

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA GENERAL SOBRE *Artemia salina* DE EXTRACTOS PROVENIENTES DE *Baccharis latifolia*.

GLORIA MILENA MORENO MORAN

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
SAN JUAN DE PASTO
2004**

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA GENERAL SOBRE *Artemia salina* DE EXTRACTOS PROVENIENTES DE *Baccharis latifolia*.

GLORIA MILENA MORENO MORAN

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Químico

**Asesor
M.Sc. JUAN JOSE LOZADA**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
SAN JUAN DE PASTO
2004**

DEDICATORIA

Todos los esfuerzos consignados en esta investigación se los dedico a las tres personas que son el pilar fundamental de mi vida: mi mamá FANNY MORAN y mi papá VICTOR MORENO, quienes han sido el ejemplo más claro de perseverancia, inteligencia y honestidad; y mi hermanito CRISTIAN ALEXANDER, modelo de juventud y de ideas novedosas.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis agradecimientos a las siguientes personas y entidades que desinteresadamente colaboraron para el desarrollo de los diferentes aspectos dentro de esta investigación:

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

M.Sc. JUAN JOSE LOZADA

M.Sc. JAQUELINE MENA

M.Sc. JESUS ROMO

Químico NELSON HURTADO

Botánico BERNARDO PAZ REBOLLEDO

Ingeniero Químico NESTOR APRAEZ

Biólogo OSCAR BURBANO FIGUEROA

Químico MARTIN SERRANO

Lic. Idiomas DALIA MARITZA SILVA

Sección de Laboratorios UDENAR

A todas las personas que de alguna manera colaboraron en el desarrollo de este trabajo

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	15
1. MARCO TEORICO	17
1.1 <i>Baccharis latifolia</i>	17
1.1.1 Descripción	17
1.1.2 Hábitat y distribución	17
1.1.3 Usos e importancia económica	18
1.1.4 Fitoquímica	18
1.2 EL USO DE ENSAYOS BIOLOGICOS EN LA EVALUACION DE PRODUCTOS NATURALES	19
1.3 BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BST): UN RAPIDO ENSAYO DE ACTIVIDAD BIOLOGICA PARA COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOLOGICA	23
1.4 EXTRACCION EN FASE SÓLIDA SPE (SOLID PHASE EXTRACTION)	24
1.4.1 Acondicionamiento	25
1.4.2 Retención	26
1.4.3 Lavado	27
1.4.4 Elusión	28
2. MÉTODOLOGIA	26
2.1 IDENTIFICACION DEL MATERIAL VEGETAL	26
2.2 PREPARACION DE EXTRACTOS ORGÁNICOS PARA EL ENSAYO BST	26
2.3 PREPARACIONES DE EXTRACTOS ACUOSOS PARA EL ENSAYO	28

BSL	
2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	29
2.4.1 Ensayo de actividad biológica general BST	29
2.4.2 Fraccionamiento de extractos acuosos por extracción en fase sólida – fase reversa SPE-ODS (Solid Phase Extraction - OctaDecilSilano)	31
2.4.3 Parámetros operacionales del Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas	33
2.5 MÉTODOS ESTADÍSTICOS	33
2.5.1 Análisis Probit e intervalos de confianza	33
2.5.2 Comparación de CL₅₀ e intervalos de confianza	34
3. RESULTADOS Y DISCUSION	36
3.1 IDENTIFICACION DEL MATERIAL VEGETAL	36
3.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA BST DE LOS EXTRACTOS ORGANICOS DE <i>Baccharis latifolia</i>	36
3.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA BST DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Baccharis latifolia</i>	38
3.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA BST DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR SPE ODS DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>B. latifolia</i>	44
3.5 ANALISIS DE CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS GC/MS	45
	57
4. CONCLUSIONES	
5. RECOMENDACIONES	58
CITAS BIBLIOGRAFICAS	60
BIBLIOGRAFIA	71
ANEXOS	76

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Polaridad de los solventes orgánicos utilizados	27
Tabla 2. Condiciones ambientales del Parque Ecológico Chimayoi	29
Tabla 3. Pasos a seguir durante el fraccionamiento SPE ODS del extracto crudo	33
Tabla 4. Determinación de la significancia de las diferencias de las CL ₅₀ de los extractos acuosos crudos de <i>Baccharis latifolia</i>	44
Tabla 5. Determinación de la significancia de las diferencias de las CL ₅₀ entre los extractos acuosos crudos y entre las réplicas de la fracción MeOH SPE ODS de <i>Baccharis latifolia</i>	45
Tabla 6. Determinación de la significancia de la diferencia de las CL ₅₀ entre los extractos acuosos crudos y entre las replicas de la fracción MeOH SPE ODS de <i>B. latifolia</i>	45
Tabla 7. Espectros de masa y tiempos de retención de los compuestos presentes en la fracción MeOH SPE-ODS del extracto acuoso de <i>B. latifolia</i>	50

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Fórmulas estructurales de los compuestos aislados de <i>Baccharis latifolia</i>	20
Figura 2. Diagrama general para la preparación de las soluciones destinadas al ensayo BST	30
Figura 3. Diagrama explicativo para el ensayo BST	32
Figura 4. Microfotografías de capítulos y flores machos y hembras de <i>Baccharis latifolia</i>	37
Figura 5. Comparación entre las curvas LDR para cada ensayo con los extractos acuosos de <i>B. latifolia</i> hembra y presentación de los datos experimentales como puntos dispersos (Log dosis vs. probit)	42
Figura 6. Solapamiento de los intervalos de confianza para la CL ₅₀ de las curvas LDR para los extractos acuoso crudos de <i>B. latifolia</i> hembra (Log dosis vs. probit)	43
Figura 7. Comparación entre las curvas LDR para cada ensayo con las fracciones MeOH SPE ODS obtenidas del fraccionamiento del extracto acuoso de <i>B. latifolia</i> hembra y presentación de los datos experimentales como puntos dispersos (Log dosis vs. probit).	46
Figura 8. Solapamiento de los intervalos de confianza para la CL ₅₀ de las curvas LDR obtenidas para las fracciones MeOH SPE ODS del fraccionamiento de los extractos crudos acuosos de <i>B. latifolia</i> hembra (Log dosis vs. probit).	47
Figura 9. Comparación entre las curvas LDR para las fracciones MeOH SPE ODS y para los extractos crudos acuosos (Log dosis vs. probit).	48
Figura 10. Comparación entre las curvas LDR para los extractos acuosos crudos (Log dosis vs. mortalidad (%)) respuesta.	49
Figura 11. Cromatograma iónico total de la fracción MeOH SPE ODS del extracto crudo acuoso de <i>B. latifolia</i> hembra	52
Figura 12. EI-MS de los picos más representativos del Cromatograma iónico total de la fracción MeOH SPE ODS	53

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Distribución tropandina de <i>Baccharis latifolia</i>	76
Anexo B. Microfotografías de algunos estados de desarrollo de <i>Artemia salina</i>	77
Anexo C. Condiciones Ambientales de los sitios de recolección de <i>Baccharis latifolia</i>	78
Anexo D. Figuras comparativas entre capítulos y flores de <i>Baccharis latifolia</i>	79
Anexo E. Montajes de laboratorio para el ensayo BST	81
Anexo F. Determinación del peso seco de las hojas y los cogollos de <i>Baccharis latifolia</i>	83
Anexo G. Análisis Probit de la actividad biológica BST del extracto acuoso crudo de <i>Baccharis latifolia</i>	84
Anexo H. Determinación de los valores f y de la desviación típica de cada uno de los ensayos	87
Anexo I. Análisis probit de la actividad biológica BST de la fracción MeOH SPE ODS del extracto crudo acuoso de <i>B. latifolia</i>	89
Anexo J. Datos calculados por el programa PROBIT para la elaboración de las curvas log-dosis probit-respuesta y log-dosis mortalidad- respuesta	92
Anexo K. Presentación de un programa básico de análisis Log dosis- Probit para un microordenador	93

RESUMEN

Baccharis latifolia es una compuesta particular de la región Andina, que crece entre los 2000 y 2800 m.s.n.m., de amplio uso en la medicina popular. La actividad biológica general de las plantas hembras de esta especie fue evaluada sobre nauplios de *Artemia salina* (Bhrine Shrimp Test, BST). Se prepararon extractos orgánicos con metanol (MeOH), diclorometano (DCM) y hexano (HEX) por maceración de hojas y cogollos secos (120 horas, temperatura ambiente, oscuridad), los cuales no exhibieron actividad biológica general BST (24 horas). Durante la segunda parte de la investigación se prepararon extractos acuosos de cogollos frescos por decocción (reflujo cerrado, 30 minutos) en tubos Pyrex con tapa rosca de trifluoroetileno (TFE). Los extractos acuoso exhibieron actividad biológica general BST con una Concentración Letal Media (CL₅₀) promedio de 1562,79 mg peso fresco/litro. Este extracto fue fraccionado por extracción en fase sólida reversa, SPE-ODS (Solid Phase Extraction – OctaDecilSilano), empleando tres eluentes: MeOH, DCM, HEX e i-octano; mostrando actividad biológica general BST, la fracción MeOH de color amarillo a una CL₅₀ promedio de 3038,60 mg peso fresco/litro. Las diferencias encontradas entre las CL₅₀ de los extractos crudos acuosos y de las fracciones MeOH SPE ODS fueron no significativas, exhibiendo además solapamiento entre los intervalos de confianza (0,95). A partir de ello es posible concluir que la mayor parte de los compuestos activos están presentes en la fracción MeOH SPE-ODS del extracto acuoso de *B. latifolia* hembra. El análisis GC/MS (Gas Chromatography / Mass Spectrometry) de la fracción MeOH SPE-ODS permitió el reconocimiento de once compuestos principales; estos compuestos exhiben patrones de fragmentación similar con un pico base de m/z 44 y posibles iones moleculares con m/z de 207 y 208.

Palabras clave: *Baccharis latifolia*, *Artemia salina*, extractos vegetales, concentración letal media (CL₅₀), análisis probit, bioensayo de actividad general.

ABSTRACT

Baccharis latifolia is a characteristic compositae from Andean region, at altitude between 2000 – 2800 meters. It's widely used in medicine by local population. Female-plants general biological activity of this specie were determined using *Artemia salina* nauplius larvae, or Brine Shrimp Test (BST). Dried leaves and tips were extracted with methanol (MeOH), diclorometane (DCM) and hexane (HEX) for 120-hours at room temperature and darkness. These extracts don't show BST general biological activity. During second phase of this research, fresh tips were extracted with water by decoction (closed reflux, 30 minutes) using Pyrex tubes and trifluoroethylene (TFE) screw tap. Water extracts show BST general biological activity, having mean value of media letal concentration (LC₅₀) at 1562,79 mg fresh weight/liter. This extract was fractionated by reversed octadecilsilane (ODS) solid phase extraction (SPE), using three eluent: MeOH, DCM, HEX and i-octane. Yellow colour MeOH SPE-ODS fraction exhibitet BST biological activity had mean LC₅₀ at 3038,60 mg fresh weight/liter. The founding differences between crude water extracts and MeOH SPE ODS fractions did not have significant value. In addition, the confidence intervals (0,95) had overlaping. Thus, it's possible to deduce that most active compounds is occurring at the MeOH SPE-ODS fraction of female *B. latifolia* crude-water extract. Gas chromatography / Mass Spectrometry (GC/MS) analysis of MeOH SPE-ODS fraction showed the presence of eleven major compounds. Similar patterns were observed for these compounds, which display a base peak at m/z 44 and possible molecular ion at m/z 207 and 208.

Keywords: *Baccharis latifolia*, *Artemia salina*, lethal media concentration (LC₅₀), probit analysis, plant extract, general activity bioassay (BST)

INTRODUCCION

Centenares de compuestos orgánicos de origen botánico son publicados en las revistas especializadas dedicadas a la fitoquímica. De acuerdo a lo considerado por Farnsworth y Loub¹ la mayoría de estos compuestos carecen de valor industrial, limitándose el interés de los científicos dedicados a este campo a sólo aislar, caracterizar y publicar, sin que su trabajo tenga mayor significado.

Gran parte de los esfuerzos de estos grupos de investigación tendrían sentido si no solo se tratase de aislar e identificar compuestos, sino de aislar aquellos que puedan tener valor farmacéutico, o en otras palabras aquellos compuesto que tengan actividad biológica. Esto se puede lograr empleando técnicas de separación de compuestos, métodos analíticos de elucidación estructural y bioensayos así como lo recomiendan McLaughlin, *et al.*,² y, Farnsworth y Loub³. Los fitoquímicos están muy familiarizados con los primeros, pero ignoran la última técnica muy posiblemente porque es más pertinente de biólogos y microbiólogos.

Muchos de los esfuerzos desechados por los químicos de productos naturales en el aislamiento e identificación de metabolitos biológicamente inactivos, podrían dedicarse a la identificación de productos botánicos que tengan actividad biológica.

Según Farnsworth y Loub⁴, en la actualidad las compañías farmacéuticas invierten altas sumas de dinero en el desarrollo de bioensayos robóticos *in-vitro*; mediante los cuales se investigan mecanismos de acción específicos ya conocidos, siendo necesario evaluar una y otra vez una sustancia con posible actividad biológica.

Adicionalmente existen bioensayos generales que permiten evaluar una gran cantidad de sustancias bioactivas con diferentes mecanismos de acción. Una acción lógica sería, que una vez evaluada la actividad biológica general y desechados los productos naturales que den resultados negativos, evaluar la actividad biológica específica de aquellos que resultan ser activos.

Por otra parte, en el territorio nariñense existen cientos de plantas, muchas de ellas empleadas por las comunidades locales con fines medicinales, y cuyo uso medicinal popular se remonta a los primeros pobladores. Una de las estrategias empleadas por muchas compañías farmacéuticas internacionales en el desarrollo de nuevos fármacos ha sido la valoración científica de esa información. La finalidad principal de este trabajo es precisamente evaluar la actividad biológica general sobre *Artemia salina* de las plantas hembras de *Baccharis latifolia* una de las especies mas ampliamente difundidas en la zona andina, y empleada localmente con fines medicinales. Se estudiaron únicamente los ejemplares femeninos puesto que en un estudio de Jarvis *et al.*⁵ se encontró que las plantas hembra de una de las especies de este género (*Baccharis coridifolia*), eran más tóxicas que las masculinas.

El bioensayo general sobre larvas de *Artemia salina* conocido como BST por sus siglas en inglés (Brine Shrimp Lethality Test), se aplicó a los extractos de *B. latifolia*, puesto que algunos autores^{6,7,8,9,10,11} han encontrado que constituye una prueba conveniente para medir la actividad biológica general de los compuestos activos provenientes de plantas. Las ventajas de esta técnica radican en que las larvas de este camarón son sensibles a gran variedad de sustancias de origen vegetal; además, no se requiere de asepsia, ni de un difícil mantenimiento de colonias de animales, así como tampoco de una infraestructura costosa.

Uno de los inconvenientes encontrados por Villacrés *et al.*¹² en la literatura es la publicación de compuestos orgánicos provenientes de plantas de cuya identificación taxonómica no se tiene certeza, invalidando por completo tal información (Villacrés *et al.*, 1995). En consecuencia este trabajo ha dedicado esfuerzos en la descripción e identificación adecuada de los especímenes vegetales empleados. Por otra parte los productos naturales, presentan una composición química heterogénea, siendo la actividad biológica el parámetro de comparación más recomendado.

Por lo tanto en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos específicos: realizar inicialmente el reconocimiento taxonómico adecuada de la especie botánica, y del sexo de la planta; posteriormente evaluar la actividad biológica general de los extractos crudos y de las fracciones de los extractos crudos positivos de las plantas hembras de *Baccharis latifolia*; y finalmente analizar las fracciones positivas mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

1. MARCO TEORICO

1.1 *Baccharis latifolia*

Gentry¹³ ha reportado que el género *Baccharis* es uno de los más importantes en los Andes, comprende alrededor de 400 especies, en su mayoría arbustos. La mayor parte presenta pequeñas hojas resinosas coriáceas, generalmente trinerviadas, enteras o escasamente dentadas. Dioicas, siendo esta característica la que distingue al género en la tribu *Astereae*. Los capítulos hembra y macho difieren en tamaño. La clasificación taxonomica de la especie es: género: *Baccharis*; tribu: *Astereae*; familia: *Compositae*; orden: *Asterales*; clase: *Magnoliopsida*; división: *Angiospermophyta*; reino: *Plantae*.

1.1.1 Descripción. Cuatrecasas¹⁴, Cuatrecasas¹⁵ y, Dias-Piedrahita y Cuatrecasas¹⁶ han realizado amplios estudios sobre la especie *Baccharis*, de los cuales se ha extractado la siguiente información. *Baccharis latifolia* se presenta como arbolitos o arbustos de 1.5-6 m altura, ramosos, ramas terminales estriadas, verdes, glabras, las juveniles ligeramente pubérulas y más o menos glanduloso-resinosas. Hojas alternas pecioladas, subcartáceas, peciolo de 1-3 cm long., engrosados en la base, planos en la cara adaxial; lámina ovado-lanceolada, base atenuada-cuneada, ápice angosto-acuminado, agudo, margen entera hacia la base, uniformemente aserrada en el resto de su extensión, 6-15 cm long. x 1.2-5 cm lat., triplinervia, glabra en ambas caras o ligeramente glanduloso granulada, nervios laterales impresos por la haz, prominentes por el envés al igual que los transversales.

Inflorescencias terminales multifloras corimboso-paniculadas de 10-16 cm lat., foliosas hacia la base, pedicelos angulosos más o menos glandulosos, bracteolados, brácteas angostas, lineares, glabras; pedicelos y brácteas decrecientes hacia la porción superior, últimos capítulos sésiles. Capítulos femeninos subhemisféricos de 5 mm altura, involucre de 3,5-4 mm altura formado por 40-60 filarias imbricadas 4-5 seriadas, membranáceas, glabras, ceroso-ciliadas, las exteriores ovadas, subagudas 1-2 mm, las interiores lanceoladas, gradualmente más largas y delgadas. Receptáculo cónico, alveolado. Flores femeninas 100-180 por capítulo; corola blanca, filiforme de 2 mm longitud, ápice 5-dentado, levemente pilósulo, estilo exserto 3-4 mm longitud, glabro, bifido, tubulado y diminutamente papiloso; ovario glabro, aquenios oblongos 5-costados, glabros o diminutamente glandulosos, papus blanco 3-4 mm longitud, uniseriado y estrigoso. Capítulos masculinos hemisféricos de 5-6 mm diámetro, involucre semejante al de los capítulos femeninos, pero con las filarias purpúreas hacia el apice; receptáculo más o menos plano y alveolado. Flores masculinas 15-32 por capítulo; corola tubulosa blanca de 4 mm longitud, tubo recto, limbo tubuloso-campanulado 5-laciniado, anteras de 1,5 mm longitud, estilo exserto, bifido, papiloso; papus blanco de 4 mm, ovario rudimentario glabro. El número cromosómico haploide para esta especie es $n = 18$.

1.1.2 Hábitat y distribución geográfica. Según Cuatrecasas¹⁷ esta especie es particular de la región andina se extiende desde Venezuela hasta Bolivia y norte de Argentina (Anexo

A); se encuentra principalmente entre 2000-2800 m de altitud, pero puede subir hasta cerca de los 3500 m y aparecer excepcionalmente en alturas cercanas a los 1000 m. En Colombia se comporta como un elemento del bosque andino y de los matorrales del subpáramo donde se presenta ya sea como arbolitos aislados o formando matorrales subseriales más o menos grandes que invaden paramos alterados y zonas deforestadas o terrenos pendientes y erosionados. Ha sido colectada en Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Choco, Córdoba, Cundinamarca, Huila, Nariño, Norte de Santander, Putumayo, Santander, Tolima y Valle.

1.1.3 Usos e importancia económica. En la recopilación de la información efectuada por Correa y Bernal¹⁸ a cerca de *Baccharis latifolia* se encontró que esta planta fue ampliamente usada por los primitivos pobladores de América. La infusión de sus hojas se usaba para la diarrea verde de los niños; sus hojas soasadas se aplican sobre sitios correspondientes a fracturas óseas, para desinflamar y ayudar a la consolidación. Por otra parte, una de las designaciones vernáculas más extendidas es la de Chilca, que incluye a otras especies del genero *Baccharis*.

Según García Barriga¹⁹ las hojas aplicadas en forma de cataplasma sirven para calmar los dolores reumáticos y de la cintura, es también preconizada (recetada, formulada) en las afecciones bronquiales y pulmonares. Entre las propiedades terapéuticas más importantes asignadas a esta especie tenemos: toda la parte aérea de la planta fresca y a una dosis del 5% actúa como buen tónico amargo, antidiabético y eupéptico; también es utilizada en las enfermedades hepáticas. Según parece esta planta en dosis elevadas es toxica.

Correa y Bernal²⁰ dan a conocer que las hojas frescas y tiernas excretan un líquido viscoso que es aplicado como vulnerario. No hace falta ninguna preparación, ya que las hojas limpias pueden ser aplicadas directamente sobre las heridas o afecciones de la piel; también pueden ser beneficiosas aplicadas externamente cuando se las utiliza calientes en áreas, donde hay dolor reumático. En algunas regiones del departamento de Caldas emplean las hojas de esta planta como emoliente en forma de emplastos, baños y vapores. Las hojas frescas y en papilla se emplean en forma de cataplasma, como reductor de luxaciones y hernias. Las hojas y las flores frescas y secas, en decocción son utilizadas para calmar la tos y la bronquitis. Secas, molidas y mezcladas con la grasa de “llama” se usan para preparar una pomada desinfectante de heridas.

Perez Arbelaez²¹ señala que en la antigüedad, cuando los colores de las anilinas no se habían inventado, y era muy difícil dar el color verde a las telas, porque la naturaleza casi no facilita otros estables que el rojo, el amarillo, el azul y el negro (los cuales no siempre se podían combinar a causa del carácter químico de los extractos); los indígenas neogranadinos tenían el secreto de la coloración verde en esta planta paramuna. Posteriormente se averiguo que el principio colorante no era normal de la planta, sino efecto del parasitismo de un hongo: *Dothidella tintorea*, disperso en los Andes colombianos y ecuatorianos.

1.1.4 Fitoquímica. De acuerdo a lo reportado por García y Barriga²², la cera que se obtiene de *B. latifolia* y *B. salicifolia*, en Argentina es producida por un pequeño insecto del

genero *Coccus*, y del cual estas dos especies son su hábitat característico; además, *B. latifolia* contiene especialmente en las hojas resinas, oxidasas, un principio amargo, un alcaloide llamado bacarina, una sustancia de fórmula molecular $C_{20}H_{41}OH$ y posiblemente trementina.

Correa y Bernal²³ indican que también contiene, eudesmano, taninos galicos, quercetina, quercitrina y rutina (flavonoles) (Correa y Bernal, 1990).

Bohlman, *et al.*²⁴ aislaron de las raíces de *B. latifolia* (200 g) los compuestos: **35** (60 mg), **29** (8 mg) derivado con timol y las *p*-hidroxiacetofenonas **21** (6 mg), **22** (21mg), **23** (7 mg).

