismos que murieron a las concentraciones expuestas

Tratados= número total de organismos usados

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

% Mortalidad= mortalidad representada en porcentaje, se calcula a partir de la Ecuación 1

Tabla 20.1 valores de X y Y para calcular el coeficiente de correlación

X_i	Y_i	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$	$Y_i - \bar{y}$	$(Y_i - \bar{y})^2$	$(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{y})$
3.85	90.63	0.75	0.57	22.40	501.57	16.85
3.54	87.50	0.45	0.20	19.27	371.37	8.70
3.24	71.88	0.15	0.02	3.65	13.29	0.55
2.94	62.50	-0.15	0.02	-5.73	32.82	0.86
2.64	53.13	-0.45	0.20	-15.10	228.14	6.82
2.34	43.75	-0.75	0.57	-24.48	599.23	18.42
$\bar{X} = 3.09$	$\bar{Y} = 68.23$	0.00	1.59	0.00	1746.42	52.21

A partir de la tabla 20 se elaboró la tabla 20.1 donde:

X_i = Log de las concentraciones

Y_i = % Mortalidad

\bar{X} = promedio de X_i (log de las concentraciones)

\bar{Y} = promedio de Y_i (Mortalidad)

Nótese que los datos para las mortalidades del 100 por ciento, no se toman en cuenta ya que para el análisis de la DL₅₀ no son significativas.

Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

$$r = 52.21 / \sqrt{1.59 * 1746.42} = \mathbf{0.992}.$$

Ajuste de la recta de regresión de Y sobre X.

Calculo de la pendiente de la recta de mínimos cuadrados

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con Artemia franciscana en las especie vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

$$b = 52.21/1.59 = \mathbf{32.92}$$

Calculo de la ordenada en el origen de la recta de mínimos cuadrados

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$a = 68.23 - (32.92 \cdot 3.09) = \mathbf{-33.49}$$

La ecuación para la recta de regresión es $Y = 32.92x + -33.49$

Calculo del error de la DL₅₀

Tabla 19.2 valores para calcular desviaciones.

X_i	Y_i	$(X_i)^2$	\hat{y}	$ Y_i - \hat{y} $	$(Y_i - \hat{y})^2$
3.85	90.63	14.78	93.15	-2.53	6.38
3.54	87.50	12.56	82.96	4.54	20.61
3.24	71.88	10.52	73.1	-1.22	1.50
2.94	62.50	8.66	63.24	-0.74	0.55
2.64	53.13	6.97	53.38	-0.26	0.07
2.34	43.75	5.48	43.52	0.23	0.05
	409.39				29.15

Estadístico $S_{y/x}$, estima los errores aleatorios en la dirección Y.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

$$S_{x/y} = \sqrt{29.15 / 4} = \mathbf{2.70}$$

Calculo de la DL₅₀ y su error aleatorio.

El valor de y_0 (% de Mortalidad) calculado para el 50% de nuestra población se calcula de la siguiente manera:

$$y_0 = (\% \text{superior} / 2)$$

$$y_0 = 90.63/2 = \mathbf{45,315}$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_{X_0} = 2.70/32.92 \sqrt{1/3 + 1/6 + (67.19-68.23)^2 / (32.92)^2} * 1.59$$

$$S_{X_0} = \mathbf{0.0577}$$

Los valores de X₀ se calculan utilizando la ecuación de regresión determinada anteriormente: Y=32.92x - 33.49 sustituyendo el valor de % de mortalidad del 50% de la población por 45,315 que corresponde al 50% de mortalidad de la población tratada.

$$45,315 = 32.92x - 33.49$$

$$DL_{50} = 45,315 + 33.49 / 32.92 = \mathbf{2, 39} \rightarrow \mathbf{[247, 65 \text{ ppm}]}$$

$$DL_{50} = \mathbf{247, 65} \pm 0.057$$

$$DL_{50} = [247,59 \text{ ---- } 247,71]$$

247,65 ppm según la clasificación de toxicidad del CYTED el extracto alcohólico de las especie *Eucalyptus camaldulenses* es Moderadamente tóxico. **Sánchez y Neira (2005:43)**

Tabla 21. Extracto Acuoso (*Eucaliptus camaldulenses*).