Zdero, *et al.*²⁵ obtuvieron de las partes aéreas de *B. latifolia*, el *ent*-labdano **36**, dos derivados del compuesto **36** los cuales estuvieron presentes en pequeñas cantidades, el metil malonato **37**, el inusual ester sesquiterpeno del malonato **38**. Adicionalmente al derivado con el ácido cinámico **25**, varios sesquiterpenos fueron aislados, bacchascandone **42**, el isómero **43**, el hidroxigermacradieno **44** y los derivados del bisaboleno **39**, **40** y **41**. Las fórmulas estructurales del eudesmano y de los compuestos designados con números en negrilla se presentan en la figura 1.

1.2 EL USO DE ENSAYOS BIOLÓGICOS EN LA EVALUACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES

Los bioensayos o ensayos de actividad biológica ofrecen una ventaja especial en la estandarización y control de calidad de productos botánicos heterogéneos. Carbonell²⁶ y Moreno, *et al.*²⁷ consideran que tales productos pueden ser heterogéneos, debido a la presencia de mezclas de compuestos con actividad biológica, bien sea proveniente de la misma fuente, o de varias fuentes mezcladas a propósito.

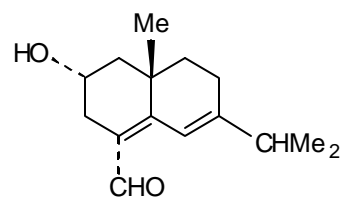
Skoog²⁸ manifiesta que los métodos de análisis físico, tales como la cromatografía, son útiles para la identificación de una gran diversidad de compuestos; siempre y cuando, estos se encuentren en niveles de concentración suficientes para ser detectados. Sin embargo, McLaughlin *et al.*²⁹, y Glanszpigel y Rosenkranz³⁰, anotan que este tipo de técnicas carecen de la capacidad de determinar la potencia de los principios activos de fórmula desconocida o de los principios activos conocidos que se encuentren en una mezcla compleja como tejidos y extractos orgánicos; por lo tanto deben ser aplicadas simultáneamente con ensayos biológicos.

Farnsworth y Loub³¹ comentan que en la mayoría de las veces la respuesta biológica deseada no se debe a uno, sino a una mezcla de componentes vegetales con actividad biológica, donde las proporciones relativas de cada compuesto bioactivo, como lo afirma McLaughlin³², pueden variar de un lote a otro, mientras que la bioactividad aun permanece dentro de límites tolerables. En consecuencia, el análisis físico o químico de un único componente en tales mezclas no es completamente satisfactorio. Existen una serie de bioensayos que han sido desarrollados para ayudar en el trabajo de “descubrir fármacos” de origen botánico. McLaughlin *et al.*³³ y Moreno *et al.*³⁴ muestran que estos métodos han sido

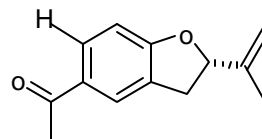
aplicados durante los últimos 15 años, y parecen ser adecuados en el proceso de estandarización y control de calidad de compuestos bioactivos presentes en productos botánicos heterogéneos.

McLaughlin *et al.*³⁵ opinan que la falencia en los estudios de muchos fitoquímicos ha sido el orientar sus objetivos simplemente a aislar, caracterizar y publicar una plétora de nuevas sustancias químicas derivadas de las plantas sin ninguna referencia a su valor bioactivo. Para que los trabajos en la química de los productos naturales alcancen un sentido y una

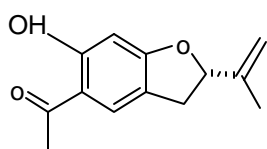
Figura 1. Fórmulas estructurales de los compuestos aislados de *Baccharis latifolia*



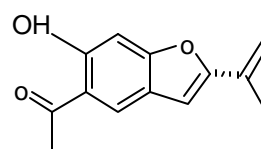
a) Eudesmano



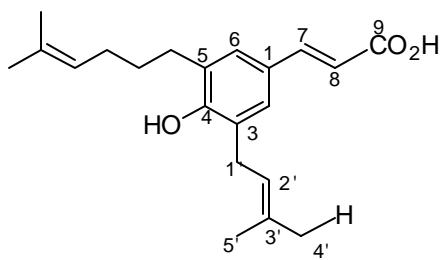
b) Compuesto 21



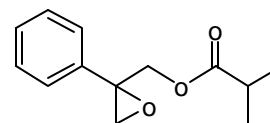
c) Compuesto 22



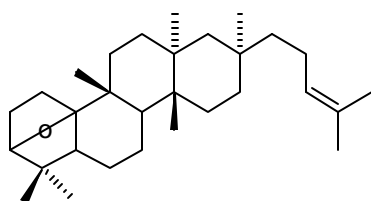
d) Compuesto 23



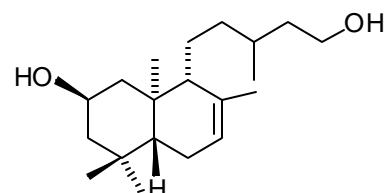
e) Compuesto 25



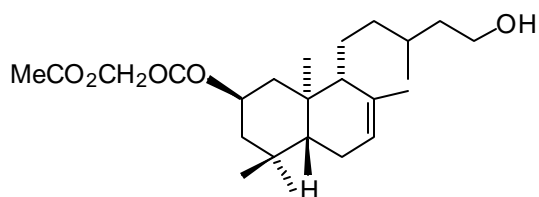
f) Compuesto 29



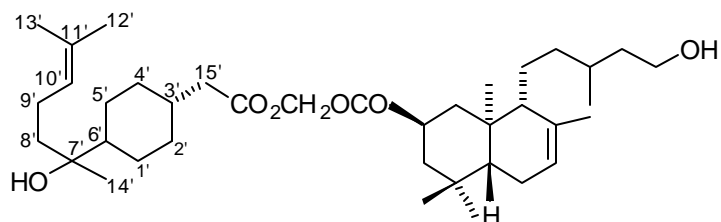
g) Compuesto 35



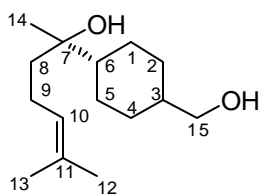
h) Compuesto 36



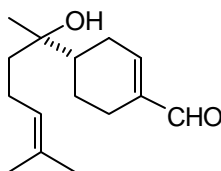
i) Compuesto 37



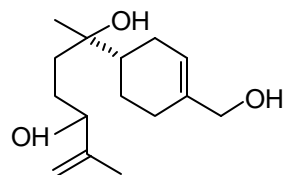
j) Compuesto 38



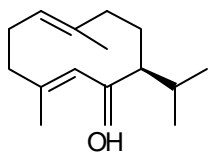
k) Compuesto 39



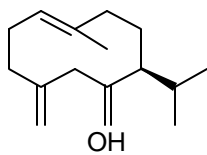
l) Compuesto 40



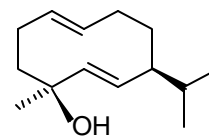
m) Compuesto 41



n) Compuesto 42



o) Compuesto 43



p) Compuesto 44

Fuentes. a) Correa y Bernal, 1990; b), c), d), f), g), Bohlman, 1981; e),h), i), j), k), l), m), n), o), p), Zdero, *et al.*, 1989.

Significancia práctica en la actualidad, necesitan la inclusión de bioensayos. El camino a seguir sugerido por Carbonell³⁶, McLaughlin *et al.*³⁷, y Fransworth y Loub³⁸, sería: tomar los extractos crudos y evaluar su actividad biológica, seleccionar los extractos activos, fraccionarlos guiándose por bioensayos, y por último identificar y explotar los compuestos activos.

Este es el futuro que prevee McLaughlin *et al.*³⁹ para la química de productos naturales, cuyo trabajo debe ser desarrollado con todos los productos botánicos bioactivos útiles, de tal manera que puedan ser aceptados e incorporados a largo plazo en las prácticas de salud legítimas.

Por lo anterior se considera conveniente combinar por lo menos las tres tecnologías disponibles actualmente:

- Técnicas de separación (Cromatografía)
- Métodos de elucidación estructural (Espectrometría y cristalografía de rayos X)
- Ensayos de actividad biológica simples.

La Organización Mundial de la Salud (WHO World Health Organization)⁴⁰ requiere que el uso en salud pública de productos botánicos heterogéneos se lleve a cabo solamente cuando sus componentes bioactivos hayan sido identificados y el producto final haya sido estandarizado.

Para lograr esto la WHO⁴¹ recomienda la adopción de un enfoque comprensivo sobre el empleo farmacéutico de plantas, teniendo en cuenta las siguientes acciones:

- ✓ Realizar un inventario y clasificación terapéutica, actualizadas periódicamente, como de plantas usadas en los diferentes países.
- ✓ Aplicación de criterios y métodos científicos y métodos para asegurar la calidad de las preparaciones con plantas medicinales y su eficacia en el tratamiento de condiciones específicas y enfermedades.
- ✓ Elaboración de estándares internacionales y especificaciones de identidad, pureza, potencia y buenas prácticas de manufactura.
- ✓ Aplicación de métodos para el uso seguro y efectivo de productos fitoterapéuticos por diferentes profesionales de la salud.
- ✓ Diseminación de la información entre los países miembros de la Organización Mundial de Salud.

- ✓ Designación de centros de investigación y capacitación para el estudio de plantas con valor farmacéutico.

1.3 BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BST): UN RAPIDO ENSAYO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA GENERAL PARA COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los compuestos bioactivos son casi siempre tóxicos en altas dosis. La farmacología es simplemente toxicología a una dosis más baja, y toxicología es simplemente farmacología a una dosis más alta. En consecuencia la letalidad *in vivo* en un organismo animal puede ser usado como un indicador adecuado en la evaluación y fraccionamiento durante el proceso de descubrimiento y monitoreo de la calidad de los productos naturales con actividad biológica. Los huevos de *Artemia salina*, se pueden obtener fácilmente en una tienda de mascotas a un bajo costo, y permanecen viables durante años en estado seco. Después de ser colocados en agua marina, los huevos eclosionan antes de las 48 horas, suministrando una gran cantidad de larvas (nauplio) para uso experimental. En el anexo B se encuentran las fotografías de algunos de los estados de desarrollo de *Artemia salina*.

El bioensayo de actividad general BST sobre nauplios de *Artemia salina* ha sido ampliamente usado para el “screening” de extractos botánicos en los trabajos de Villacrés *et al.*⁴², Sanabria *et al.*⁴³, Salama *et al.*⁴⁴, Murillo *et al.*⁴⁵, Stanback⁴⁶, McLaughlin *et al.*⁴⁷, Almeida *et al.*⁴⁸, y Sökmen⁴⁹. También se ha utilizado paralelamente y como una opción de comparación con otras pruebas tales como: actividad antitumoral, ictiotest, actividad antibacteriana, actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria, citotoxicidad, actividad antifúngica, actividad antiviral y fototoxicidad; gran parte de esta información se encuentra en los trabajos de Moreno, *et al.*⁵⁰, Ratnayake, *et al.*⁵¹, Villacrés *et al.*⁵², Salama *et al.*⁵³, Sanabria, *et al.*⁵⁴, McLaughlin⁵⁵, Rodríguez⁵⁶, Almeida, *et al.*⁵⁷, Ojala⁵⁸, Sökmen⁵⁹, Stanback⁶⁰, Popova, *et al.*⁶¹, y Svoboda y Svoboda⁶², pero el método usualmente empleado en la evaluación de productos naturales, fracciones, o compuestos puros es evaluar concentraciones iniciales de 10, 100 y 1000 ppm en viales que contienen 5 ml de solución marina y 10 camarones en cada una de las tres replicas. Los sobrevivientes son contados después de 24 horas. Estos datos son procesados en diferentes programas para llevar a cabo el análisis probit y estimar la CL₅₀ (Concentración letal media), que es aquella dosis de compuesto que produce la muerte del 50% de los animales. Loomis⁶³ define la CL₅₀ como un valor virtual obtenido estadísticamente y por lo tanto siempre va acompañado de algunos tipos de estimación del error del valor calculado tal como su intervalo de probabilidad, cuyos límites se escogen arbitrariamente para indicar que se obtendrían resultados similares en un 90 o 95% de los ensayos llevados a cabo de forma idéntica. Carballo *et al.*⁶⁴, señala que en algunas ocasiones suele evaluarse la mortalidad de los nauplios a las 12 horas (principalmente en instar I/II), 24 horas (en instar II/III), y 48 horas (principalmente en el instar III y IV) de exposición después de la germinación.

Las larvas de *Artemia salina* han sido utilizadas durante los últimos 30 años en estudios toxicológicos. Muchos investigadores usan actualmente *Artemia salina* en la preselección de extractos de plantas, dado que son una alternativa rápida, económica y adecuada en

comparación con la evaluación en animales superiores, que además son altamente susceptibles a las variaciones ambientales. Se conoce por las investigaciones de McLaughlin, *et al.*⁶⁵, y Stanback⁶⁶, que existe una correlación positiva entre el BST y la citotoxicidad 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano); y según Almeida Alves *et al.*⁶⁷, entre el BST y A-549 (carcinoma del pulmón humano), HT-29 (carcinoma humano del colon); y la actividad anti-*Tripanosoma cruzi*.

La letalidad in vivo de un organismo animal (como en el ensayo BST), no es más que el cálculo de un efecto tóxico cuántico. Salter⁷⁴, Bonnier y Tedin⁷⁵, Goldstein y Aronow⁷⁶, Glanzpigel y Rosenkranz⁷⁷, Loomis⁷⁸ y Saha⁷⁹ explican los efectos cuánticos, a diferencia de los efectos cuantitativos o graduales, como respuestas de “todo o nada”. Donde cada individuo se clasifica como reaccionante o no reaccionante, de acuerdo con el tipo de criterio, que se adopte como respuesta. En un ensayo de toxicidad letal, cada animal se clasifica como muerto o vivo a un tiempo especificado después de la administración del compuesto activo. Para cualquier agente tóxico habrá una dosis baja en la que no mate a ningún animal, una dosis alta en la que es uniformemente letal y una dosis intermedia en la que mueren diferentes fracciones de la población. Por lo general la respuesta de los organismos a diferentes dosis del compuesto activo, se distribuyen normalmente (distribución gaussiana) respecto al logaritmo de la dosis; esta curva cuántica se denomina log-dosis respuesta (LDR).

Para efectos prácticos Salter⁸⁰, Bonnier y Tedin⁸¹, Goldstein y Aronow⁸², Glanzpigel y Rosenkranz⁸³, Loomis⁸⁴ han resuelto que no es conveniente determinar la sensibilidad individual, sino el número acumulativo de animales que responden a concentraciones crecientes del compuesto bioactivo. En consecuencia la distribución normal empleada no es la de frecuencias (forma de campana) sino que es la forma acumulativa o integral (forma sigmoidea). Así los porcentajes de respuesta, mortalidad en este caso, son correspondientes a un valor de desviación estándar. A una desviación estándar por debajo de la CL_{50} , muere el 16% de los organismos; en el centro de la curva está la CL_{50} , y se le asigna una desviación estándar de 0; a una desviación estándar por encima de la CL_{50} muere el 84% de los organismos. Esta relación permite transformar las curvas LDR cuánticas en líneas completamente rectas, facilitando el análisis estadístico. Finalmente en el eje “x” se registran las concentraciones del compuesto activo en escala logarítmica, y en el eje “y” el porcentaje de mortalidad expresado en desviaciones equivalentes normales (DEN). Las DEN poseen valores negativos, complicando los cálculos estadísticos, así que a cada DEN se le suma un valor de 5. Estas nuevas unidades se llaman probits (probability units). A partir de una curva log-dosis probit-respuesta se efectúan los análisis estadísticos y los estimados de la CL_{50} . Esta curva se dice que está en escala transformada, estando la curva dosis-porcentaje de mortalidad en la escala original.

1.4 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA, SPE (SOLID PHASE EXTRACTION)

La extracción en fase sólida utiliza la misma interacción analito-sorbente que son explotados en la poderosa técnica de separación de cromatografía líquida de alta resolución, HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Los cartuchos son

preempacados con una variedad de sorbentes de superficie modificada de sílica ligada, la cual retiene específicamente clases de compuestos químicos provenientes de una matriz dada. Una interacción mas específica entre el sorbente y el analito, permite un extracto final mas limpio.

SUPELCO⁸⁵, VARIAN⁸⁶ y, Zief and Kiser⁸⁷, presentan los cuatro pasos básicos para el desarrollo de la técnica de SPE como se muestra a continuación:

1.4.1 Acondicionamiento. Preparación del cartucho para generar una interacción reproducible con la matriz de la muestra por solvatación del lecho del sorbente. Esto se hace al pasar un volumen de un solvente apropiado a través del cartucho, seguido por un volumen de un líquido similar a la naturaleza de la matriz de la muestra. Un ejemplo común de acondicionamiento del cartucho seria pasar metanol, seguido por agua a través de un cartucho C₁₈, antes de la extracción a partir de la matriz acuosa de la muestra.

1.4.2 Retención. La aplicación de la muestra al cartucho acondicionado resulta en que el analito, y quizás que otros componentes de la matriz, sea retenido en la superficie del sorbente debido a una o mas interacciones químicas específicas (Ej., interacciones Van der Waals o “no polares” entre la cadena del hidrocarburo de un analito y la cadena de hidrocarburo de una fase ligada C₁₈). Debe tenerse en cuenta que los contaminantes de la matriz pueden pasar a través del cartucho sin ser retenidos, limpiando así la muestra aún en la etapa de retención o carga.

1.4.3 Lavado. Paso de un solvente apropiado a través de un cartucho, lavando compuestos adicionales que puedan interferir, mientras deja el analito intacto dentro del lecho del sorbente. Un solvente común de lavado para una extracción no polar, sobre un sorbente C₁₈ seria el agua.

1.4.4 Elusión. Paso de un solvente apropiado a través de un cartucho, el cual es específicamente escogido para destruir la interacción analito-sorbente, resultado en la elusión selectiva del analito. Para usar de nuevo un ejemplo de extracción no polar, un solvente orgánico como el metanol seria un solvente suficientemente fuerte para destruir la interacción entre los analitos no polares y una fase ligada C₁₈.

2. MÉTODOLOGIA

2.1 IDENTIFICACION DEL MATERIAL VEGETAL

Las plantas pertenecientes a la especie *Baccharis latifolia* se identificaron por comparación de especímenes completos con los existentes en el Herbario PSO de la Universidad de Nariño y con las descripciones publicadas sobre la especie por parte de Cuatrecasas⁸⁸, Correa y Bernal⁸⁹, Giuliano⁹⁰. Con el fin de corroborar la clasificación taxonómica se enviaron cuatro especímenes completos al Herbario CAUP del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca.

Para la diferenciación de *Baccharis latifolia* hembra y macho se observaron las flores bajo el estereoscopio en el laboratorio y directamente en campo, además se tomaron microfotografías en el Laboratorio de microscopía de Acuicultura de la Universidad de Nariño. Estas observaciones se compararon con las descripciones publicadas por Cuatrecasas⁹¹.

2.2 PREPARACION DE EXTRACTOS ORGANICOS PARA EL ENSAYO BST

El material vegetal correspondiente a hojas maduras, cogollos y flores de *B. latifolia* hembra y macho se recolectaron en inmediaciones del municipio de Pasto, en los corregimientos de Catambuco, La Laguna y Jamondino; así como también en las Instalaciones de la Corporación Autónoma Regional para el Desarrollo de Nariño (CORPONARIÑO – Finca Lope de Vega) y en los alrededores de la Universidad de Nariño.

Las condiciones ambientales de los sitios de recolección se listan en el anexo C; los datos suministrados por el IDEAM corresponden a la estación más cercana a los lugares mencionados.

La recolección del material vegetal en diferentes lugares de la ciudad de Pasto, alejadas considerablemente unas de otras respondió a la necesidad de identificar una zona con una población de *Baccharis latifolia* abundante y relativamente libre de enfermedades. En CORPONARIÑO y Catambuco se cumplían mejor estas condiciones, y por lo tanto, de cada uno de estos lugares se escogieron 12 plantas y de los sitios restantes 5 plantas. Las ramas que se tomaron estaban exentas de polvo, insectos e infecciones aparentes tales como manchas y ataques por minadores.

El material se recolectó en bolsas plásticas de color negro e inmediatamente se llevó al Laboratorio de Aguas de CORPONARIÑO. Allí se separaron las flores, las hojas maduras y los cogollos.

Las muestras con flores de *B. latifolia* hembra y macho se destinaron para la identificación, mientras que solo hojas maduras y cogollos de *B. latifolia* hembra se sometieron a secado en un horno, a una temperatura de 40 °C; para ello se depositaron aproximadamente 30 g del material en bolsas de papel durante 48 horas, tiempo después del cual se registró peso constante. Villacrés *et al.*⁹², aconseja el secado previo del material vegetal a 40°C, de tal manera que el material vegetal se recolecte una sola vez y se facilite su conservación y utilización durante toda la investigación.

Se estudiaron únicamente los ejemplares femeninos puesto que en un estudio de Jarvis *et al.*⁹³ se encontró que las plantas hembra de una de las especies de este género (*Baccharis coridifolia*), eran más tóxicas que las masculinas.

Por otra parte algunas flores frescas de *Baccharis latifolia* hembra y macho se observaron bajo el estereoscopio, y se compararon con los reportes hechos por Cuatrecasas⁹⁴ (Anexo D).

Hay que aclarar que solamente la fase de secado del material vegetal y de la observación de las flores bajo el estereoscopio se llevó a cabo en el Laboratorio de Aguas de CORPONARIÑO, la parte restante de la Investigación se desarrolló en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Nariño.

Siguiendo el procedimiento de Stanback⁹⁵, se tomaron por separado, 10g de hojas maduras y de cogollos secos, se sometieron a maceración (en recipientes de vidrio con tapa metálica) con 50 ml de solvente, durante 120 horas a temperatura ambiente y en la oscuridad. Los solventes utilizados fueron: hexano (Hex), diclorometano (DCM), y metanol (MeOH); sus propiedades de polaridad se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Polaridad de los solventes orgánicos empleados

SOLVENTE	POLARIDAD	CARÁCTER DIPOLAR δ
Hexano	Nula	0,0
Diclorometano	Media	0,73
Metanol	Alta	0,28

Fuente. Meyer, 1999

Con cada solvente y con cada material vegetal se realizó un ensayo independiente. Finalizado este tiempo los extractos fueron trasvasados utilizando pipetas Pasteur a recipientes de vidrio transparente de 10 ml, debidamente lavados y pesados. El proceso de lavado de los recipientes se llevó a cabo con las siguientes sustancias, que se indican en el mismo orden de aplicación, como lo establece APHA, AWWA and WPCF⁹⁶: agua jabonosa, mezcla sulfocrómica y ácido clorhídrico comercial y agua. Por último los recipientes se introdujeron directamente en un baño de agua a temperatura de ebullición durante 5 minutos, para garantizar su esterilización.

Los extractos fueron concentrados hasta sequedad con la evaporación del solvente bajo aireación forzada, que consistió en aplicar aire caliente a 40 °C, directamente sobre el recipiente que contenía el extracto disuelto en un solvente, utilizando un secador de cabello. La temperatura del aire que salía del secador se controló constantemente, mediante un termómetro que se colocó al lado de la base del recipiente. Finalmente los extractos secos fueron pesados.

Para la preparación de las diluciones se utilizó TWEEN 80® (Polyoxyethylene(20) sorbitan monooleate) (MallinCKRODT, Paris) como vehículo, en una proporción máxima del 2% peso/volumen. Las concentraciones finales para los bioensayos fueron de 1000, 320, 100, 32 y 10 ppm⁹⁷. Se prepararon también dos tipos de blancos como lo exige APHA, AWWA and WPCF⁹⁸. Los blancos absolutos que solo contenía agua marina 3,5% y los blancos del solvente que contenía Tween 80® 2% en agua marina.

2.3 PREPARACIONES DE EXTRACTOS ACUOSOS PARA EL ENSAYO BST

Es necesario aclarar que todos los procedimientos relacionados con la preparación de los extractos acuosos corresponden a una segunda etapa de esta investigación, que fue necesario llevar a cabo de forma independiente puesto que con los extractos orgánicos probados no se obtuvieron resultados positivos.

Para la toma de las muestras se escogió el Parque Ecológico Chimayoi por tratarse de una zona de fácil acceso desde la ciudad de Pasto, por poseer condiciones atmosféricas similares a las presentadas en los otros sitios de muestreo y además estar protegida por CORPONARIÑO, por lo tanto no existe la influencia de los diferentes compuestos químicos utilizados para la agricultura, los cuales pueden provocar una toxicidad falsa. Además, la escasa intervención del hombre, permite que se genere una cubierta vegetal natural, abundante, estable y con unos suelos ricos en nutrientes, favoreciendo el crecimiento de plantas más saludables y vigorosas, de un color verde intenso y homogéneo, sin la presencia de clorosis. Se verificó además que el ataque por parásitos como hongos, insectos minadores, agallas era menos intenso que en las otras zonas.

Por otra parte, en los sitios muestreados inicialmente se había tomado una gran cantidad de material vegetal, lo cual dificultaba obtener nuevamente muestras en buenas condiciones; sobre todo en lo que se refiere a los cogollos.

Se tomaron exclusivamente los cogollos de las plantas, con una longitud aproximadamente de 10 cm a partir del extremo distal del cogollo. La toma de muestras es limitada debido a que constituye una zona protegida. Las muestras frescas se recolectaron antes de cada prueba, se depositaron en bolsas plásticas negras y se llevaron inmediatamente al laboratorio. Las condiciones ambientales del Parque Ecológico Chimayoi se presentan en la Tabla 2.

Los cogollos frescos se pesaron y se cortaron hasta obtener un peso de 1g, el cual fue depositado junto con 15 ml de agua comercial Cristal® (Postobon), en tubos Pirex (Schott)

con tapa rosca y sellos de TFE (Trifluoroetileno) (Merck, Darmstat, Germany) (Hacch). Una vez sellados los tubos fueron inmersos en un baño María (a temperatura de ebullición) para que se desarrolle el proceso de decocción durante 30 minutos.

Terminado este tiempo, los tubos fueron rápidamente enfriados con agua, abiertos y la solución acuosa vaciada en tubos pirex con tapa rosca y sellos de Teflón (los tubos utilizados aquí se lavaron con un proceso similar al utilizado para los recipientes donde se desarrollaron los bioensayos). Se permitió la decantación de estos extractos durante una noche, posteriormente se trasvasó el sobrenadante a otro tubo y se dejó el precipitado en el recipiente original, donde se había depositado en el fondo como una masa consistente de color blanco. Precipitado y sobrenadante fueron evaluados por el ensayo BST, en concentraciones de 32, 100, 320, 1000, 3200 y 10000 mg/L de peso fresco de material vegetal. Igualmente se prepararon dos tipos de blancos. Los blancos absolutos que solo contenía agua marina 3,5% y los blancos del solvente que contenía DMSO 2% en agua marina (Figura 2).

Tabla 2. Condiciones ambientales del Parque Ecológico Chimayoi

Estación Meteorológica	Chimayoi
Periodo (Años)	2003 – 2004
Latitud	01° 15' 47,7''
Longitud	77° 17' 40''
Altitud	2771 m.s.n.m.
Precipitación promedio	878,3 mm
Evaporación	519,8 mm/ año
Humedad relativa	80%
Temperatura	Máxima: 19,6 °C Media: 12,1 °C Mínima: 5,4 °C

Fuente: IDEAM

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.4.1 Ensayo de actividad biológica general BST.

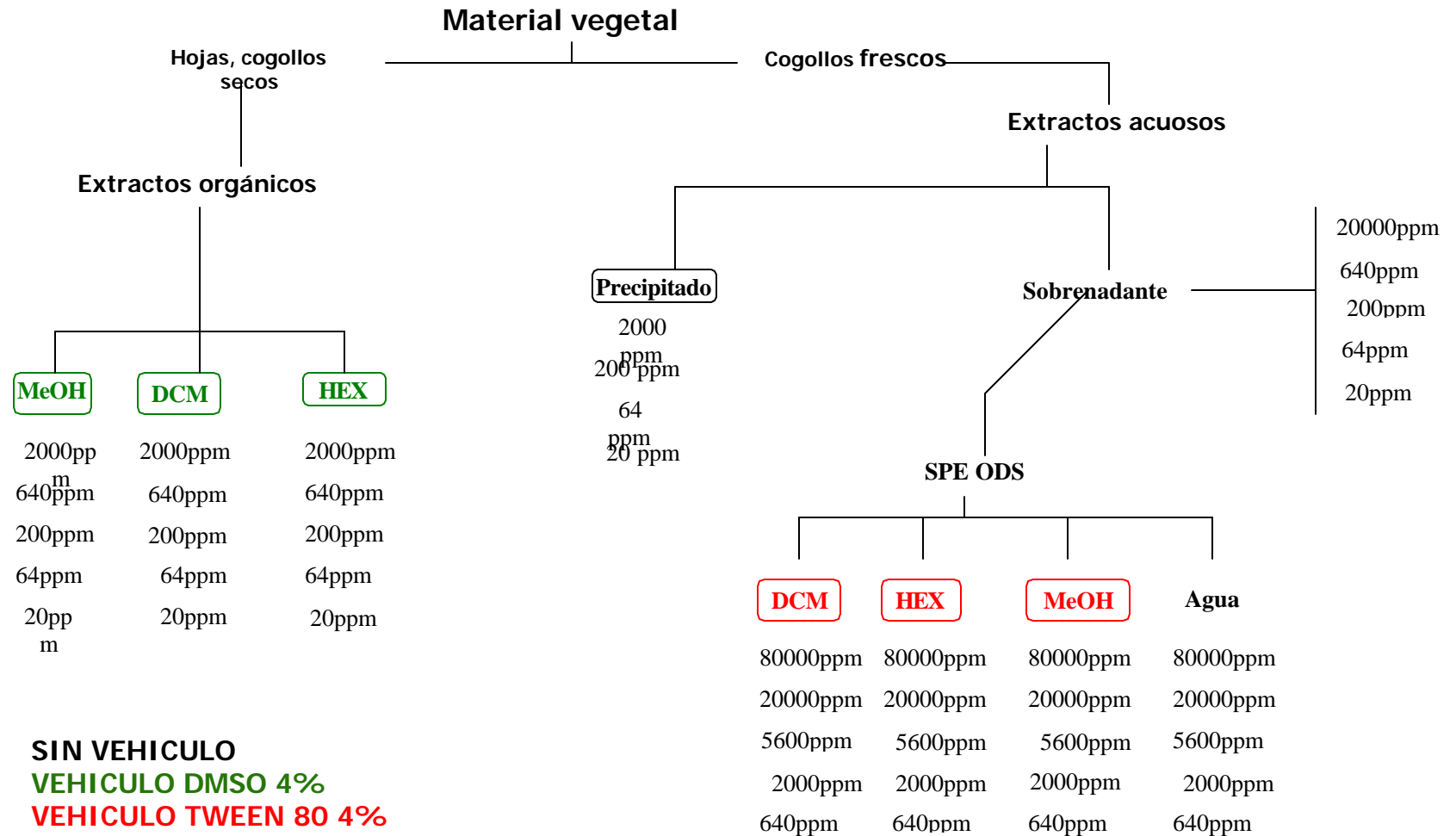
Preparación del agua marina. La solución marina al 3,5% y una densidad aproximada de 1,015 g/ ml, se preparó con sal marina comercial, secada bajo aireación forzada a 70°C; estando fría se pesaron 35 g, los cuales se disolvieron en un volumen de 100 ml de Agua Cristal® (Postobon); con el fin de eliminar las impurezas de la sal como arena y polvo, a través de la filtración sobre papel filtro Wathman® No 4. El filtrado se llevó a un volumen final de 1 litro. La densidad del agua se determinó a través del método del picnómetro.

Incubación y cosecha de larvas de *Artemia salina*. En un recipiente cilíndrico de vidrio (Artemillero) con un volumen de 800 ml se vertieron 700 ml de agua marina al 3.5%, la cual se sometió a aireación durante 15 minutos mediante un aireador. Un tubo de

polivinilcloruro (PVC) con un orificio lateral en el borde inferior a una altura de 1cm, recubierto con papel aluminio, incluyendo su base y sin cubrir el orificio lateral se introdujo en el recipiente de vidrio (Anexo E).

Aproximadamente 2,00 mg de huevos de *Artemia salina* (Red Jungle Brand™, Ocean Star International O.S.I, Snowville, Utah, U.S.A) se agregaron dentro del cilindro de PVC, donde la aireación fue proveída desde el fondo del cilindro a través de una aguja para insulina (1 mL), con el objeto de promover una suave aireación. Inmediatamente la parte superior del cilindro fue cubierto con papel aluminio y se dejó incubar a una temperatura entre 26 y 30°C, durante un intervalo de 24 a 48 horas. La cosecha de nauplios de *Artemia salina* se inició cuando se observaron suficientes de ellos nadando fuera del contenedor interno; para esto se retiró el tubo de PVC, se recogieron los camarones con una pipeta Pasteur y se pasaron a una caja petri en número suficiente para cada prueba; lo cual quiere decir que si se van a probar

Figura 2. Diagrama general para la preparación de las soluciones destinadas al ensayo BST



Cinco concentraciones, cada una de ellas con tres réplicas, entonces se deberían pasar aproximadamente 150 camarones o más a la caja petri. Estos individuos se pasaron sin estimar el estado de desarrollo en que se encontraban.

Determinación de la CL₅₀. Los viales sobre los que se realizaron las pruebas corresponden a recipientes de vidrio transparente de forma y tamaño homogéneos con un volumen de 10 mL.

De los procedimientos extraídos de Villacrés *et al.*⁹⁹, Sanabria *et al.*¹⁰⁰, McLaughlin *et al.*¹⁰¹, Sökmen¹⁰², Stanback¹⁰³ y Carballo *et al.*¹⁰⁴, se formuló el siguiente número de pasos para la preparación de cada vial: 1) se vertió 1 ml de agua marina 3.5% aireada con anterioridad, 2) utilizando una pipeta Pasteur se depositó de uno en uno los camarones hasta completar aproximadamente 10 individuos^{105,106}, 3) se agregó 2,5 mL de la solución del extracto preparado al doble de la concentración final, 4) se llevó a un volumen final de 5 mL con agua marina 3.5%,.

Para cada concentración de extracto, así como para los blancos absolutos y los blancos del solvente se prepararon de 3 a 5 réplicas, dependiendo de la disponibilidad de material de laboratorio, material vegetal y extractos (Figura 3). Todos los viales (blancos y viales con extracto) se llevaron a la cámara de incubación, donde se distribuyeron al azar, de tal manera que cada serie de réplicas de una concentración dada quedara separada y dispersa dentro de esta zona, así como lo establece APHA, AWWA and WPCF¹⁰⁷. Estos recipientes permanecieron en la cámara durante 24 horas, el mismo periodo de tiempo aplicado por Villacrés *et al.*¹⁰⁸, Sanabria *et al.*¹⁰⁹, McLaughlin *et al.*¹¹⁰, Sökmen¹¹¹, Stanback¹¹², Carballo *et al.*¹¹³.

La cámara de incubación consistió de una zona de 1 m² aislada del resto del laboratorio por una lámina de polietileno transparente, con iluminación y ventilación natural. Los viales fueron depositados en un baño termostático a 30°C (Anexo E).

Al término de las 24 horas se contaron con ayuda de un estereoscopio las artemias muertas (ausencia total de movimiento) que se encontraron en el fondo de los viales que contenían diferentes concentraciones del extracto, de los blancos absolutos y de los blancos del solvente. Posteriormente se adicionó 1 mL de etanol comercial 96% para el conteo total de los individuos. Las CL₅₀ fueron reportadas con intervalos de confianza del 95%.

2.4.2 Fraccionamiento de extractos acuosos por extracción en fase sólida – fase reversa

SPE-ODS (Solid Phase Extraction - OctaDecilSilano). El extracto acuoso, preparado de forma semejante como para el ensayo BST, fue fraccionado por extracción en fase sólida. El extracto obtenido a partir de un gramo de cogollo, fue colocado en una columna SPE-ODS Bakerbond® (J.T. Baker, Pittsburgh, Pennsylvania) precondicionada (material de relleno 500 mg; volumen del reservorio 6 mL) y las fracciones eluidas con metanol, diclorometano, hexano e i octano. En la Tabla 3 se ilustra el procedimiento seguido para el fraccionamiento del extracto acuoso por SPE en fase reversa.

Figura 2. Diagrama explicativo del ensayo BST.

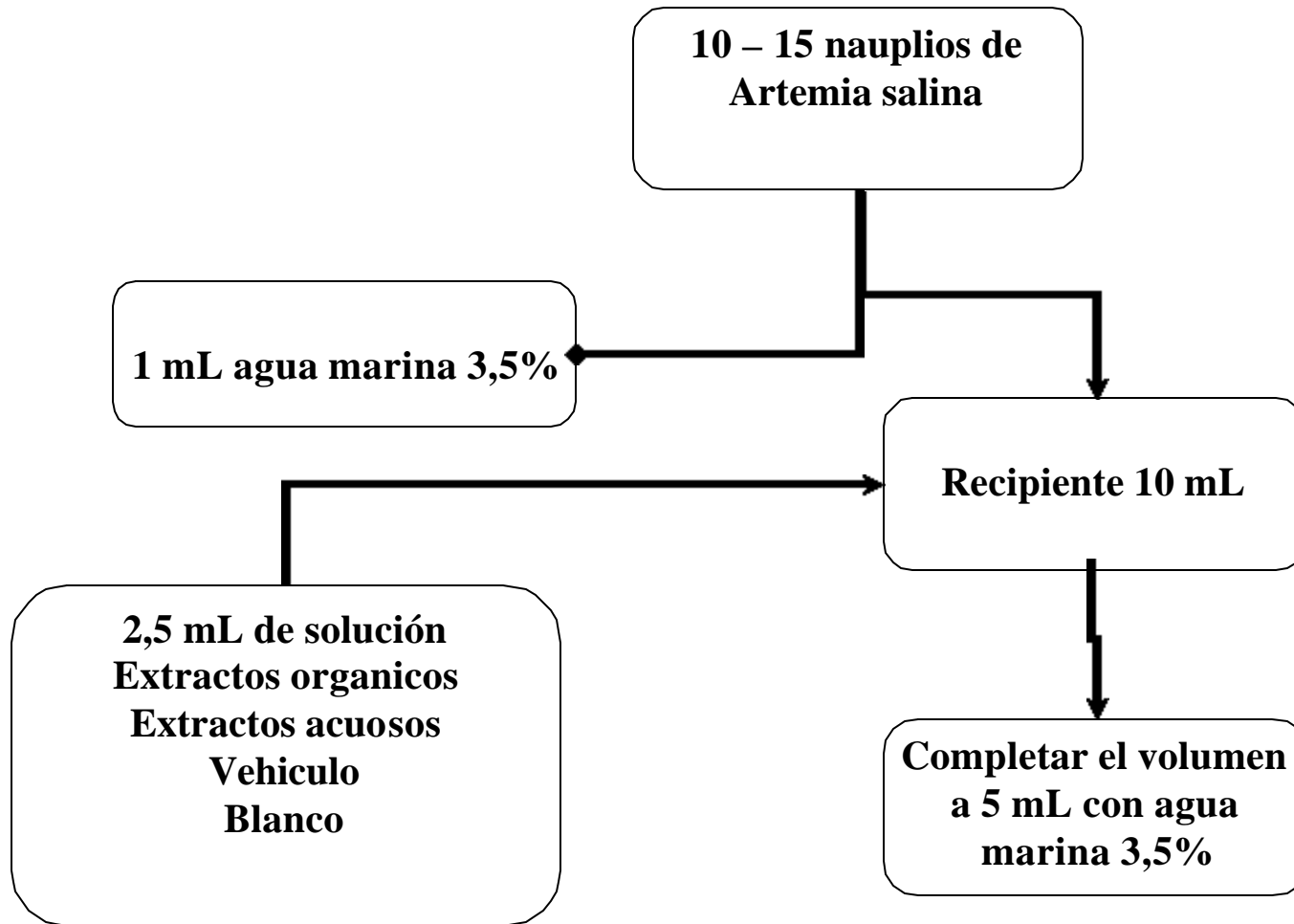


Tabla 3. Pasos a seguir durante el fraccionamiento por SPE-ODS del extracto crudo

PASO	VOLUMEN (ml)	SOLVENTE
	12	Metanol
Acondicionamiento	12	Agua tipo HPLC
	6	Metanol
Adición de la Muestra	15	Extracto acuoso de <i>B. latifolia</i>
Lavado de la columna	20	Agua tipo HPLC
Elusión 1	12	Metanol
Elusión 2	12	Diclorometano
Elusión 3	12	Hexano
Elusión 4	12	i-Octano

La velocidad de flujo fue aproximadamente de 1mL/minuto. Las fracciones se recogieron en recipientes de vidrio transparentes y se secaron bajo aireación forzada a 40°C, hasta sequedad. Las fracciones, incluida el agua resultante de la adición de la muestra y el agua de lavado, fueron evaluadas con el ensayo BST. El agua resultante de la adición de la muestra fue evaluada con el objetivo de detectar sobrecargas en la columna, y elusión no deseada de compuestos. Las concentraciones utilizadas para las diluciones fueron: 32, 100, 320, 1000, 2000, 3200, 10000 y 40000 ppm, empleándose como vehículo Dimetilsulfoxido (DMSO) 2% v/v. Estas concentraciones obedecen a una escala logarítmica, para facilitar la graficación de la curva log dosis- Probit¹¹⁴. Cargas y flujos (uso en general) se determinaron según el manual del fabricante¹¹⁵ y las recomendaciones para el empleo de SPE entregadas por Meyer¹¹⁶, SUPELCO¹¹⁷ y VARIAN¹¹⁸.

2.4.3 Parámetros operacionales del Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas GC-MS (Gas Chromatography - Mass Spectrometry). La fracción metanólica SPE-ODS (1:1) fue directamente analizada por GC-MS en un equipo Shimadzu QP 5000 equipado con una columna DB-5 (30m x 0,25mm i.d.; coating thickness 0,25µm) y un detector de masas tipo cuadrupolo. Condiciones de trabajo: Inyector 250°C; razón split 12:1, temperatura programada del horno a 40°C durante 5 minutos, desde 40°C hasta 200°C a 10°C min⁻¹ y a 200°C durante 10 minutos, tiempo total 31 minutos. Gas portador: Helio 15,7 mL min⁻¹; presión de la columna 45 KPa, flujo de la columna 0,9 mL min⁻¹, velocidad lineal 35,1 cm s⁻¹, ionización: EI 70eV.

2.5 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

2.5.1 Análisis probit e intervalos de confianza. El análisis probit se efectuó a través del programa PROBIT* versión 1987 desarrollado por Raymond¹¹⁹. Además de Raymond¹²⁰, Bonnier y Tedin¹²¹, Throne, *et al.*¹²², Martínez y Osorio¹²³ y Saha¹²⁴ explican que el método Probit aplica los siguientes procedimientos: calcula la mortalidad corregida según la fórmula de Abbott, la mejor línea de regresión ponderada entre la mortalidad y la dosis, el test de bondad de ajuste por χ^2 para la línea obtenida y el cálculo de la CL₅₀ y de sus

* Para mayores detalles sobre el programa Probit revisar el Anexo K.

intervalos de confianza. Los anteriores pasos mencionados son los empleados rutinariamente en el cálculo de concentraciones letales, aunque los métodos empleados en cada uno de los casos pueden diferir.

Martínez y Osorio¹²⁵, y Raymond^{126,127}, dentro del programa Probit, evalúan las siguientes hipótesis para el test de bondad de ajuste por χ^2 a un nivel de confianza del 95%:

Ho: La línea log dosis- probit es un modelo adecuado para los datos

H1: La línea log dosis- probit no es un modelo adecuado para los datos.

2.5.2 Comparación de CL₅₀ e intervalos de confianza. Las CL₅₀ y los intervalos de confianza obtenidos por el programa PROBIT para cada uno de los ensayos fueron comparados a fin de establecer si existían diferencias significativas entre ellos. Existirán diferencias significativas entre las CL₅₀ si no se encuentra solapamiento entre los límites de confianza. Sin embargo, pueden existir diferencias significativas, aunque los límites de confianza se solapen.

En consecuencia adicional a la evaluación del solapamiento en los límites de confianza, se examinó si existían o no diferencias significativas entre las CL₅₀ por aplicación de la siguiente fórmula:

$$f_{1,2} = \text{antilog} ((\log f_1)^2 + (\log f_2)^2)^{1/2}$$

f = Factor de los límites de confianza al 95% de la CL₅₀; esto es, los límites de confianza son $CL_{50} * f$ y CL_{50}/f (f = antilogaritmo de las dos desviaciones estándar del logaritmo de la CL₅₀)¹²⁸.

Si el cociente $CL_{50 \text{ Superior}} / CL_{50 \text{ Inferior}}$ es mayor que el valor $f_{1,2}$, existen diferencias significativas entre las CL₅₀¹²⁹.

La anterior fórmula fue empleada en la escala original de los datos y es correspondiente en su escala transformada (logaritmos de las dosis) al cálculo de la diferencia significativa mínima (DSM) que puede existir entre dos medias (CL₅₀) a un nivel de riesgo determinado.

Considérese la siguiente fórmula:

$$S_{\text{dif}} = ((S_1)^2 + (S_2)^2)^{1/2}$$

donde S_{dif} es la desviación típica de distribución teórica de las diferencias entre dos medias de dos muestras; obtenida a partir de la desviación típica de las muestras (S_1 y S_2). S_{dif} es empleado para calcular la DSM para dos medias de una población normal a un nivel de confianza determinado.

$$DSM = t * S_{\text{dif}}$$

En consecuencia Arkin y Colton¹³⁰, Hays¹³¹ y Sachs¹³² concluyen que existirán diferencias significativas si el valor absoluto de la diferencia entre las medias es mayor al valor establecido para la DSM y por lo tanto podremos afirmar que las dos medias no pertenecen a la misma población.