CONCENTRACIONES [X] PPM	Log de la Concentraciones	Vivos	Muertos	Tratados	% Mortalidad
28000	4.45	0	25	25	100
14000	4.15	12	13	25	52.00
7000	3.85	14	11	25	44.00
3500	3.54	15	10	25	40.00
1750	3.24	16	9	25	36.00
875	2.94	17	8	25	32.00
437.5	2.64	20	5	25	20.00
218.75	2.34	21	4	25	16.00

Ver (figura 10)

[X] ppm= las concentraciones utilizadas en ppm

Log de X= logaritmo de las concentraciones

Vivos= número de organismos que sobrevivieron a las concentraciones expuestas

Muertos: número de organismos que murieron a las concentraciones expuestas

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especies vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

Tratados= número total de organismos usados

% Mortalidad= mortalidad representada en porcentaje, se calcula a partir de la Ecuación 1

Tabla 21.1 valores de X y Y para calcular el coeficiente de correlación

Xi	Yi	Xi- \bar{X}	(Xi- \bar{X}) ²	Yi- \bar{y}	(Yi- \bar{y}) ²	(Xi- \bar{X})(Yi- \bar{y})
4.15	52.00	0.90	0.82	17.71	313.80	16.00
3.85	44.00	0.60	0.36	9.71	94.37	5.85
3.54	40.00	0.30	0.09	5.71	32.65	1.72
3.24	36.00	0.00	0.00	1.71	2.94	0.00
2.94	32.00	-0.30	0.09	-2.29	5.22	0.69
2.64	20.00	-0.60	0.36	-14.29	204.08	8.60
2.34	16	-0.90	0.82	-18.29	334.37	16.51
3.24	34.29	0.00	2.54	0.00	987.43	49.37

A partir de la tabla 21 se elaboró la tabla 21.1 donde:

Xi= Log de las concentraciones

Yi= % Mortalidad

\bar{X} = promedio de Xi (log de las concentraciones)

\bar{Y} = promedio de Yi (Mortalidad)

Nótese que los datos para las mortalidades del 100 por ciento, no se toman en cuenta ya que para el análisis de la DL₅₀ no son significativas.

Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

$$r = 49.37 / 2.54 * 987.43 = \mathbf{0.9863}$$

Ajuste de la recta de regresión de Y sobre X

Calculo de la pendiente de la recta de mínimos cuadrados

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con Artemia franciscana en las especie vegetales *Citrus aurantium* L., *Ruta chalepensis* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

$$b = 49.37/2.54 = \mathbf{19.46}$$

Ordenada en el origen de la recta de mínimos cuadrados

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$a = 34.29 - 19.46(3.24) = \mathbf{-28.81}$$

La ecuación para la recta de regresión es $Y = 19.46x - 28.81$

Calculo del error de la DL₅₀

Tabla 21.2 valores para calcular las desviaciones.

X_i	Y_i	$(X_i)^2$	\hat{Y}	$ Y_i - \hat{y}_i $	$(Y_i - \hat{y}_i)^2$
4.15	52	17.19	51.88	0.12	0.0144
3.85	44	14.78	46.06	-2.06	4.2436
3.54	40	12.56	40.05	-0.05	0.0025
3.24	36	10.52	34.23	1.77	3.1329
2.94	32	8.66	28.41	3.59	12.8881
2.64	20	6.97	22.58	-2.58	6.6564
2.34	16	5.48	16.76	-0.76	0.5776
	240				27.52

Estadístico $S_{y/x}$; estima los errores aleatorios en la dirección Y

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{27.52/5} = \mathbf{2.35}$$

Calculo de la DL₅₀ y su error aleatorio

El valor de y_0 calculado para el 50% de nuestra población:

$$y_0 = (\% \text{superior}/2)$$

$$y_0 = 52/2 = \mathbf{26}$$

Determinación de la DL₅₀ aplicando bioensayo con *Artemia franciscana* en las especie vegetales *Citrus aurantium L.*, *Ruta chalepensis L.*, *Eucalyptus camaldulensis Dehnh* laboratorio de química, UNAN-MANAGUA Enero-octubre 2017

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_{x_0} = 2.35/19.46 * \sqrt{1/2 + 1/7 + (34 - 34.29)^2 / (19.46)^2 * 2.54}$$

$$S_{x_0} = \mathbf{0.078}$$

Los valores de X₀ se calculan utilizando la ecuación de regresión determinada anteriormente: Y= 3 -28.81) sustituyendo el valor de Y₀ por 26, que corresponde al 50% de mortalidad de la población tratada.

$$26 = 19.46X - 28.81$$

$$DL_{50} = 26 + 28.81 / 19.46 = \mathbf{2,816} \rightarrow \mathbf{[655, 46 \text{ ppm}]}$$

$$DL_{50} = \mathbf{655, 46} \pm 0.07$$

$$DL_{50} = [655, 39 \text{----} 655.53]$$

655,46 ppm según la clasificación de toxicidad del CYTED el extracto acuoso de las especie Eucalipto Camaldulenses es Ligeramente tóxico. **Sánchez y Neira (2005:43)**