La CL_{50} y los rangos promedios, según Kuehl¹³³, fueron calculados a partir de los datos transformados, asumiendo intervalos de confianza simétricos como lo estipula Sachs¹³⁴. Las graficas de las curvas LDR (líneas de tendencia) se obtuvieron por regresión lineal en el programa Microsoft Excel a partir de los datos de CL_n suministrados por el programa Probit. Los datos originales representados como puntos dispersos son los probit calculados por el programa Probit para cada mortalidad.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 IDENTIFICACION DEL MATERIAL VEGETAL

Los especímenes enviados al Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca fueron identificados como *Baccharis latifolia* por Bernardo R. Ramirez¹³⁵.

Una vez establecidas las características específicas determinantes de la especie *Baccharis latifolia*, y de las plantas hembra y macho, no existió ningún inconveniente en su reconocimiento en campo. En las microfotografías pueden observarse las marcadas diferencias entre las flores machos y hembras (Figura 4), correspondientes a las descripciones y dibujos de Díaz y Cuatrecasas¹³⁶, y Cuatrecasas¹³⁷ (Anexo D).

3.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA BST DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE *Baccharis latifolia*

Los extractos obtenidos por maceración presentaron las siguientes características: para el hexano un extracto verde claro, traslúcido, poco concentrado; para el DCM un extracto verde, no traslúcido, muy concentrado y para el MEOH un extracto verde parduzco claro, muy concentrado.

La diferencia en los colores de los extractos puede tomarse como evidencia de que se obtuvieron mezclas de compuestos disímiles con cada uno de los solventes. Todos los extractos exhibieron apariencia resinosa y una fuerte coloración verdosa, indicativa de la presencia de clorofilas.

Los extractos orgánicos de *Baccharis latifolia* se disolvieron utilizando como vehículo Tween 80®, uno de los tensioactivos que Dalesio¹³⁸ incluye dentro de la serie de ésteres del sorbitan polioxietilénico. Esta es una de las series más empleadas en farmacología por su alta capacidad solubilizante.

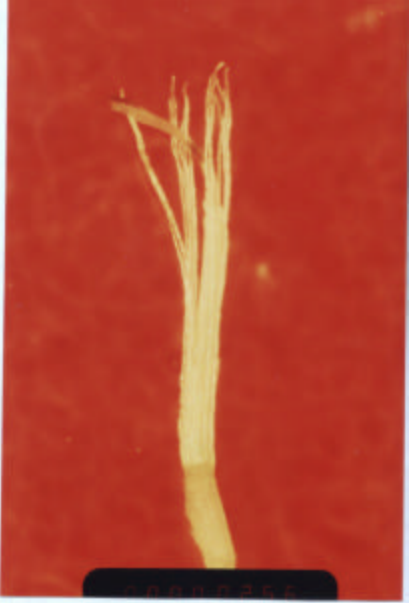
A medida que pasaba el tiempo, las soluciones acuosas de los extractos orgánicos se tornaban cada vez más opacas, con una gran cantidad de materiales suspendidos y precipitados en el fondo de los viales, lo cual dificultaba tomar la lectura de la mortalidad con el estereoscopio. Al mismo tiempo esta característica solo admitió preparar soluciones con una máxima concentración de 1000 ppm.

En concordancia con Brown *et al.*¹³⁹, una solución salina posee una constante dieléctrica alta que provoca una disminución en la solubilidad de los tensioactivos; esto pudo causar la poca eficiencia del vehículo utilizado. Por otra parte la gran cantidad de resina presente en los extractos pudo haber limitado la solubilidad de otras sustancias presentes en el extracto hacia el Tween 80®.

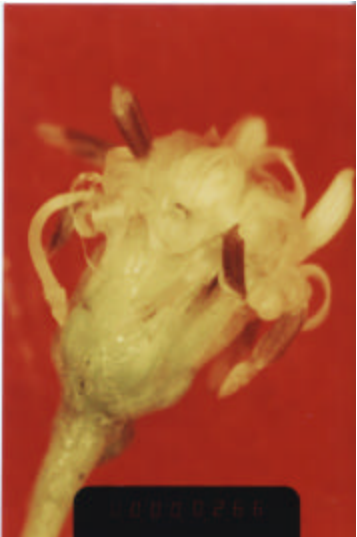
Figura 4. Microfotografías de capítulos y flores machos y hembras de *B. latifolia*



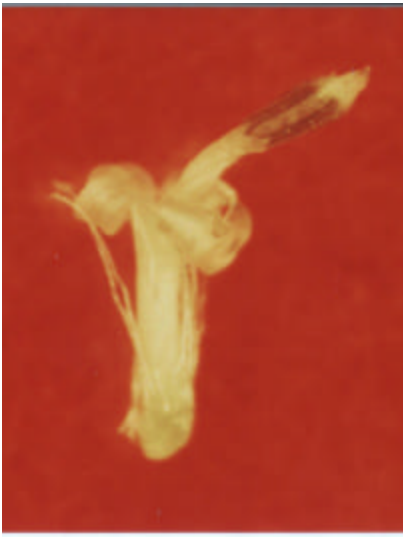
Capítulo Hembra de *Baccharis latifolia*



Flor Hembra de *Baccharis latifolia*



Capítulo Macho de *Baccharis latifolia*



Flor Macho de *Baccharis latifolia*

Fuente. Esta investigación.

Ninguno de los extractos orgánicos exhibió actividad biológica en el ensayo BST, aún después de haber sido evaluadas plantas de diferentes localidades. Las dificultades antes mencionadas pudieron ser la causa de que no se haya detectado actividad biológica BST.

Vale la pena mencionar que la ventaja que tiene el método de maceración con solventes orgánicos en contraste con las decocciones acuosas está en que se puede determinar directamente el peso del extracto seco, conociendo efectivamente la concentración de las soluciones. Sin embargo el mayor número de pasos a seguir extiende el tiempo de preparación de los extractos e incrementa el número de fuentes de error; además se extraen las clorofilas, imponiendo la necesidad de eliminarlas por métodos como la absorción por medio de carbón activado, reactivo que no es lo suficientemente selectivo pudiendo atrapar otras sustancias de interés.

3.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA BST DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Baccharis latifolia*

Debido a que no se obtuvo mortalidad en el ensayo BST para los extractos orgánicos se decidió explorar la información etnobotánica relacionada con los usos medicinales de *B. latifolia*; para esto se desarrolló un corto y rápido sondeo a un pequeño grupo de campesinos donde se les preguntó acerca de los usos dados a *Baccharis latifolia**. Con el sondeo se concluyó ellos preparan un “agua de remedio” que se resulta al hervir de uno a dos cogollos de “chilca” en una taza de agua, durante 30 minutos.

Relacionando esta información con la preparación de un tónico amargo a una dosis del 5% de la parte aérea de la planta reportado por García y Barriga¹⁴⁰ y con las decocciones referidas por Correa y Bernal¹⁴¹, se decidió preparar el extracto por decocción, durante 30 minutos, a temperatura de ebullición y utilizando: 1g de cogollos/ 15 ml de agua; esto proporciona una concentración aproximada de 6,6% peso fresco cogollos/ ml solución. Esta forma de preparación reúne muchas de las características utilizadas en la medicina popular ya mencionadas.

Así mismo es importante considerar que en esta investigación la concentración aproximada del extracto fue de 6,6 % (peso fresco cogollos/ ml solución), mientras que en la medicina popular de la región donde se aplicó el sondeo se utiliza una concentración mucho menor (de 1 a 2 gramos de cogollo / 250 ml de agua) con efectos positivos sobre la salud. Teniendo en cuenta esto, era de esperarse que el método de decocción como se encuentra planteado aquí fuera el más efectivo para obtener extractos con una actividad biológica general positiva sobre *Artemia salina*.

* El sondeo se llevo a cabo entre 34 campesinos del municipio de Guachucal y de 20 campesinos de las áreas rurales aledañas a Pasto, todos mayores de 40 años. La recolección de la información se llevo a cabo por entrevista personal después de presentarles ejemplares frescos de *Baccharis latifolia* hembras con flores, sin mención alguna de su nombre común, ni de su uso. Este sondeo es exploratorio y en consecuencia no es definitivo y carece de valor estadístico.

Como un punto adicional es importante anotar que para la preparación del agua marina artificial, de los extractos acuosos, de las soluciones de los extractos orgánicos y de las fracciones SPE ODS, y para el desarrollo de todos los bioensayos BST se utilizó agua comercial Cristal® (Postobon)¹⁴², ya que para la elaboración de este producto intervienen equipos de filtración y purificación a través de rayos UV. Además todos los procesos están regidos por las Normas ISO 9000 y el producto cuenta con el sello de conformidad ICONTEC.

Para la realización de bioensayos Olivero¹⁴³ y APHA, AWWA and WPCF¹⁴⁴ recomiendan la utilización de agua destilada; sin embargo también existe la posibilidad de utilizar agua marina natural, no contaminada y que presente una baja turbidez, cuando es posible conseguirla con facilidad; y en el caso de requerir volúmenes grandes de agua marina se puede acudir a las sales marinas comerciales como lo permite APHA, AWWA and WPCF¹⁴⁵. En el caso específico de este trabajo se recurrió a la disolución de la sal marina con agua comercial Cristal®. Por otra parte durante el desarrollo de los bioensayos se observó que en los blancos absolutos no se presentaron muertes mayores al 10% de los organismos sometidos a las pruebas con lo cual se eliminó la posibilidad de tener que descartar los resultados de un ensayo, en conformidad con APHA, AWWA and WPCF¹⁴⁶. Nos damos cuenta entonces que en esta investigación los blancos absolutos cumplían con un doble propósito; servir de testigos para la comprobación de la toxicidad de los extractos y demostrar que el agua de dilución utilizada y la sal marina comercial no presentaban compuestos tóxicos para los organismos (*Artemia salina*).

Observando los resultados obtenidos se puede señalar que el método de la decocción presenta las siguientes ventajas comparativas con respecto al método de maceración aplicado en esta investigación:

- Constituye un método corto, fácil, económico y de aplicación inmediata en la medicina popular.
- No es necesario controlar la temperatura, puesto que se desarrolla a la temperatura de ebullición del agua.
- La alta temperatura que se aplica puede favorecer la ruptura de las membranas celulares, optimizando el proceso de extracción.
- La alta temperatura también puede promover la formación y/o transformación de algunos compuestos.
- Se extraen de forma mínima las clorofilas, la solución tiene una apariencia más transparente y después de un tiempo de reposo se pudieron separar los compuestos menos solubles.

- No se extrajo la sustancia pegajosa de los cogollos, denominada aquí como resina. Esta se queda adherida al material vegetal, el cual conserva su color verde y su naturaleza pegajosa y levemente amarga al finalizar la decocción.
- Se pudieron preparar soluciones a mayores concentraciones que en el caso de los extractos orgánicos, sin que se presentara un exceso de sólidos en suspensión, que impidiera la lectura de la mortalidad.
- Por el carácter polar del agua se puede decir que la mayoría de compuestos extraídos también son polares.

Algunas de las ventajas presentadas anteriormente pueden ser tomadas también como desventajas puesto que las altas temperaturas empleadas pueden malograr algunos compuestos que en su estado natural pueden ser muy efectivos; una situación similar se puede estar presentando con solventes menos polares. Igualmente la resina que en este método resulta insoluble podría ser extraída y fraccionada mediante otros procedimientos, pudiéndose obtener resultados más favorables.

Al utilizar cogollos se está trabajando con tejidos vegetales jóvenes, los cuales están constituidos por células con paredes mínimamente lignificadas y al mismo tiempo cuentan con una capa de compuestos pécticos. Lo primero aporta una superficie suave y unas células con mayor volumen citoplasmático, mientras que lo segundo permite el tránsito más fácil del agua al interior de la célula como lo citan Greulach y Adams¹⁴⁷, dada la afinidad de estos compuestos con ella.

Adicionalmente Greulach y Adams¹⁴⁸ anotan que estos tejidos jóvenes son los más susceptibles al ataque de parásitos, es por eso que las plantas los protegen a través de variados mecanismos. En el caso de *B. latifolia* los cogollos se hallan recubiertos por una sustancia pegajosa de sabor amargo, inmisible con el agua.

El extracto acuoso de *B. latifolia* exhibió actividad biológica, al contrario de los extractos orgánicos previamente evaluados. Dalesio, *et al.*¹⁴⁹ y Olivero¹⁵⁰, opinan que los compuestos solubles en agua por naturaleza, son muchos más estables en solución acuosa que uno que no lo es, favoreciendo su transferencia al interior de un organismo. Estas soluciones acuosas favorecen la mejor y más rápida absorción de compuestos bioactivos. Este es el vehículo más empleado en formulación farmacéutica, dada su alta capacidad disolvente (pequeño tamaño molecular, polaridad, alta constante dieléctrica, capacidad de formar puentes de hidrogeno), y la perfecta tolerancia por parte del organismo. El agua es capaz de disolver sales minerales, ácidos orgánicos e inorgánicos, sales de ácidos orgánicos, azúcares, gomas, proteínas, taninos, sales de alcaloides, entre otros. No disuelve en cambio resinas, esencias y lípidos.

El extracto acuoso de *Baccharis latifolia* exhibió una CL₅₀ promedio de 1562,79 mg peso fresco/L (884,75 < CL₅₀ < 2760,45). Si consideramos un porcentaje aproximado de humedad del 65% (Anexo F) la CL₅₀ aproximada en peso seco es de 546,98 mg/L. En

extractos crudos de plantas Sanabria Galindo¹⁵¹ ha establecido como criterios de comparación entre dosis (en mg/L de extracto) y mortalidad de *Artemia salina* los siguientes valores: Letalidad elevada, entre 0,1 y 100 ppm; Letalidad moderada, entre 100 y 300 ppm; Letalidad baja, entre 300 y 640 ppm; Letalidad mínima, a una dosis mayor de 640 ppm y totalmente inactivos valores mayores a 1000 ppm. Además, Rodríguez¹⁵², Almeida¹⁵³, Carballo¹⁵⁴ y Salama¹⁵⁵ coinciden en que los extractos tienen una alta actividad cuando presentan una CL₅₀ menor de 100 ppm y son inactivos con una CL₅₀ mayor a 1000 ppm. En consideración a la CL₅₀ calculada en peso seco, este extracto sería considerado como de letalidad baja. Sin embargo si se tiene en cuenta que los compuestos activos, solubles en agua, sólo son una fracción del total del peso seco, este extracto podría considerarse posee una letalidad mayor a la antes considerada.

Aunque lo recomendable es obtener el peso seco del extracto, tal determinación no se llevo a cabo dadas las condiciones requeridas para la eliminación del agua (rotavaporación), además de ser innecesario puesto que el ensayo de actividad biológica BST se desarrolla en el mencionado solvente.

En la figura 5 son comparadas las CL₅₀ para distintas muestras del extracto acuoso de *B. latifolia*. Obsérvese que las pendientes de la curva 1 y 2 son semejantes entre si y que la pendiente de la curva 3 exhibe un valor mas alto que las otras pendientes (Figura 5) (Anexo G). Las pendientes en las graficas corresponden al inverso de las desviaciones estándar y en consecuencia son una medida del grado de homogeneidad de la respuesta de los organismos frente al extracto. En el análisis de Bonier y Tedin¹⁵⁶, Salter¹⁵⁷, Goldstein *et al.*¹⁵⁸, Glanszpigel y Rosenkranz¹⁵⁹ y Loomis¹⁶⁰, las pendientes más pronunciadas equivalen a un tipo de respuesta más homogénea por parte de los organismos, menor desviación típica y en consecuencia rangos de CL₅₀ más estrechos.

Se observa que el valor de CL₅₀ mas bajo corresponde a la curva de mayor pendiente (curva 3, Figura 5). Este valor esta fuera del rango de valor de la CL₅₀ de la curva 1, pero se encuentra dentro del rango de CL₅₀ de la curva 2. La pendiente de la curva 3 posee un valor doble respecto al valor de las curvas 1 y 2, y en consecuencia la desviación típica y el rango de la CL₅₀ de la curva 3 son la mitad de los valores de desviación típica y rangos de la curva 1 y 2 (escala transformada). En cualquier caso los rangos de la CL₅₀ se solapan entre si (Figura 6), indicativo de que no existen diferencias significativas entre los valores de las CL₅₀.

Con base en el “Teorema de Limite Central” expuesto por Kuehl¹⁶¹, se esperarían rangos mas estrechos para un numero mayor de datos, sin embargo, el rango mas estrecho corresponde a la prueba con el menor numero de datos disponibles (Anexo G). Este hecho es explicable si se considera que el ensayo 3 contiene un número mayor de datos en cercanía al valor medio de la curva normal, contribuyendo a disminuir la desviación, y más aun si se considera el mayor peso ponderado dado a los datos cercanos al valor CL₅₀.

Sin embargo, tales variaciones en la CL₅₀ y en los rangos podrían no tener origen en el ensayo, sino en la variación en las proporciones relativas de cada uno de los compuestos

bioactivos presentes en el extracto. Considérese que el extracto proveniente de una planta es una mezcla heterogénea de compuestos y algunos de ellos resultan ser activos. Se ha demostrado que aun por encima de tal variación la actividad biológica del extracto permanece dentro de límites tolerables como lo manifiesta McLaughlin *et al.*¹⁶²; en este trabajo los rangos de la CL_{50} del extracto evaluado se solapan entre sí, aunque las pendientes sean distintas (Figura 6), reflejando posiblemente mecanismos de acción diferentes por parte de los compuestos bioactivos cada muestra como lo proponen Bonier y Tedin¹⁶³, Salter¹⁶⁴, Goldstein *et al.*¹⁶⁵, Glanszpigel y Rosenkranz¹⁶⁶, Loomis¹⁶⁷.

Figura 5. Comparación entre las curvas LDR para cada ensayo con los extracto acuoso de *B. latifolia* hembra y presentación de los datos experimentales como puntos dispersos (Log dosis vs. probit).

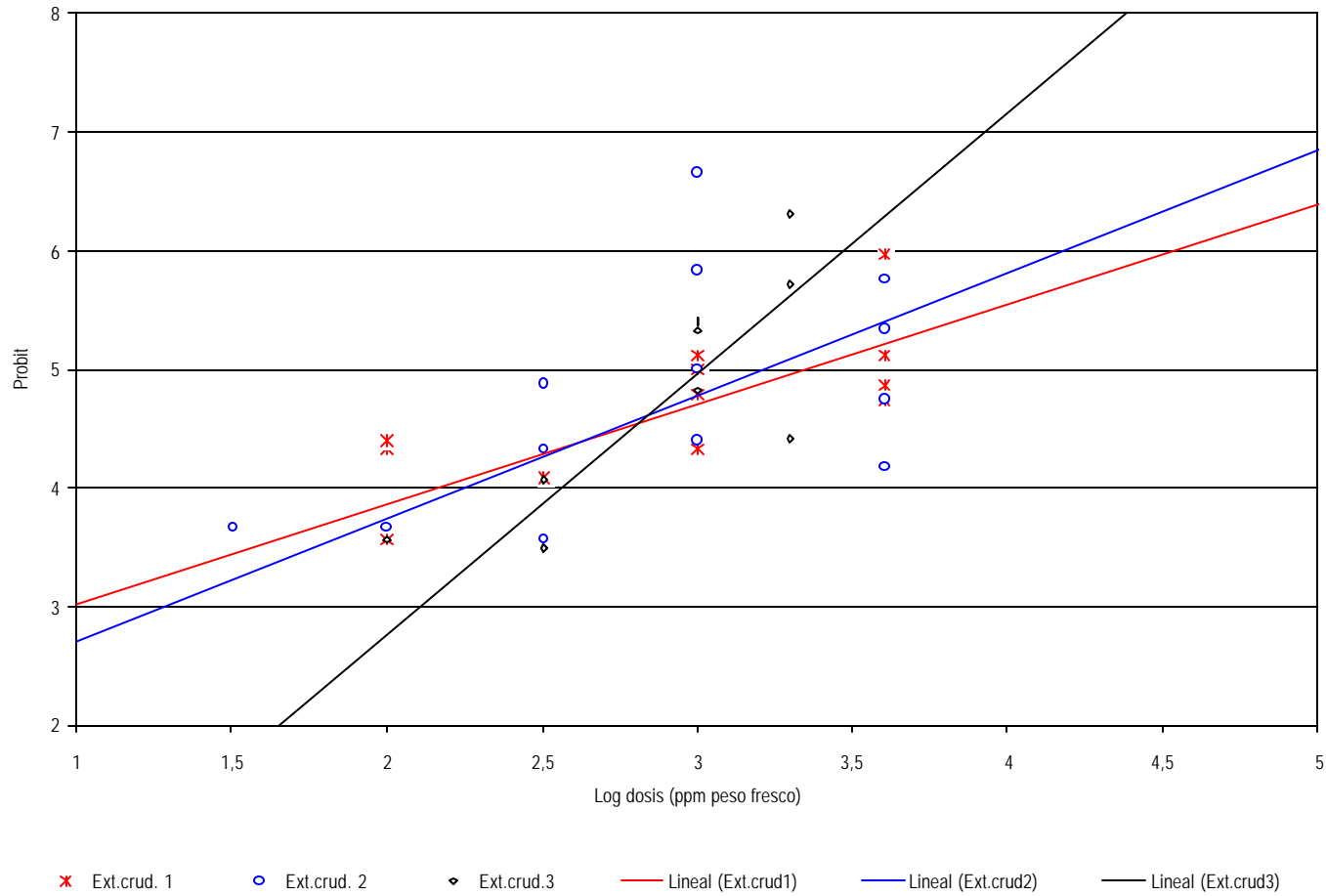
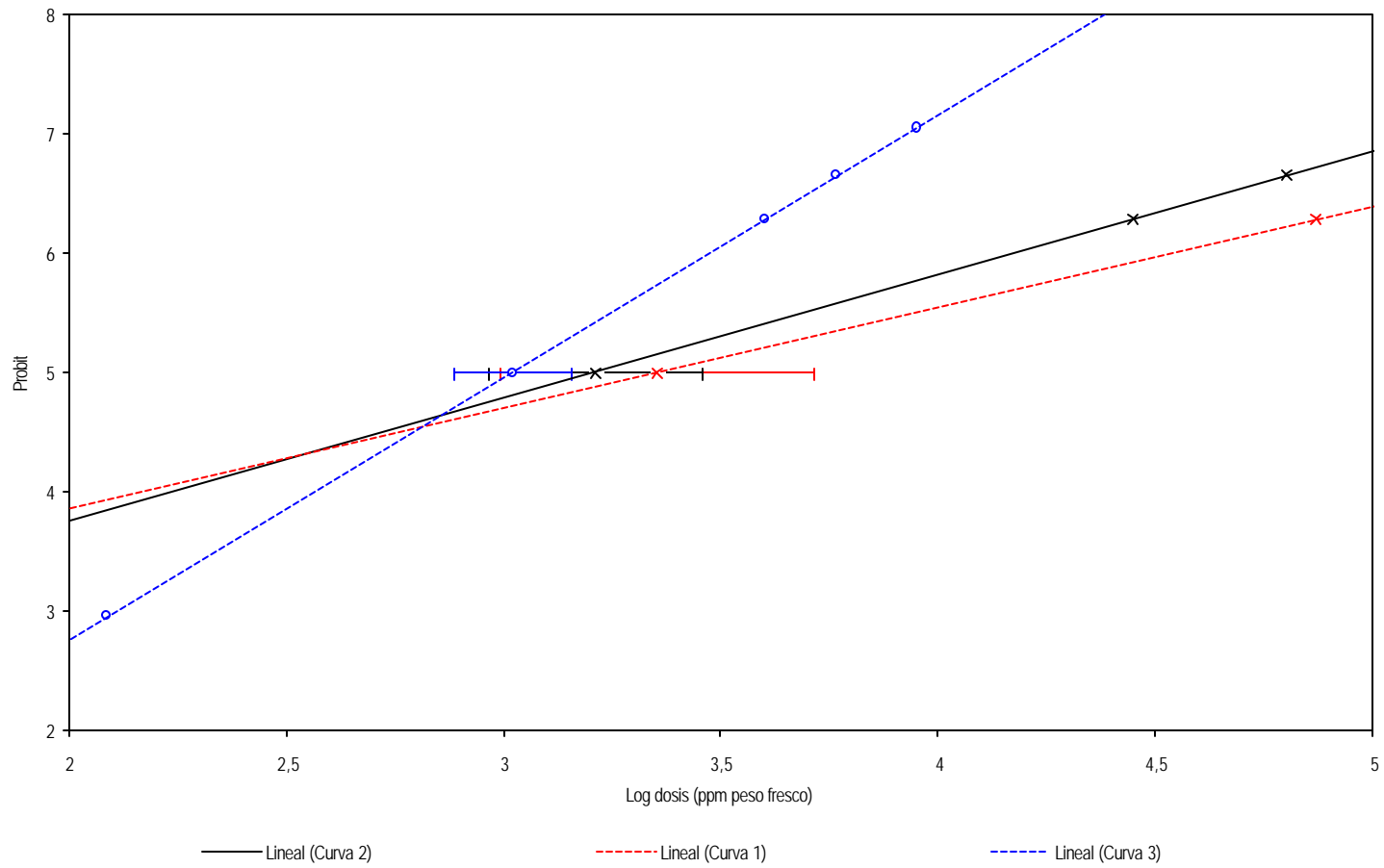


Figura 6. Solapamiento de los intervalos de confianza para la CL₅₀ de las curvas LDR para los extractos acuosos crudos de *B. latifolia* hembra (Log dosis vs. probit)



Los intervalos de confianza de la CL_{50} corresponden a los de una distribución de probabilidades de Student, a un nivel de confianza del 95%. Este es el intervalo en el que se encontraría el 95% de la actividad biológica de los extractos provenientes de una planta en particular. La probabilidad de Student se prefiere a la probabilidad normal cuando el análisis se refiere a una muestra y no a la población, o a muestras de gran tamaño.

La evaluación de si las diferencias en la CL_{50} para el extracto crudo acuoso son o no significativas por comparación entre $f_{1,2}$ y el cociente entre las CL_{50} se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Determinación de la significancia de la diferencia de las CL_{50} de los extractos crudos de *Baccharis latifolia*.

Muestras comparadas	CL_{50} Superior / CL_{50} Inferior	$f_{1,2}$	Diferencia entre las CL_{50}
1 y 2	1,39	2,73	No significativa
1 y 3	2,16	2,43	No significativa
2 y 3	1,56	1,91	No significativa

Las tres repeticiones del ensayo de actividad biológica del extracto acuoso de *B. latifolia* exhibieron distintos valores de CL_{50} con diferencias no significativas, en consecuencia podemos afirmar que cualquiera de estos valores es un estimado apropiado de la CL_{50} del extracto. La mayor diferencia se presentó entre las muestras 1 y 3; sin embargo tales diferencias fueron estadísticamente no significativas, y se obtuvo la CL_{50} promedio a partir de los datos transformados (Anexo H).

3.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA BST DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR SPE ODS DEL EXTRACTO ACUOSO DE *B. latifolia*

Las fracciones obtenidas por SPE-ODS revelaron estas características: la fracción acuosa presentó color amarillo y algo de turbiedad; la fracción metanólica exhibió coloración amarilla transparente y un olor característico; la fracción diclorometanólica mostró una coloración blanquecina; y las fracciones de hexano e i-octano no exhibieron ninguna característica visible. Durante la elusión con metanol se observó la formación de dos fracciones; la primera en ser eluída, de color amarillo y la segunda, de color naranja. Un compuesto de color amarillo no pudo ser eluído de la columna, aun después de aplicar cantidades de i-octano tres veces mayores a las descritas para el procedimiento, y de sumergir la masa del sorbente en MeOH, DCM y hexano calientes.

El fraccionamiento del extracto acuoso por SPE-ODS condujo al aislamiento de una única fracción con actividad biológica, la correspondiente a la fracción metanólica. Esta fracción exhibió una CL_{50} promedio de 3038,61 mg peso fresco/L ($1366,90 < CL_{50} < 6754,80$) (Anexo I), empleando como vehículo DMSO, el cual es descrito por IVU¹⁶⁸ como un poderoso solvente con características farmacológicas especiales, capaz de alterar la permeabilidad de las membranas celulares, y de atravesar la piel o mucosas, transportando

a la vez cualquier sustancia disuelta en el. Las concentraciones de esta fracción se determinaron teniendo en cuenta el peso húmedo del material vegetal del cual se partió, si consideramos un porcentaje aproximado de humedad del 65% (Anexo F), la CL₅₀ en peso seco para esta fracción sería de 1063,14 mg/L.

Las diferencias encontradas entre las CL₅₀ para las dos fracciones metanólicas probadas fueron estadísticamente no significativas (Tabla 5), existiendo además solapamiento en los intervalos de confianza (Figura 8). En consecuencia se obtuvo un valor promedio de los valores CL₅₀, e intervalos de confianza (Anexo H).

Tabla 5. Determinación de la significancia de la diferencia de las CL₅₀ entre los extractos acuosos crudos y entre las replicas de la fracción MeOH SPE ODS de *B. latifolia*

Ensayos comparados	CL ₅₀ Superior /CL ₅₀ Inferior	$f_{1,2}$	Diferencia entre las CL ₅₀
M1 y M2	1,39	3,68	No significativa

En la figura 7 se observa un comportamiento paralelo entre las curvas generadas por cada ensayo, verificándose que el proceso de extracción SPE ODS mejoró notablemente la homogeneidad de los compuestos extraídos en comparación con los extractos crudos.

Las diferencias entre las CL₅₀ de la fracción metanólica y del extracto crudo también fueron encontradas no significantes (Tabla 6) (Anexo H). Esto permite concluir que la mayor parte de los compuestos activos están presentes en la fracción metanólica del extracto crudo acuoso de *Baccharis latifolia*. Los fabricantes: SUPELCO¹⁶⁹, VARIAN¹⁷⁰, y J.T.BACKER¹⁷¹ garantizan que la eficiencia en la recuperación de compuestos a través de los procedimientos de SPE son cercanas al 100%.

Tabla 6. Determinación de la significancia de la diferencia de las CL₅₀ entre los extractos acuosos crudos y entre las replicas de la fracción MeOH SPE ODS de *B. latifolia*

Ensayos comparados	CL ₅₀ Superior /CL ₅₀ Inferior	$f_{1,2}$	Diferencia entre las CL ₅₀
E y M	1,94	2,67	No significativa

La determinación de los valores de las CL₅₀ promedio y de los valores f se muestran detalladamente en el anexo H.

Todas las curvas dosis respuesta antes presentadas exhibieron buen ajuste a la curva LDR, no siendo necesario desechar ninguna de las pruebas por un valor excesivo de χ^2 (Anexo J). Se observa que a excepción de un ensayo (extracto crudo 3), las curvas restantes son casi paralelas, tanto en el ploteo log dosis – probit respuesta (Figura 9), como en el ploteo log dosis – mortalidad respuesta (Figura 10) (Anexo J).

3.5 ANALISIS DE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS GC/MS

El análisis GC/MS de la fracción metanólica permitió el reconocimiento de once compuestos principales, cuyo aislamiento, identificación y determinación de su actividad biológica son

Figura 7. Comparación entre las curvas LDR para cada ensayo con las fracciones MEOH SPE ODS obtenidas del fraccionamiento del extracto acuoso de *B. latifolia* hembra y presentación de los datos experimentales como puntos dispersos (Log dosis vs. probit).

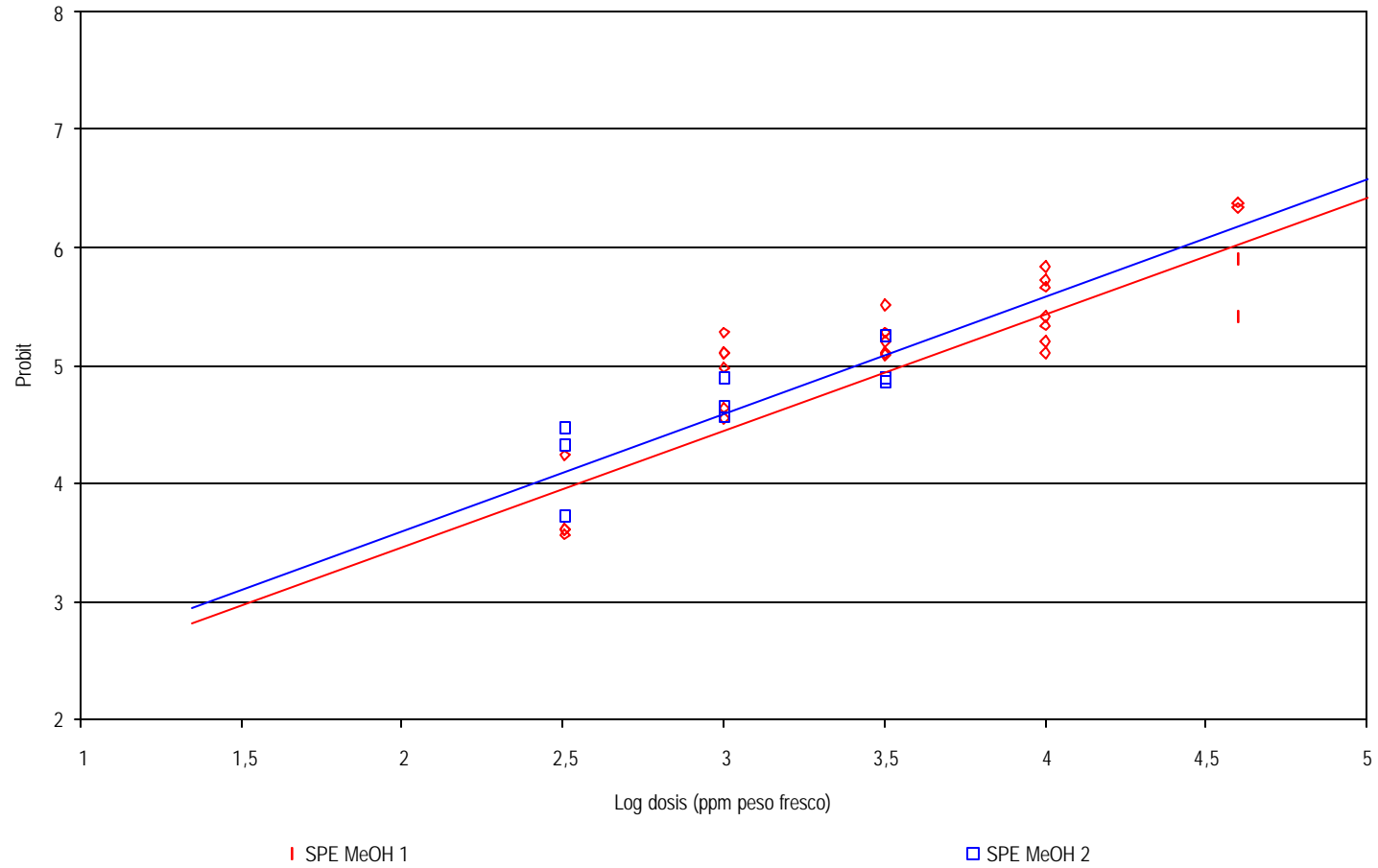


Figura 8. Solapamiento de los intervalos de confianza para la CL_{50} de las curvas LDR para las fracciones MEOH SPE ODS obtenidas del fraccionamiento de los extractos acuosos crudos de *B. latifolia* hembra (Log dosis vs. probit)

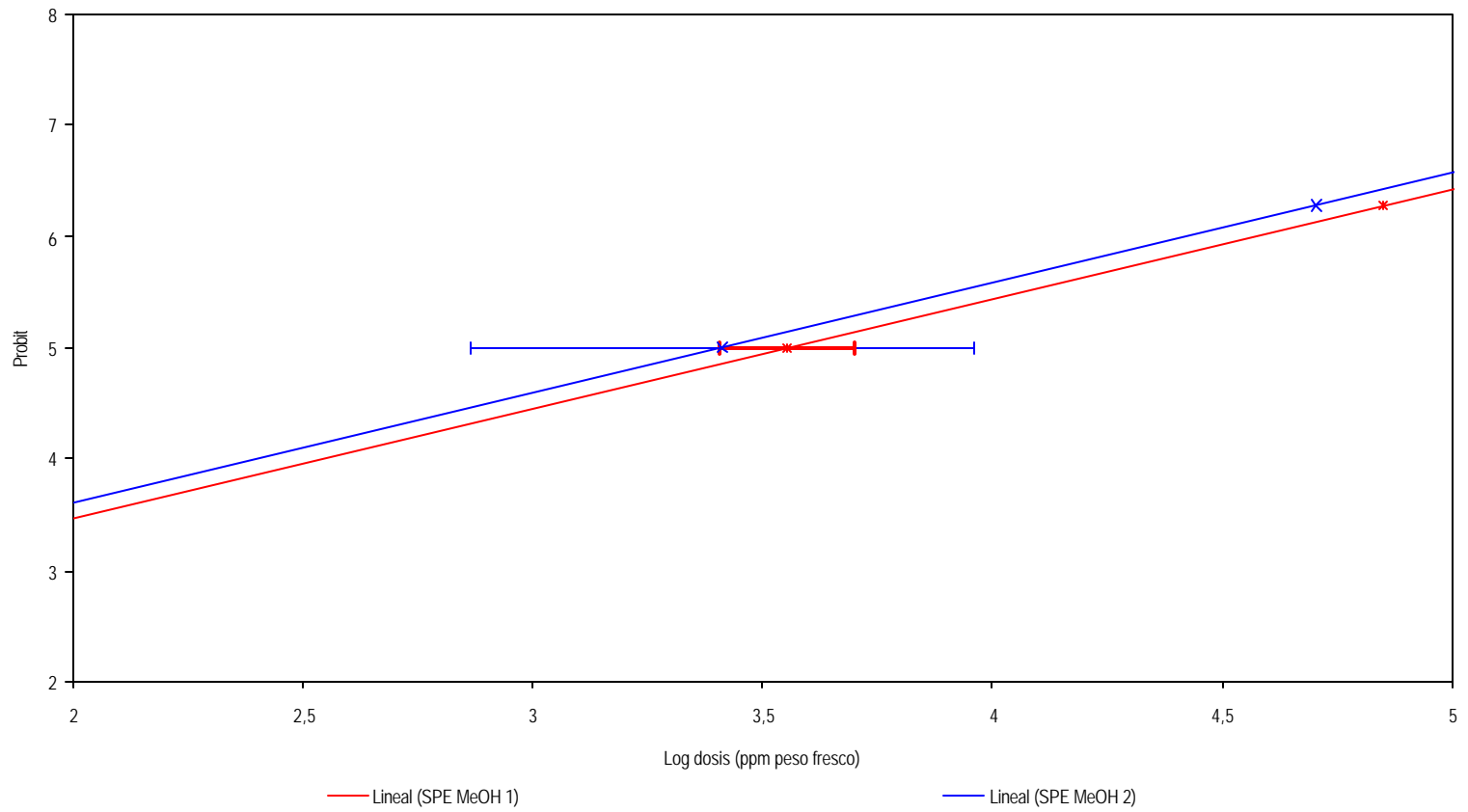
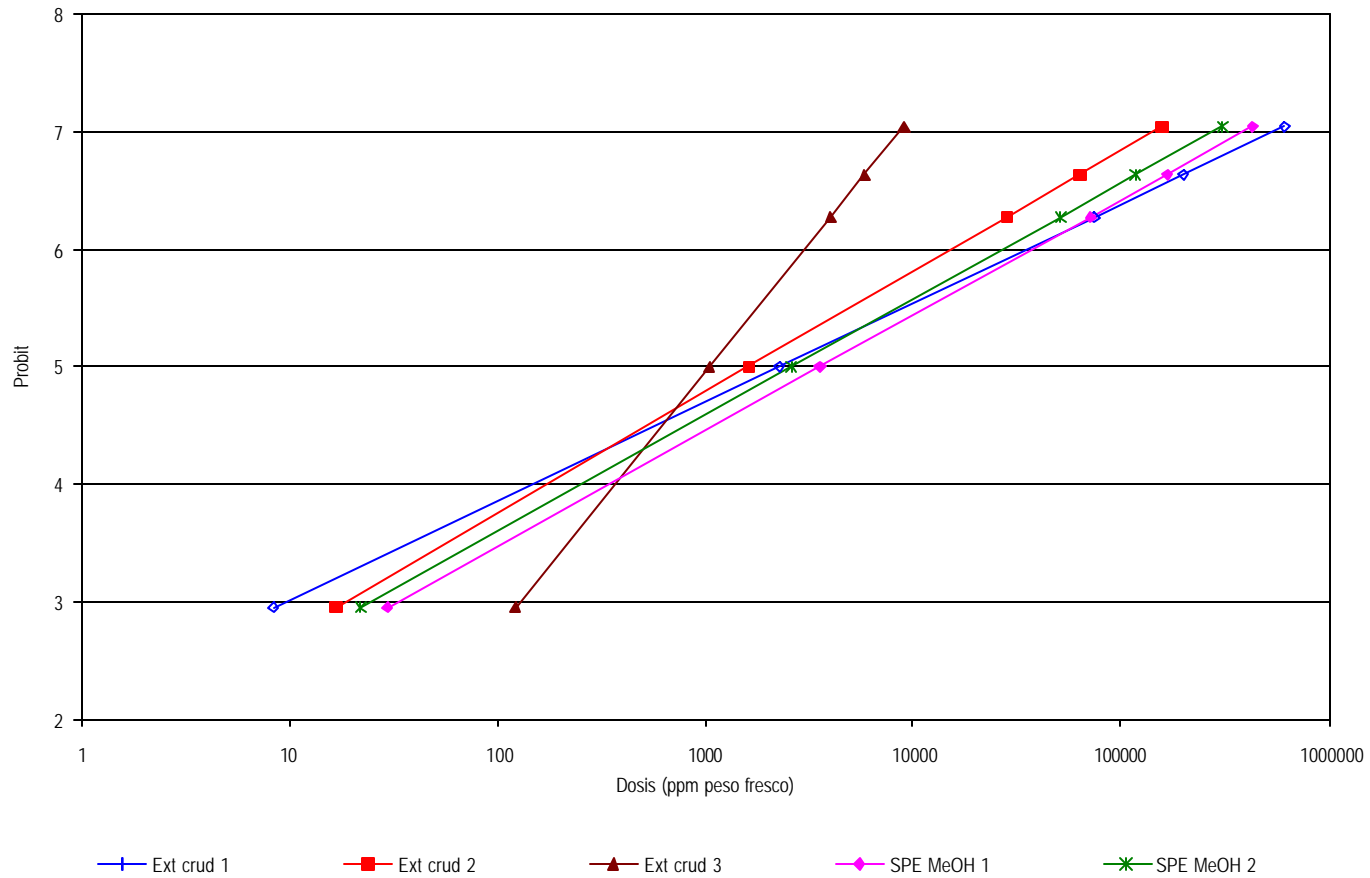


Figura 9. Comparación entre las curvas LDR para las fracciones MEOH SPE ODS y para los extractos crudos acuosos (Log dosis vs. probit)



Necesarios para establecer cual de ellos es el responsable de la capacidad farmacológica de la planta *Baccharis latifolia*.

En la figura 11 aparecen, el cromatograma iónico total para la fracción MEOH SPE ODS y en la figura 12 se muestran los espectros de masa para los compuestos más representativos del Cromatograma iónico total de la fracción MEOH SPE ODS. Como se observa en la figura 12 y en la tabla 7, estos compuestos exhiben patrones de fragmentación similar, con un pico base de m/z 44, y posibles iones moleculares a un m/z 207 y 208.

Tabla 7. Espectros de masa y tiempos de retención de los compuestos presentes en la fracción MeOH SPE-ODS del extracto acuoso de *B. latifolia*.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44
55	55	55	55	55	55	55	55	55	51	57
69	69	69	63	63	73	73	65	71	63	68
83	83	81	77	77	83	85	77	86	89	79
97	97	95	91	91	101	94	91	93	91	93
111	111	110	115	107	110	110	105	111	110	107
125	121	126	130	121	119	122	121	121	119	121
135	136	135	141	135	144	133	137	136	136	136
149	149	150	159	150	207	207	149	154	147	207
164	162	207	170	207			164	191	162	
179	177	235	177				191	207	177	
189	207		208				208		192	
207									208	
273										
Tiempos de retención										
22,675	19,807	16,750	23,311	17,501	11,569	15,367	18,134	15,438	19,268	12,527

La organización de los EI-MS de cada uno de los compuestos esta dada de acuerdo a la similitud que se observó en los fraccionamientos. Esta coincidencia puede explicarse por la técnica de fraccionamiento, SPE, y por la especificidad del sorbente utilizado (ODS). Meyer¹⁷² apoya esta afirmación argumentando que SPE ODS permite aislar compuestos de forma selectiva, basándose en la interacción de las ramificaciones C₁₈ de la sílica ligada y de la estructura molecular que el analito posee; partiendo de esto, los compuestos extraídos en la fracción MeOH SPE ODS, pueden ser ácidos carboxílicos, alcoholes, aminas y/o fenoles.

Para poder precisar cuáles son los compuestos que se extrajeron en la fracción metanólica, inicialmente se debe purificar los compuestos y posteriormente se puede complementar la información proporcionada por GC/MS, con las técnicas de Espectroscopía de infrarrojo para la determinación de los grupos funcionales y de Resonancia magnética nuclear (RMN) para la elucidación estructural.

Fraccionamientos posteriores de la fracción metanólica SPE-ODS por fase normal, NP (Normal Phase) -SPE en columnas SPE-SI (Sílica) empleando como eluentes: benceno: éter de petróleo: metanol: DCM 38,5: 30,8: 7,7: 23,1, MeOH y ácido acético glacial

permitieron la obtención de fracciones coloreadas. La primera fracción de color blanco y olor característico, la segunda de color amarillo y la última verde pardo. Pruebas preliminares de estas fracciones con el ensayo BST revelaron que la fracción MeOH SPE-SI posee actividad biológica. La comparación de los cromatogramas GC-FID mostraron que no existen diferencias importantes entre las fracciones MeOH SPE-ODS y la fracción MeOH SPE-SI.

Figura 11. Cromatograma Iónico Total de la fracción MEOH SPE-ODS del extracto crudo acuoso de *B. latifolia* hembra

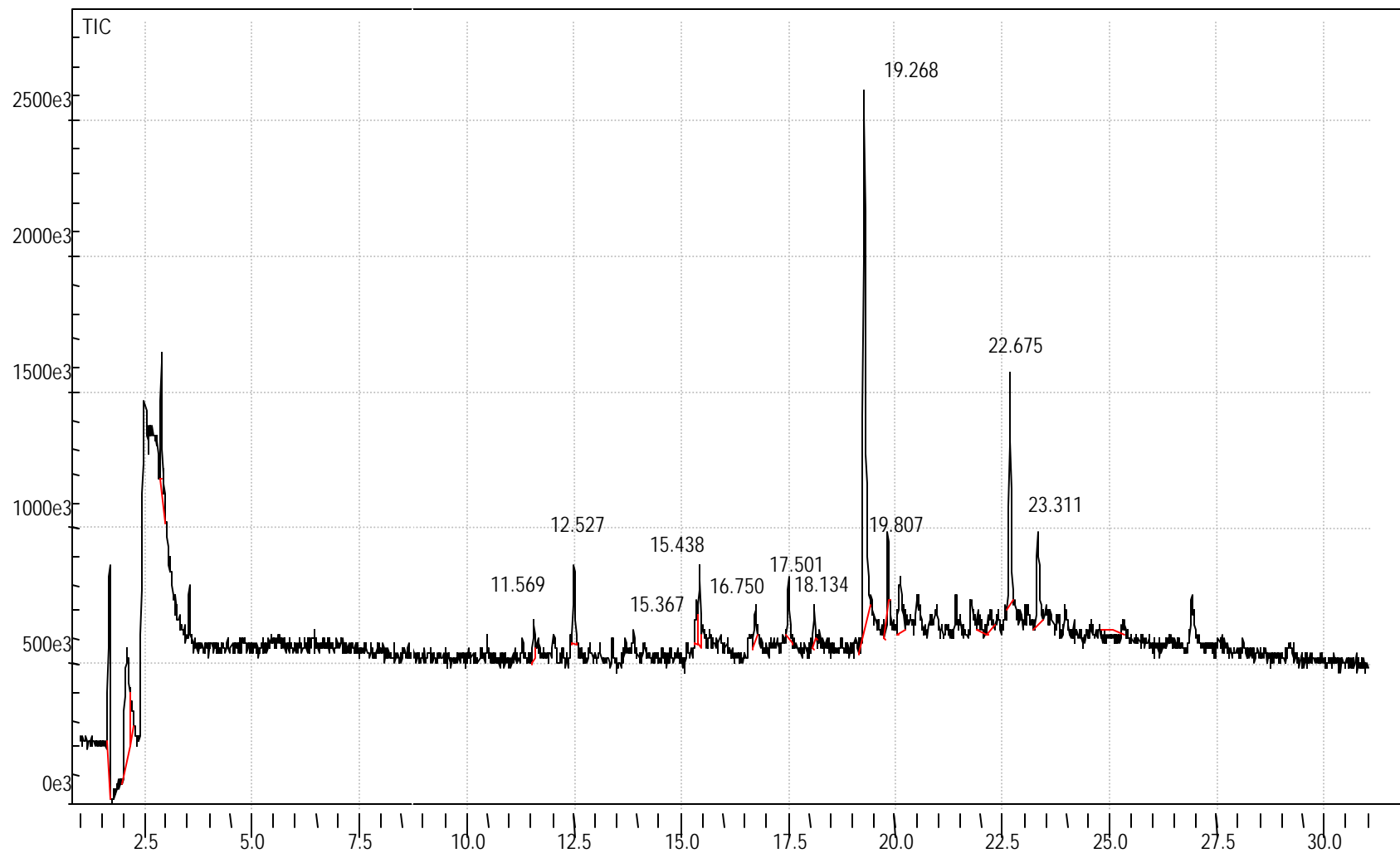
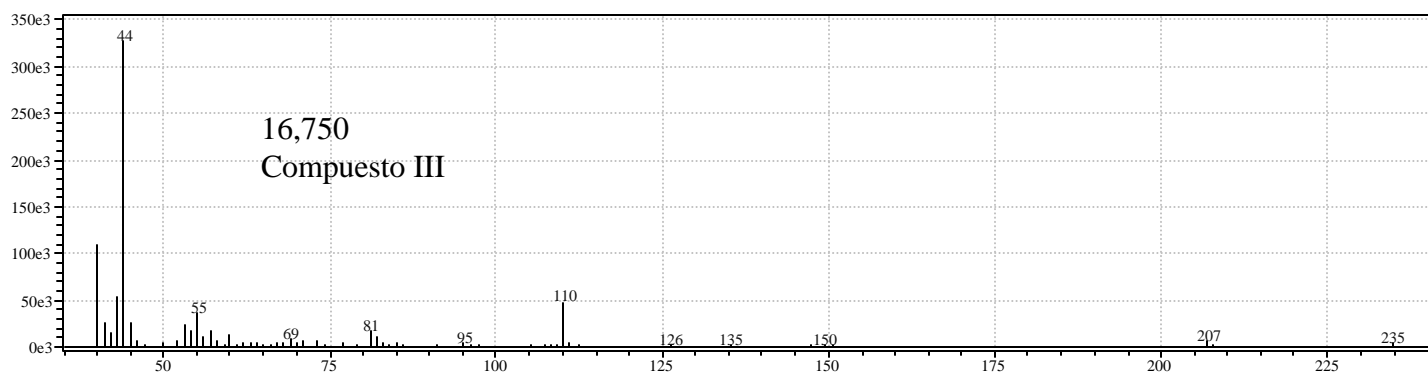
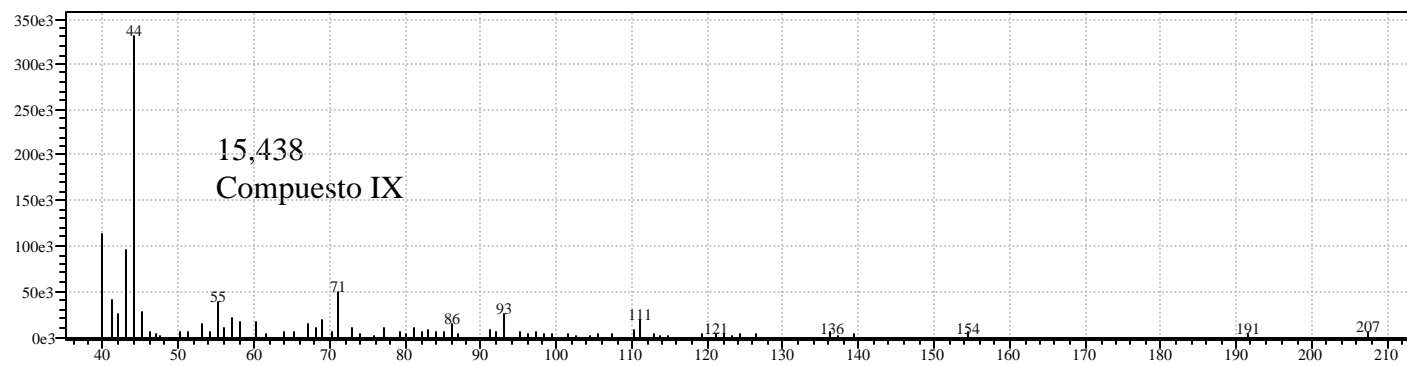
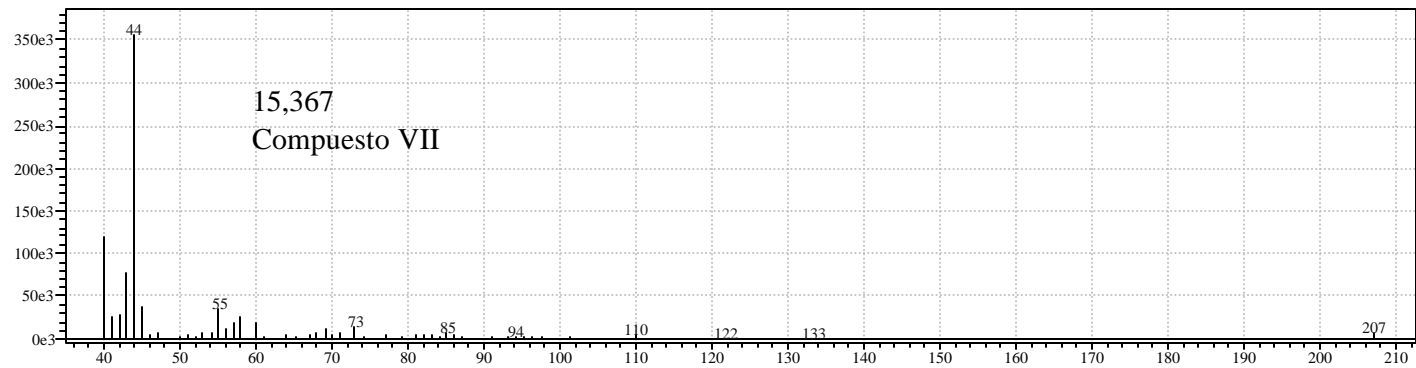
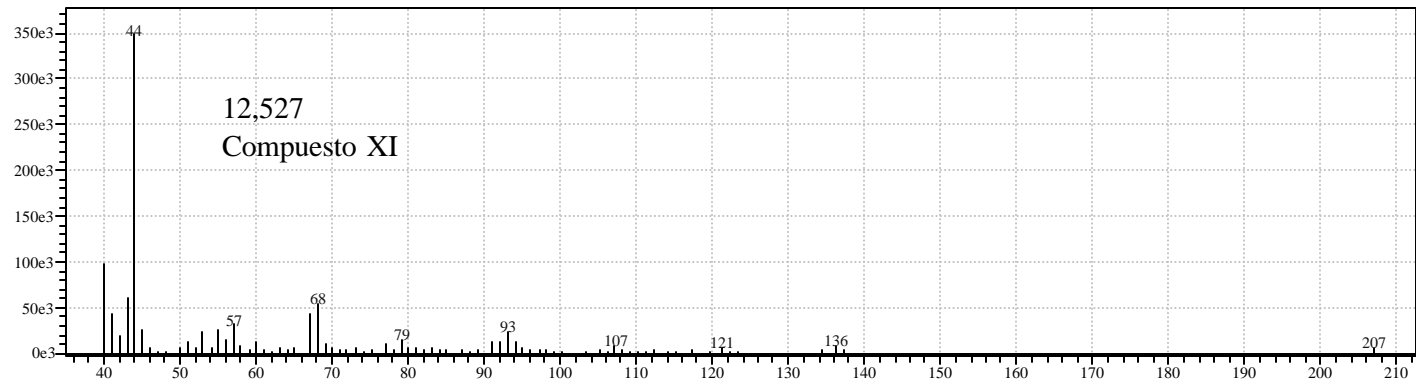
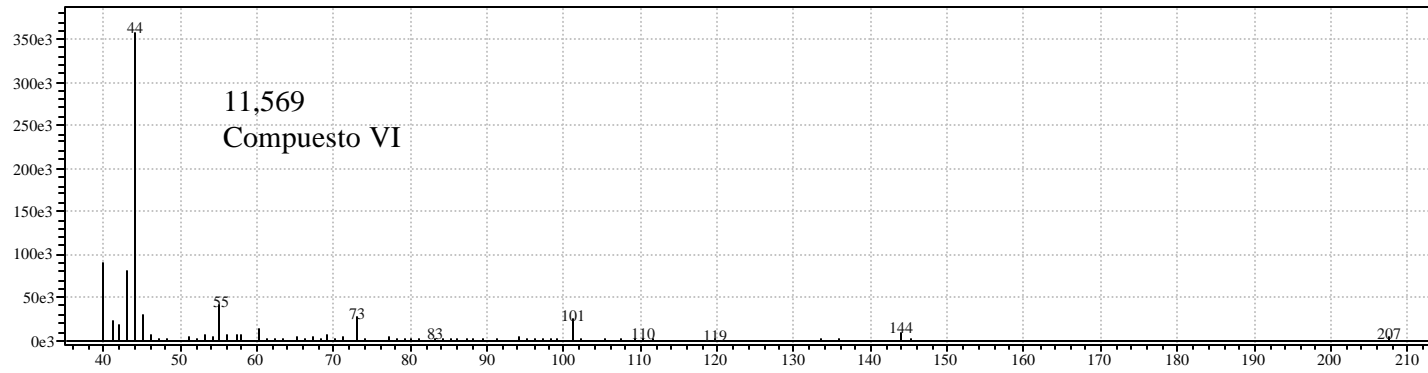
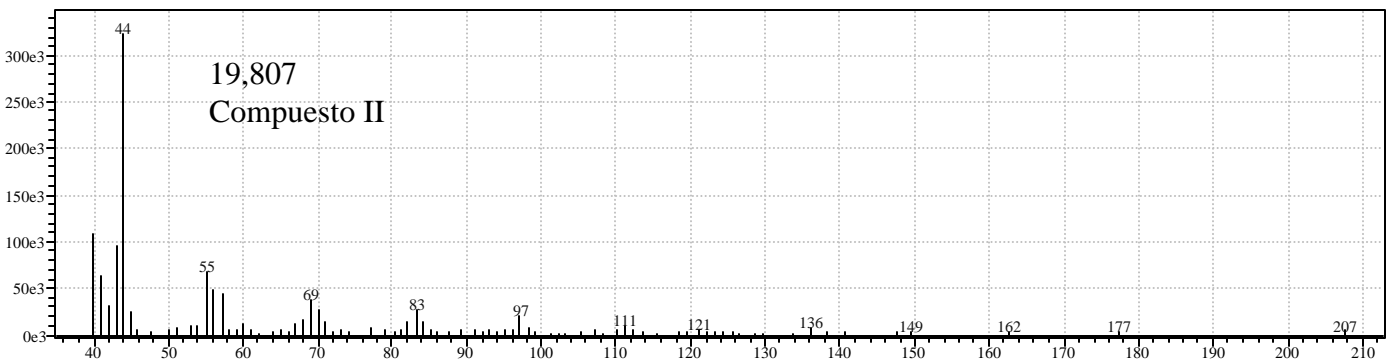
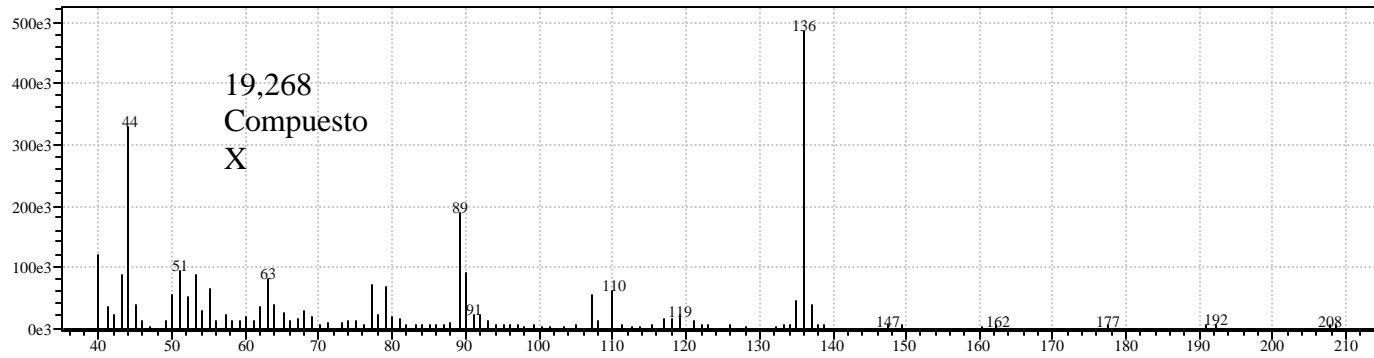
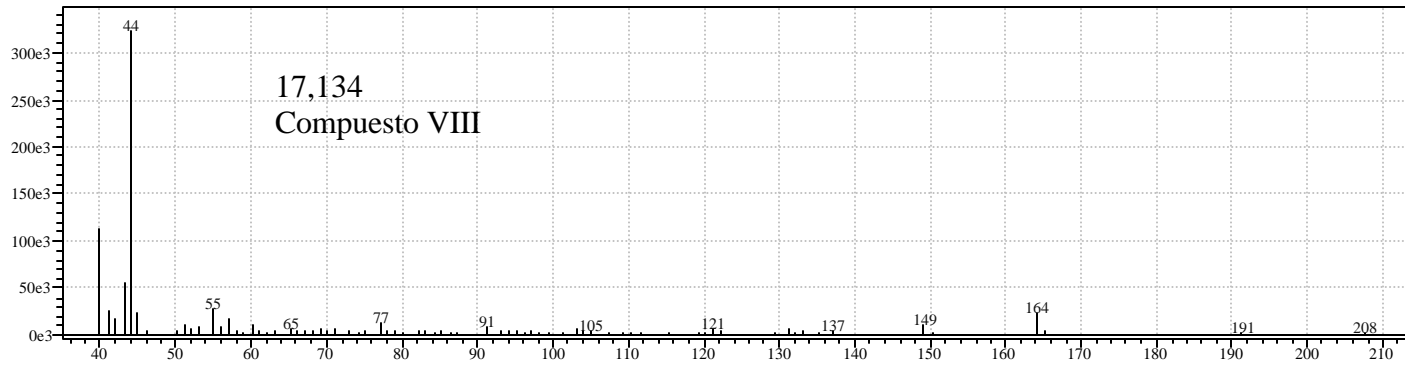
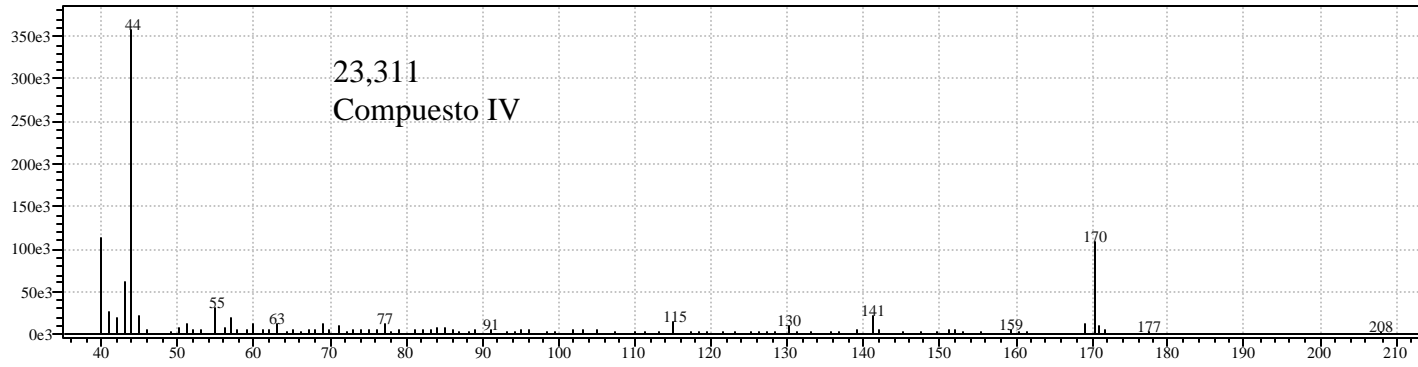
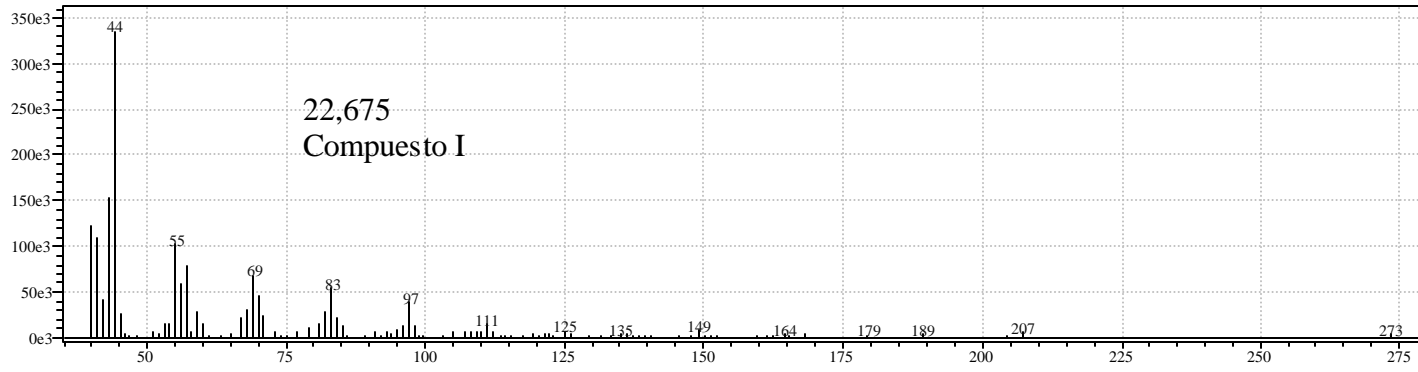


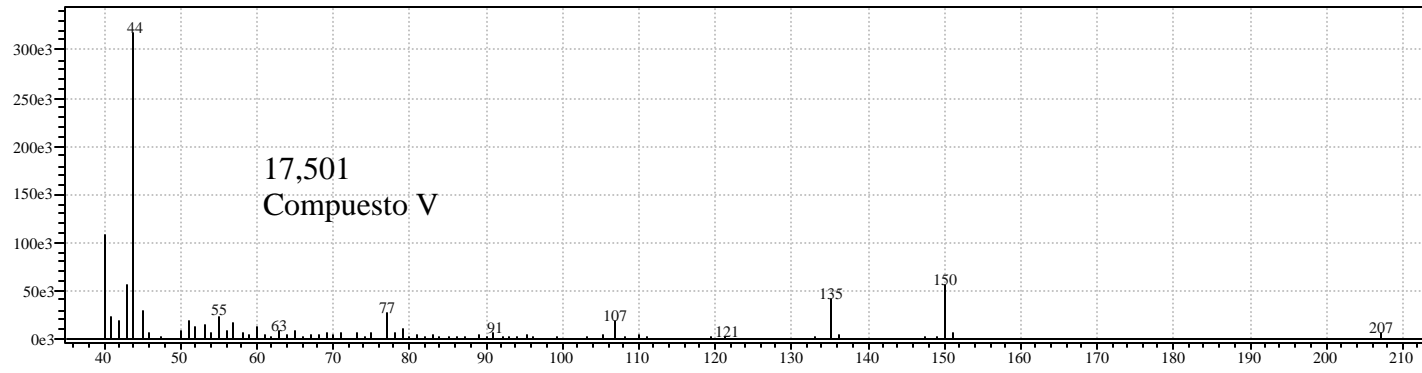
Figura 12. EI-MS de los picos más representativos del TIC de la fracción MeOH SPE-ODS











4. CONCLUSIONES

Los extractos orgánicos (MeOH, DCM, Hex) obtenidos por maceración de hojas de la especie *B. latifolia* no exhibieron actividad biológica detectable por el ensayo BST. Estos extractos exhiben una gran cantidad de resinas, resultando ser insolubles en agua, aún después de la adición de un vehículo (Tween 80®).

Un rápido sondeo entre los campesinos permitió vislumbrar la decocción de los cogollos como un método alternativo de obtener los principios activos de *B. latifolia*. Los métodos empleados en la medicina tradicional, aunque pueden degenerar los compuestos originales de la planta, generan compuestos que resultan ser activos y que no existen de forma natural. Este procedimiento además permitió la separación de resinas y clorofilas del sobrenadante acuoso. Las resinas o bien permanecieron adheridas al material vegetal, o precipitaron después de enfriarse la solución, mientras las clorofilas permanecieron dentro de la planta, sin solubilizarse.

El extracto acuoso de cogollos de *B. latifolia* exhibió actividad biológica en el ensayo BST, a una concentración promedio de 1562,788 mg/L de peso fresco, equivalente en peso seco a una concentración aproximada de 546,976 mg/L. Este extracto fue aplicado directamente en el ensayo BST, sin necesidad de emplear un vehículo.

La fracción metanólica de este extracto obtenida por SPE-ODS revelo una actividad biológica sin diferencias estadísticamente significativas de la exhibida por el extracto crudo. En consecuencia la mayor parte de los compuestos activos están presentes en esa fracción. La fracción MeOH SPE-ODS presento una CL_{50} promedio de 3038,61 mg/L de peso fresco.

Si se considera la CL_{50} en peso húmedo de los cogollos, la planta prácticamente no presentaría toxicidad, sin embargo al considerar que el porcentaje de humedad de los cogollos es de 65% aproximadamente, la CL_{50} está al rededor de 500 ppm y por lo tanto se puede concluir que la planta presenta una toxicidad media.

El procedimiento de fraccionamiento por SPE-ODS de extractos acuosos aplicado en esta investigación revela ser prometedor y efectivo en el fraccionamiento de extractos crudos con actividad biológica. Además es sencillo, relativamente de bajo costo, asegura buenas recuperaciones de analito y evita al máximo el desecho de solventes.

El análisis GC/EI-MS de la fracción MeOH SPE-ODS revela la presencia de once compuestos. Todos ellos exhiben un pico base común en m/z 44, a excepción de un compuesto que aunque posee otro ion m/z como pico base, tiene un pico prominente a m/z 44. Los compuestos exhiben patrones de fragmentación similares, poseyendo posibles iones moleculares entre 207 y 273.

5. RECOMENDACIONES

Es conveniente que se desarrolle un estudio más profundo de los extractos de *B. latifolia* en cuanto a:

Puesto que con el ensayo BST solo se determina la actividad biológica general de *Baccharis latifolia*, se considera importante evaluar las propiedades desinfectantes, emolientes, vulnerarias, antirreumáticas, analgésicas, tónico amargo, eupépticas, antimicrobianas, antiinflamatorias, consolidación de fracturas, antivirales, antidiabéticas; atribuidas en la medicina popular.

Validar los procedimientos de preparación de la planta dentro de la medicina popular, tales como: infusiones, decocciones, cataplasmas, aplicación directa de las hojas sobre la zona afectada, emplastos, pomadas.

La determinación de la CE_{50} (Concentración Efectiva Media), la cual se refiere al efecto terapéutico específico, en una especie animal superior.

Cálculo del Índice Terapéutico CL_{50}/CE_{50} , que para efectos prácticos conviene que la CL_{50} sea mucho mayor que la CE_{50} .

Cálculo de la CE_{50} específica para los efectos secundarios indeseables (CE_{50S}).

Definición del margen de seguridad o el intervalo de dosificación entre la dosis que produce un efecto letal y la que produce el efecto deseado.

Determinación de la eficacia del medicamento partiendo de las consideraciones del Índice Terapéutico, potencia, CE_{50S} , reversibilidad.

Purificar en mayor grado los compuestos activos, de tal forma que puedan ser identificados y probados mediante ensayos de dilución analítica. Hay que tener en cuenta que los preparados vegetales constituyen una mezcla compleja que podría contener principios potenciadores (Sinergia), antagonistas y estabilizadores.

Se puede profundizar en cuanto al estudio de la relación estructura química vs. respuesta biológica.

Si se obtuviera un principio activo menos potente que otro ya existente en el mercado, no debería descartarse, puesto que sería una valiosa herramienta en el caso de tratamientos largos.

De manera inversa sucederá con compuestos más potentes. Hay que tener cuidado en cuanto a las conclusiones a las cuales se llegue después de un ensayo biológico, puesto que las respuestas de los organismos de diferentes especies pueden variar significativamente, así como la respuesta de un organismo sano en contraste con un enfermo.

En cuanto a la comercialización potencial de los extractos vegetales como medicamentos alternativos cabría señalar que todo mejoramiento en cuanto a olor, sabor, textura, color y estabilidad constituyen puntos que influyen crucialmente en el grado de aceptación por parte de los enfermos, sobre todo de los niños.

Evaluación por análisis estadístico multivariado de la actividad biológica y de la proporción de componentes bioactivos de los cogollos de *B. latifolia* hembra y macho, a fin de establecer si existe diferencias asociadas al sexo de la planta. También puede evaluarse la influencia de otros factores medioambientales sobre la actividad biológica BST y la proporción relativa de compuestos activos específicos.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

- 1** FARNSWORTH, Norman R. and LOUB, William D. Information gathering and data bases that are pertinent to the development of plant-derived drugs. En : Plants: the potentials for extracting protein, medicines and other usefull chemicals-workshop proceedings. Chicago. 2003. p. 178-195
- 2** McLAUGHLIN, Jerry L.; ROGERS, LINGLING L. and ANDERSON, Jon E. The use of biológicoal assays to evaluate botánicos. En : Drug Information Journal. Vol. 32 (1998); p. 513-524
- 3** FARNSWORTH y LOUB, Op. cit., p.178-195
- 4** Ibid., p. 180
- 5** JARVIS, B. B.; WANG,S.; COX, C.; RAO, M. M.; PHILIP, V.; VARASCHIN, M. S.; BARROS, C. S. Brazilian *Baccharis* toxins : livestock poisoning and the isolation of macrocyclic trichothecene glucosides. En : Natural toxins. Vol. 4, No. 2 (1996); p. 58-71 [Database online]. Original no consultado. PubMed – indexed for MEDLINE [Cited 10 may 2003]. PMID: 8726325. Avalaible from Internet: <www.ncbi.nlm.nih.gov>
- 6** VILLACRES, Victor H.; SUAREZ H. Martha y TAFUR R., Valdano. Estudios sistematizados en plantas medicinales. En : VILLACRES, Victor. Bioactividad de plantas amazónicas. Quito : Abya-Yala, 1995. p. 25-51
- 7** RATNAYAKE, Sunil; RUPPRECHT, Kent; POTTER, William M. and McLAUGHLIN, Jerry. Evaluation of the Pawpaw tree, *Asimina triloba* (annonaceae), as a commercial source of the pesticidal annonaceous acetogenins. En : JANICK, J., and SIMON, J.E. New crops. New York : Wiley. 1993; p. 644-648
- 8** OJALA, Tiina. Biological screening of plant coumarins. Helsinki, 2001., p. 43-45 Academic dissertation. University of Helsinki. Faculty of Science. Department of Pharmacy. Division of Pharmacognosy
- 9** STANBACK,. Mark. Plant defenses: Investigating the differential allocations of secondary compounds. Davidson : Department of Biology, Davidson College, 2001. p. 1-7
- 10** CARBALLO, José Luis; HERNANDEZ- INDA, Zaira L.; PEREZ, Pilar and GARCIA – GRÁVALOS, María D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. En : BioMed Central Biotechnology. Vol. 2, No. 1 (2002); p. 17-23

11 SVOBODA, Katya P. and HAMPSON, Janice B. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants : antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities [Online]. Scotland : SAC Auchincruive [Cited 20 september 2003]. Available from internet: <www.ienica.ne/specchemseminar/svoboda>

12 VILLACRES, *et al.*, Op. cit., p. 26-50

13 GENTRY, Alwyn, H. A field guide to the families and genera of woody plants of Northwest South America (Col., Ec., Peru). Chicago : The University of Chicago Press, 1993. p. 339-343

14 CUATRECASAS, José. Revisión de las especies colombianas del género *Baccharis*. En : Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Vol. 13, No. 49 (Dic 1967); p. 5-20 Bogotá

15 CUATRECASAS, José. Notas adicionales, taxonómicas y cronológicas sobre *Baccharis*. En : Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Vol. 13, No. 50 (Dic 1968); p. 201-204 Bogotá

16 DIAZ-PIEDRAHITA, Santiago y CUATRECASAS, José. Flora de la Real Expedición Botánica del nuevo Reino de Granada (1783-1816) : Tribu Astereas. En : Instituto de Cooperación Iberoamericana e Instituto Colombiano de Cultura Hispánica. Madrid : Ediciones de Cultura Hispánica, 1989. p. 9-11

17 CUATRECASAS, Op. cit., p. 201-204

18 CORREA, Q.J.E. y BERNAL, H.Y. Especies vegetales promisorias del Convenio Andrés Bello. Bogotá : SECAB, 1990. Tomo V, p. 200-208

19 GARCIA BARRIGA, Hernando. Flora medicinal de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá : Talleres Editoriales de la Imprenta Nacional, 1975. Tomo 3. p. 308-309

20 CORREA y BERNAL, Op. cit., p. 200-208

21 PEREZ ARBELAEZ, Enrique. Plantas útiles de Colombia. Bogotá : Litografía Arco, 1956. p. 289

22 GARCIA BARRIGA, Op. cit., p. 308-309

23 CORREA y BERNAL, Op. cit., p. 200-208

24 BOHLMAN, Ferdinand; KRAMP, Wolfgang; GRENZ, Michael; ROBINSON, Harold and KING, Robert M. Diterpene from *Baccharis* species. En : Phytochemistry. Vol. 20, No. 8 (1981); p. 1907-1913

- 25** ZDERO, C.; BOHLMAN, F.; SOLOMON, J.C.; KING, R.M. and ROBINSON, H. *ent-clerodanes and other constituents from bolivian Baccharis species*. En : Phytochemistry. Vol. 28, No. 2 (1989); p. 531-542
- 26** CARBONELL, David. Importancia de las plantas medicinales en los programas básicos de salud. En : VILLACRES, Victor. Bioactividad de plantas amazónicas. Quito : Abya-Yala, 1995. p. 19-23
- 27** MORENO, María Eugenia; GONZALES, Santiago; ACEVEDO, Liliana; MORALES, Gladis; BETANCUR, Mónica; LOPEZ, Jhon Jairo y PELAEZ, Carlos Alberto. *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae): modelo biológico para la estandarización de extractos naturales con actividad insecticida. (El Neem- *Azadirachta indica* un caso particular). En : Revista Colombiana de Entomología. Vol. 26, No. 1/2 (2000); p. 51-55
- 28** SKOOG, Douglas A. Análisis Instrumental. México : McGraw-Hill Interamericana de España, 1994. p. 720-726
- 29** McLAUGHLIN, *et al.*, Op. cit., p. 513-524
- 30** GLANSZPIGEL, R. y ROSENKRANNZ, A. Control biológico de medicamentos. En : HELMAN, José. Farmacotecnia : teoría y práctica. México : CECSA, 1981. p. 2575-2588
- 31** FARNSWORTH y LOUB, Op. cit., p. 178-195
- 32** McLAUGHLIN, Jerry L.; ROGERS, LINGLING L. and ANDERSON, Jon E. The use of biological assays to evaluate botánicals. En : Drug Information Journal. Vol. 32 (1998); p. 513-524
- 33** Ibid., p. 514-520
- 34** MORENO, María Eugenia; GONZALES, Santiago; ACEVEDO, Liliana; MORALES, Gladis; BETANCUR, Mónica; LOPEZ, Jhon Jairo y PELAEZ, Carlos Alberto. *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae): modelo biológico para la estandarización de extractos naturales con actividad insecticida. (El Neem- *Azadirachta indica* un caso particular). En : Revista Colombiana de Entomología. Vol. 26, No. 1/2 (2000); p. 51-55
- 35** McLAUGHLIN, *et al.*, Op. cit., p. 513-524
- 36** CARBONELL, Op. cit., p. 19-23
- 37** McLAUGHLIN, *et al.*, Op. cit., p. 513-524
- 38** FARNSWORTH and LOUB, Op. cit., p. 178-195

- 39** McLAUGHLIN, *et al.*, Op. cit., p. 513-524
- 40** WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO 42.43 Resolution. Geneva : WHO, 1989
- 41** WHO, Op. cit., 42.43 Resolution
- 42** VILLACRES, *et al.*, p. 25-51
- 43** SANABRIA GALINDO, Antonio; LOPEZ, Sandra Isabel y GUALDRON, Roberto. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. En : Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmaceuticas. No. 26 (1997); p. 15-19
- 44** SALAMA, Ahmed; HINESTROZA, Angela Patricia y CHAVES R. Marisela del Pilar. Fito y bioanálisis de algunas plantas utilizadas en medicina popular con posible actividad farmacológica. En : Revista Colombiana de Ciencias Químico-farmacéuticas. Vol. 10, No. 25 (1996); p. 44-51
- 45** MURILLO MORENO, Barbara; BONILLA ARANGO, Alba; GONZALES GONZALES, Jaime y NIEMEYER, Hermann. Estudios de potencial actividad insecticida de algunas especies nativas. Evaluación de los extractos de *Brunfelsia pauciflora* (H.B.K.). En : Revista Colombiana de Entomología. Vol. 21, No. 1 (1990); p.45-50
- 46** STANBACK,. Mark. Plant defenses: Investigating the differential allocations of secondary compounds. Davidson : Department of Biology, Davidson College, 2001. p. 1-7
- 47** McLAUGHLIN, *et al.*, 513-524
- 48** ALMEIDA ALVES, Tania Maria; FONSECA SILVA, Andréia; BRANDÃO, Mitzi; MESQUITA GRANDI, Telma Sueli; SMANIA, Elza de Fátima A.; SMANIA, Artur and ZANI, Carlos Leomar. Biológico Screening of Brazilian Medicinal Plants. En : Memorias Instituto Oswaldo Cruz. Vol. 95, No. 3 (2000); p. 363-367
- 49** SÖKMEN, Atalay. Antiviral an cytotoxic activities of extract from the cell culture and respective parts of some Turkish medicinal plants. En : Turkish Journal Biology. Vol. 25 (2001); p. 343-350
- 50** MORENO, *et al.*, Op. cit., p. 51-55
- 51** RATNAYAKE, Sunil; RUPPRECHT, Kent; POTTER, William M. and McLAUGHLIN, Jerry. Evaluation of the Pawpaw tree, *Asimina triloba* (annonaceae), as a commercial source of the pesticidal annonaceous acetogenins. En : JANICK, J., and SIMON, J.E. New crops. New York : Wiley. 1993; p. 644-648

- 52** VILLACRES, Victor H.; SUAREZ H. Martha y TAFUR R., Valdano. Estudios sistematizados en plantas medicinales. En : VILLACRES, Victor. Bioactividad de plantas amazónicas. Quito : Abya-Yala, 1995. p. 25-51
- 53** SALAMA, Ahmed; HINESTROZA, Angela Patricia y CHAVES R. Marisela del Pilar. Fito y bioanálisis de algunas plantas utilizadas en medicina popular con posible actividad farmacológica. En : Revista Colombiana de Ciencias Químico-farmacéuticas. Vol. 10, No. 25 (1996); p. 44-51
- 54** SANABRIA GALINDO, Antonio; LOPEZ, Sandra Isabel y GUALDRON, Roberto. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. En : Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmaceuticas. No. 26 (1997); p. 15-19
- 55** McLAUGHLIN, *et al.*, Op. cit., p. 513-524
- 56** RODRIGUEZ, Hugo Humberto. Determinación de toxicidad y bioactividad de cuatro insecticidas orgánicos recomendados para el control de plagas en cultivos hortícolas. En : Revista Latinoamericana de Agricultura y Nutrición. Vol. 1, No. 3 (1998); p. 14-21
- 57** ALMEIDA ALVES, Tania Maria; FONSECA SILVA, Andréia; BRANDÃO, Mitzi; MESQUITA GRANDI, Telma Sueli; SMANIA, Elza de Fátima A.; SMANIA, Artur and ZANI, Carlos Leomar. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. En : Memorias Instituto Oswaldo Cruz. Vol. 95, No. 3 (2000); p. 363-367
- 58** OJALA, Op. cit., p. 43-45
- 59** SÖKMEN, Op. cit., p. 343-350
- 60** STANBACK, Mark. Plant defenses: Investigating the differential allocations of secondary compounds. Davidson : Department of Biology, Davidson College, 2001. p. 1-7
- 61** POPOVA, Milena; BANKOVA, Vassya; CHIMOV, Angel, and SILVA, Mario. A scientific note on the high toxicity of propolis that comes from *Myroxylon balsamum* trees. En : Apidologie. Vol. 33 (2002); p. 87-88
- 62** SVOBODA, Op. cit.
- 63** LOOMIS, Ted A. Fundamentos de toxicología. Zaragoza : Acribia, 1982. p. 29-45
- 64** CARBALLO, José Luis ; HERNANDEZ- INDA, Zaira L.; PEREZ, Pilar and GARCIA – GRÁVALOS, María D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. En : BioMed Central Biotechnology. Vol. 2, No. 1 (2002); p. 17-23
- 65** McLAUGHLIN, *et al.*, Op. cit., p. 513-524

- 66** STANBACK, Op. cit., p. 1-7
- 67** ALMEIDA ALVEZ, *et al.*, Op. cit., p. 363-367
- 68** SALTER, William. Tratado de farmacología aplicada. México : Interamericana, 1953. Tomo I. p. 29-39
- 69** BONNIER, Gert y TEDIN, Olof. Bioestadística : los métodos estadísticos para la valoración de experimentos biológicos. Zaragoza, España : Acribia, 1965. 222p.
- 70** GOLDSTEIN. Avram; ARONOW, Lewis y KALMAN, Sumner. Farmacología. México : Limusa, 1979. p. 449-471
- 71** GLANSZPIGEL y ROSENKRANZ, Op. cit., p. 2575-2588
- 72** LOOMIS, Op. cit., p. 29-45
- 73** SAHA, G. M. Design and análisis for bioassays. En : Design workshop lecture notes Indian Statistical Institut. Kolkata, India : ISI, 2002. p. 61-75
- 74** SALTER, Op. cit., p. 29-39
- 75** BONIER y TEDIN, Op. cit., p. 169-179
- 76** GOLDSTEIN y ARONOW, Op. cit., 449-471
- 77** GLANSZPIGEL y ROSENKRANZ, Op. cit., p.2575-2588
- 78** LOOMIS, Op. cit., p. 29-45
- 79** SAHA, Op. cit., p. 61-75
- 80** SALTER, Op. cit., p. 29-39
- 81** BONIER y TEDIN, Op. cit., p. 169-179
- 82** GOLDSTEIN y ARONOW, Op. cit., 449-471
- 83** GLANSZPIGEL y ROSENKRANZ, Op. cit., p.2575-2588
- 84** LOOMIS, Op. cit., p. 29-45
- 85** SUPELCO. Solid Phase Extraction : Referente Manual and Users guide. Supelco, 2000. 12p.

- 86** VARIAN. Solid Phase Extraction. Iiarbor. California : Varian, 2000. 20p.
- 87** ZIEF, Morris and KISER, Ruthann. Solid Phase Extraction for Sample Preparation. Phillisburg, New Jersey : J.T. Baker, 2000. 54p.
- 88** CUATRECASAS, Notas adicionales, taxonómicas y cronológicas sobre *Baccharis* Op. cit., p. 201-204
- 89** CORREA y BERNAL, Op. cit., p. 200-208
- 90** GIULANO, Daniel A. Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, astereae). En : Darwiniana. Vol. 39, No. 1/2 (2001); p. 131-154 Cuatrecasas, 1968;
- 91** CUATRECASAS, Notas adicionales, taxonómicas y cronológicas sobre *Baccharis* Op. cit., p. 201-204
- 92** VILLACRES, Op. cit., p. 25-51
- 93** JARVIS, B. B.; WANG,S.; COX, C.; RAO, M. M.; PHILIP, V.; VARASCHIN, M. S.; BARROS, C. S. Brazilian *Baccharis* toxins : livestock poisoning and the isolation of macrocyclic trichothecene glucosides. En : Natural toxins. Vol. 4, No. 2 (1996); p. 58-71 [Database online]. Original no consultado. PubMed – indexed for MEDLINE [Cited 10 may 2003]. PMID: 8726325. Avalaible from Internet: www.ncbi.nlm.nih.gov
- 94** CUATRECASAS, Notas adicionales, taxonómicas y cronológicas sobre *Baccharis* Op. cit., p. 201-204
- 95** STANBACK, Op. cit., p. 1-7
- 96** APHA, AWWA y WPCF. American Public Health Association, American Water Works Association y Water Pollution Control Federation. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Madrid : Diaz de Santos, 1992. 8010G.
- 97** APHA, AWWA y WPCF, Op.cit., 8010G
- 98** Ibid., 8010G
- 99** VILLACRES *et al.*, p. 25-51
- 100** SANABRIA, *et al.*, Op. cit., p. 15-19
- 101** McLAUGHLIN, *et al.*, Op. cit., p. 513-524

- 102** SÓKMEN, Op. cit., p. 343-350
- 103** STANBACK, OP. cit., p. 1-7
- 104** CARBALLO, Op. cit., p. 17-23
- 105** APHA, AWWA y WPCF, Op. cit., 8010G
- 106** GLANSZPIGEL y ROSENKRANZ, Op. cit., p. 2575-2588
- 107** 105 APHA, AWWA y WPCF, Op. cit., 8010G
- 108** VILLACRES, *et al.*, Op. cit., p. 25-51
- 109** SANABRIA, *et al.*, Op. cit., p. 15-19
- 110** McLAUGHLIN, *et al.*, Op. cit., p. 513-524
- 111** SÓKMEN, Op.cit., p. 343-350
- 112** STANBACK, Op. cit., p. 1-7
- 113** CARBALLO, *et al.*, Op. cit., p. 17-23
- 114** APHA, AWWA y WPCF, Op. cit., 8010G
- 115** ZIEF and KISER, Op. cit., p. 1-64
- 116** MEYER, Veronica. Practical High-Performance Liquid Chromatography. Berlin : Verlag Sauerländer, 1999. p. 149-200
- 117** SUPELCO. Solid Phase Extraction : Referente Manual and Users guide. Supelco, 2000. 12p.
- 118** VARIAN. Solid Phase Extraction. Iiarbor. California : Varian, 2000. 20p
- 119** RAYMOND Michel. Probit Analysis Program. March 1987 version. Laboratoire de génétique. Institut des Sciences de l'Evolution, U.S.T.L. Place E. Bataillon, 34060, Montpellier, France
- 120** _____. Présentation d'un programme Basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. En : Cahier ORSTOM séries Entomologie médical et Parasitologie. Vol. 23, No. 2 (1985) ; p. 117-121
- 121** BONNIER y TEDIN, Op. cit., p.

- 122** THRONE, James E.; WEAVER, David K and BAKER, James E. Probit analysis: assessing goodness-of-fit based on backtransformation and residuals. En : Journal economic entomology. Vol. 88, No. 5 (1995); p. 1513-1516
- 123** MARTINEZ YEPES, Pedro Nel y OSORIO GRISALES, Jaiver. Análisis del procedimiento para la determinación de la DL₅₀ (Dosis Letal media) a través del método de probit en un bioensayo. En : Revista de Investigaciones de la Universidad del Quindío. Vol. 4, No. 12 (2000). p. 12-32
- 124** SAHA, Op. cit., p. 61-75
- 125** MARTINEZ y OSORIO, Op. cit., p. 12-32
- 126** RAYMOND Michel. Présentation d'un programme Basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Op. cit., p. 117-121
- 127** _____. Probit Analysis Program. Op. cit.
- 128** APHA, AWWA y WPCF, Op. cit., 8010G
- 129** Ibid., 8010G
- 130** ARKIN, Herbert y COLTON, Raymond R. Métodos estadísticos. México : Continental, 1970. p. 151-169
- 131** HAYS, William L. Statistics for the social sciences. New York : Holt, Rinehart and Winston, 1973. p. 403-404
- 132** SACHS, Lothar. Estadística aplicada. Barcelona : Labor, 1978. p. 192-196
- 133** KUEHL, Robert O. Diseño de experimentos : principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. Mexico : Thomson Learning, 2001. p. 135-140
Paz Rebolledo, 2003
- 134** SACHS, Op. cit., p. 192-196
- 135** PAZ REBOLLEDO, Bernardo. Universidad del Cauca, Museo de Historia Natural, Herbario. Comunicación personal. 2003.
- 136** CUATRECASAS, Revisión de las especies colombianas del género *Baccharis*, Op. cit., p. 5-20
- 137** DIAZ y CUATRECASAS, Op. cit., p. 9-11
- 138** DALESIO, G.N.; FONTANA, L.R. y IRIBARREN, N.A. Pociones. En : HELMAN, José. Farmacotecnia : teoría y práctica. México : CECSA, 1981. p. 1807-1815.

- 139** BROWN, Theodore L.; LeMAY, Eugene H. y BURSTEN, Bruce E. Química la ciencia central. México : Pearson, 1999. 1055 P. p. 679-680
- 140** GARCIA y BARRIGA, Op. cit., p. 308-309
- 141** CORREA Y BERNAL, Op. cit., p. 200-208
- 142** POSTOBON. Conoce el agua de vida [online]. Colombia, Febrero 2004 [cited 24 mayo, 2004]. Available from Internet: <www.postobon.com/postobonSA/>
- 143** OLIVERO, J. J. Agua con fines farmacéuticos. En : HELMAN, José. Farmacotecnia : teoría y práctica. México : CECOSA, 1981. p.1364-1369
- 144** APHA, AWWA and WPCF, Op. cit., 8010G
- 145** Ibid., 8010G
- 146** Ibid., 8010G
- 147** GREULACH, Victor A. y ADAMS, Edison. Las plantas : introducción a la botánica moderna. México : Limusa, 1980. p. 325
- 148** Ibid., p. 325
- 149** DALESIO, *et al.*, Op. cit., p. 1807-1815
- 150** OLIVERO, Op. cit., p. 1364-1369
- 151** SANABRIA *et al.*, Op. cit., p. 15-19
- 152** RODRIGUEZ, Op. cit. p. 14-21
- 153** ALMEIDA, *et al.*, Op. cit., p. 363-367
- 154** CARBALLO, *et al.*, Op. cit., p. 17-23
- 155** SALAMA, *et al.*, Op. cit., 44-51
- 156** BONNIER y TEDIN, Op. cit., p.
- 157** SALTER, Op. cit., p. 29-39
- 158** GOLDSTEIN y ARONOW, Op. cit., p.449-471

- 159** GLANSZPIGEL y ROSENKRANZ, Op. cit., p. 2575-2588
- 160** LOOMIS, Op. cit., p. 29-45
- 161** KUEHL, Op. cit., p. 135-140
- 162** McLAUGHLIN, *et al.*, Op. cit., p.513-524
- 163** BONNIER y TEDIN, Op. cit., p.
- 164** SALTER, Op. cit., p. 29-39
- 165** GOLDSTEIN y ARONOW, Op. cit., p. 4449-471
- 166** GLANSZPIGEL y ROSENKRANZ, Op. cit., 2575-2588
- 167** LOOMIS, Op. cit., p. 29-45
- 168** INSTITUTO VETERINARIO DE URUGUAY. DMSO : Solución acuosa de Dimetilsulfoxido. Uruguay : IVU, 2004
- 169** SUPELCO, Op. cit. p.
- 170** VARIAN, Op. cit., p.
- 171** ZIEF and KISER, Op. cit., p
- 172** MEYER, Op. cit., p. 149-151

BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA ALVES, Tania Maria; FONSECA SILVA, Andréia; BRANDÃO, Mitzi; MESQUITA GRANDI, Telma Sueli; SMANIA, Elza de Fátima A.; SMANIA, Artur and ZANI, Carlos Leomar. *Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants*. En : *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 95, No. 3 (2000); p. 363-367

APHA, AWWA y WPCF. American Public Health Association, American Water Works Association y Water Pollution Control Federation. *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Madrid : Diaz de Santos, 1992. 8010G.

ARKIN, Herbert y COLTON, Raymond R. *Métodos estadísticos*. México : Continental, 1970. 334p.

BOHLMAN, Ferdinand; KRAMP, Wolfgang; GRENZ, Michael; ROBINSON, Harold and KING, Robert M. *Diterpene from Baccharis species*. En : *Phytochemistry*. Vol. 20, No. 8 (1981); p. 1907-1913

BONNIER, Gert y TEDIN, Olof. *Bioestadística : los métodos estadísticos para la valoración de experimentos biológicos*. Zaragoza, España : Acribia, 1965. 222 p.

BROWN, Theodore L.; LeMAY, Eugene H. y BURSTEN, Bruce E. *Química la ciencia central*. México : Pearson, 1999. 1055 P. 1055 p.

CARBONELL, David. *Importancia de las plantas medicinales en los programas básicos de salud*. En : VILLACRES, Victor. *Bioactividad de plantas amazónicas*. Quito : Abya-Yala, 1995. 378 p.

CARBALLO, José Luis; HERNANDEZ- INDA, Zaira L.; PEREZ, Pilar and GARCIA – GRÁVALOS, María D. *A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products*. En : *BioMed Central Biotechnology*. Vol. 2, No. 1 (2002); p. 17-23

CORREA, Q.J.E. y BERNAL, H.Y. *Especies vegetales promisorias del Convenio Andrés Bello*. Bogotá : SECAB, 1990. Tomo V, 475p.

CUATRECASAS, José. *Notas adicionales, taxonómicas y cronológicas sobre Baccharis*. En : *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. Vol. 13, No. 50 (Dic 1968); p. 201-204 Bogotá

_____. Revisión de las especies colombianas del género *Baccharis*. En : Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Vol. 13, No. 49 (Dic 1967); p. 5-20 Bogotá

DALESIO, G.N.; FONTANA, L.R. y IRIBARREN, N.A. Pociones. En : HELMAN, José. Farmacotecnia : teoría y práctica. México : CECSA, 1981. 1905p.

DIAZ-PIEDRAHITA, Santiago y CUATRECASAS, José. Flora de la Real Expedición Botánica del nuevo Reino de Granada (1783-1816) : Tribu Astereas. En : Instituto de Cooperación Iberoamericana e Instituto Colombiano de Cultura Hispánica. Madrid : Ediciones de Cultura Hispánica, 1989. p. 9-11.

FARNSWORTH, Norman R. and LOUB, William D. Information gathering and data bases that are pertinent to the development of plant-derived drugs. En : Plants: the potentials for extracting protein, medicines and other usefull chemicals-workshop proceedings. Chicago. 2003. p. 178-195

GARCIA BARRIGA, Hernando. Flora medicinal de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá : Talleres Editoriales de la Imprenta Nacional, 1975. Tomo 3. 495 p.

GENTRY, Alwyn, H. A field guide to the families and genera of woody plants of Northwest South America (Col., Ec., Peru). Chicago : The University of Chicago Press, 1993. 895 p.

GIULANO, Daniel A. Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, astereae). En : Darwiniana. Vol. 39, No. 1/2 (2001); p. 131-154

GLANSZPIGEL, R. y ROSENKRANNZ, A. Control biológico de medicamentos. En : HELMAN, José. Farmacotecnia : teoría y práctica. México : CECSA, 1981. 950p.

GOLDSTEIN. Avram; ARONOW, Lewis y KALMAN, Sumner. Farmacología. México : Limusa, 1979. 1200 p.

GREULACH, Victor A. y ADAMS, Edison. Las plantas : introducción a la botánica moderna. México : Limusa, 1980. 800p.

HAYS, William L. Statistics for the social sciences. New York : Holt, Rinehart and Winston, 1973. 430 p.

INSTITUTO VETERINARIO DE URUGUAY. DMSO : Solución acuosa de Dimetilsulfoxido. Uruguay : IVU, 2004.

JARVIS, B. B.; WANG,S.; COX, C.; RAO, M. M.; PHILIP, V.; VARASCHIN, M. S.; BARROS, C. S. Brazilian *Baccharis* toxins : livestock poisoning and the isolation of

macrocyclic trichothecene glucosides. En : Natural toxins. Vol. 4, No. 2 (1996); p. 58-71 [Database online]. Original no consultado. PubMed – indexed for MEDLINE [Cited 10 may 2003]. PMID: 8726325. Available from Internet: <www.ncbi.nlm.nih.gov>

KUEHL, Robert O. Diseño de experimentos : principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. Mexico : Thomson Learning, 2001. 870p.

LOOMIS, Ted A. Fundamentos de toxicología. Zaragoza : Acribia, 1982. 274 p.

MARTINEZ YEPES, Pedro Nel y OSORIO GRISALES, Jaiver. Análisis del procedimiento para la determinación de la DL₅₀ (Dosis Letal media) a través del método de probit en un bioensayo. En : Revista de Investigaciones de la Universidad del Quindío. Vol. 4, No. 12 (2000). p. 12-32

McLAUGHLIN, Jerry L.; ROGERS, LINGLING L. and ANDERSON, Jon E. The use of biological assays to evaluate botanicals. En : Drug Information Journal. Vol. 32 (1998); p. 513-524

MEYER, Veronica. Practical High-Performance Liquid Chromatography. Berlin : Verlag Sauerländer, 1999. 305 p.

MORENO, María Eugenia; GONZALES, Santiago; ACEVEDO, Liliana; MORALES, Gladis; BETANCUR, Mónica; LOPEZ, Jhon Jairo y PELAEZ, Carlos Alberto. *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae): modelo biológico para la estandarización de extractos naturales con actividad insecticida. (El Neem- *Azadirachta indica* un caso particular). En : Revista Colombiana de Entomología. Vol. 26, No. 1/2 (2000); p. 51-55

MURILLO MORENO, Barbara; BONILLA ARANGO, Alba; GONZALES GONZALES, Jaime y NIEMEYER, Hermann. Estudios de potencial actividad insecticida de algunas especies nativas. Evaluación de los extractos de *Brunfelsia pauciflora* (H.B.K.). En : Revista Colombiana de Entomología. Vol. 21, No. 1 (1990); p.45-50

OJALA, Tiina. Biological screening of plant coumarins. Helsinki, 2001., 62 p. Academic dissertation. University of Helsinki. Faculty of Science. Department of Pharmacy. Division of Pharmacognosy.

OLIVERO, J. J. Agua con fines farmacéuticos. En : HELMAN, José. Farmacotecnia : teoría y práctica. México : CECSA, 1981. 1055 p.

PAZ REBOLLEDO, Bernardo. Universidad del Cauca, Museo de Historia Natural, Herbario. Comunicación personal. 2003.

PEREZ ARBELAEZ, Enrique. Plantas útiles de Colombia. Bogotá : Litografía Arco, 1956. 831 p.

POSTOBON. Conoce el agua de vida [online]. Colombia, Febrero 2004 [cited 24 mayo, 2004]. Available from Internet: <www.postobon.com/postobonSA/>

POPOVA, Milena; BANKOVA, Vassya; CHIMOV, Angel, and SILVA, Mario. A scientific note on the high toxicity of propolis that comes from *Myroxylon balsamum* trees. En : Apidologie. Vol. 33 (2002); p. 87-88

RATNAYAKE, Sunil; RUPPRECHT, Kent; POTTER, William M. and McLAUGHLIN, Jerry. Evaluation of the Pawpaw tree, *Asimina triloba* (annonaceae), as a commercial source of the pesticidal annonaceous acetogenins. En : JANICK, J., and SIMON, J.E. New crops. New York : Wiley. 1993; p. 644-648.

RAYMOND Michel. Présentation d'un programme Basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. En : Cahier ORSTOM séries Entomologie médical et Parasitologie. Vol. 23, No. 2 (1985) ; p. 117-121

_____. Probit Analysis Program. March 1987 version. Laboratoire de génétique [Dikette]. Institut des Sciences de l'Evolution, U.S.T.L. Place E. Bataillon, 34060, Montpellier, France.

RODRIGUEZ, Hugo Humberto. Determinación de toxicidad y bioactividad de cuatro insecticidas organicos recomendados para el control de plagas en cultivos hortícolas. En : Revista Latinoamericana de Agricultura y Nutrición. Vol. 1, No. 3 (1998); p. 14-21

SAHA, G. M. Design and análisis for bioassays. En : Design workshop lecture notes Indian Statistical Institut. Kolkata, India : ISI, 2002. p. 61-75

SALAMA, Ahmed; HINESTROZA, Angela Patricia y CHAVES R. Marisela del Pilar. Fito y bioanálisis de algunas plantas utilizadas en medicina popular con posible actividad farmacológica. En : Revista Colombiana de Ciencias Químico-farmacéuticas. Vol. 10, No. 25 (1996); p. 44-51.

SALTER, William. Tratado de farmacología aplicada. México : Interamericana, 1953. Tomo I. 410p.

SACHS, Lothar. Estadística aplicada. Barcelona : Labor, 1978. 395p.

SANABRIA GALINDO, Antonio; LOPEZ, Sandra Isabel y GUALDRON, Roberto. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. En : Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmaceuticas. No. 26 (1997); p. 15-19

SKOOG, Douglas A. Análisis Instrumental. México : McGraw-Hill Interamericana de España, 1994. 934p.

SÖKMEN, Atalay. Antiviral and cytotoxic activities of extract from the cell culture and respective parts of some Turkish medicinal plants. En : Turkish Journal Biology. Vol. 25 (2001); p. 343-350

STANBACK, Mark. Plant defenses: Investigating the differential allocations of secondary compounds. Davidson : Department of Biology, Davidson College, 2001. p. 1-7

SVOBODA, Katya P. and HAMPSON, Janice B. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants : antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities [Online]. Scotland : SAC Auchincruive [Cited 20 september 2003]. Available from internet: <www.ienica.ne/specchemseminar/svoboda>

SUPELCO. Solid Phase Extraction : Referente Manual and Users guide. Supelco, 2000. 12p.

THRONE, James E.; WEAVER, David K and BAKER, James E. Probit analysis: assessing goodness-of-fit based on backtransformation and residuals. En : Journal economic entomology. Vol. 88, No. 5 (1995); p. 1513-1516

VARIAN. Solid Phase Extraction. Iarbor. California : Varian, 2000. 20p.

VILLACRES, Victor H.; SUAREZ H. Martha y TAFUR R., Valdano. Estudios sistematizados en plantas medicinales. En : VILLACRES, Victor. Bioactividad de plantas amazónicas. Quito : Abya-Yala, 1995. 378 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO 42.43 Resolution. Geneva : WHO, 1989.

ZDERO, C.; BOHLMAN, F.; SOLOMON, J.C.; KING, R.M. and ROBINSON, H. *ent-clerodanes* and other constituents from bolivian *Baccharis* species. En : Phytochemistry. Vol. 28, No. 2 (1989); p. 531-542.

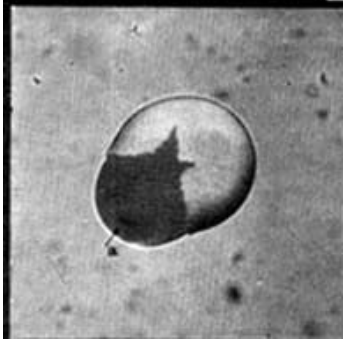
ZIEF, Morris and KISER, Ruthann. Solid Phase Extraction for Sample Preparation. Phillisburg, New Jersey : J.T. Baker, 2000. 54p.

ANEXO A. Distribución tropandina de *Baccharis latifolia*.



Fuente: Cuatrecasas, 1968.

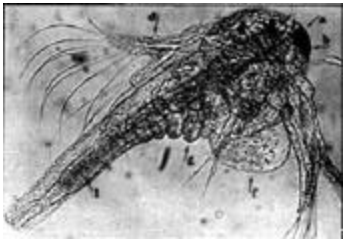
ANEXO B. Microfotografías de algunos estados de desarrollo de *Artemia salina*.



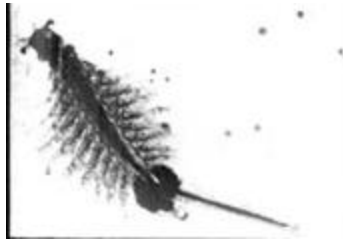
Quiste en fase de ruptura ("breaking stage").



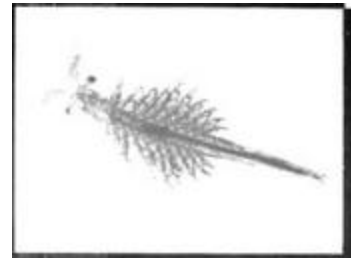
Embrión en estado de "Umbrella" (parte superior Derecha) y nauplios estado I (parte inferior)



Larva estado V



Hembra adulta



Macho adulto

Fuente: FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. FAO. Manual para el cultivo y uso de *Artemia salina* en acuicultura. (Abril 20 de 2004).

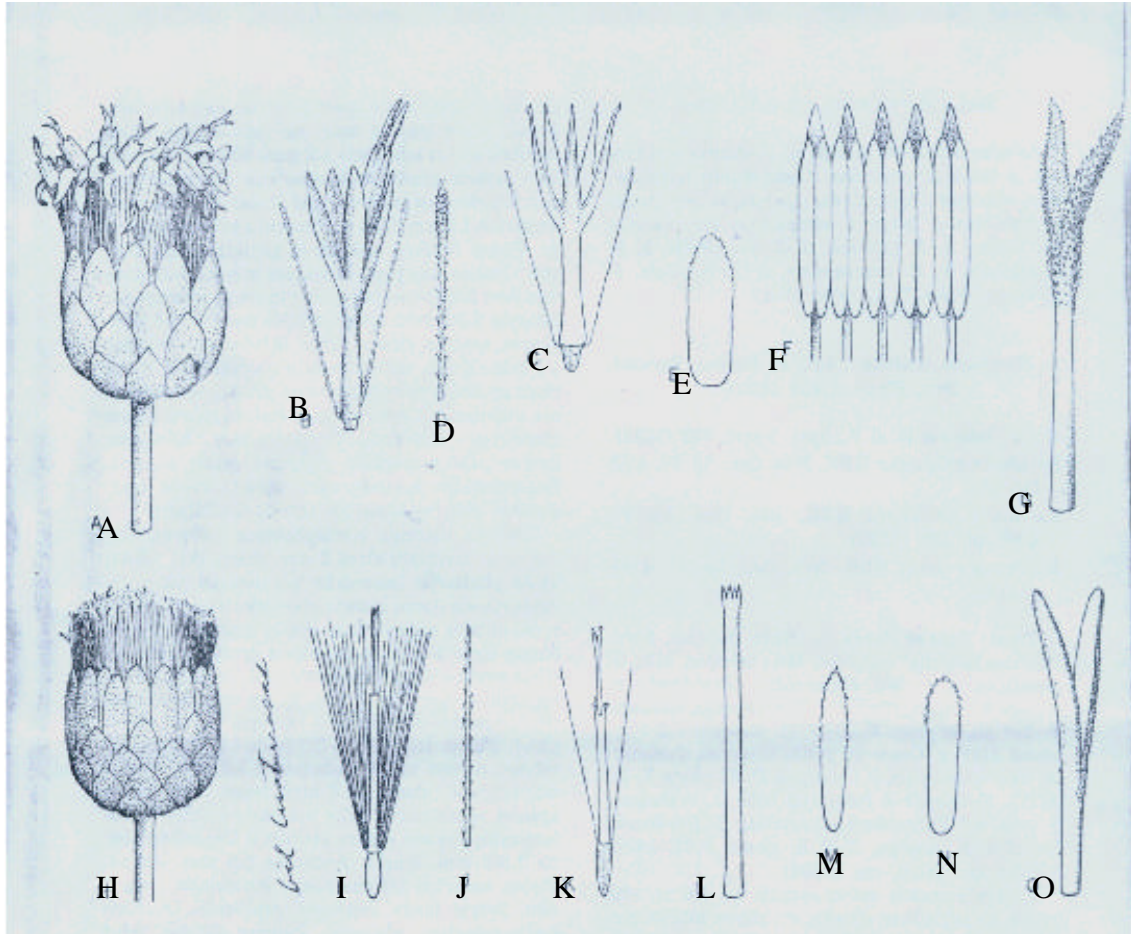
www.fao.org/drocep/field/003/AB474S/AB474S02.htm

ANEXO C. Condiciones ambientales de los sitios donde se tomaron las muestras de *Baccharis latifolia*.

Sitio de muestreo	Calambuco, Jamondino y Corponariño- Finca Lope de Vega	La laguna	Universidad de Nariño Torobajo
Estación meteorológica más cercana	Botana	Wilquipamba	Obonuco
Periodo (años)	1979-2004	1990-2004	1953-2004
Latitud	01° 09' 35,9''	0,1° 11' 52,8''	0,1° 11' 53,6''
Longitud	77° 16' 43,7''	77° 11' 33''	77° 18' 11,2''
Altitud m.s.n.m	2805	2935	2780
Precipitación promedio mm	907,9	1297,1	768,2
Evaporación mm/año	931,7	973,9	1013,9
Humedad relativa %	78	----	77
Temperatura °C	Maxima : 19,3 Media : 12,3 Mínima : 6,1	----	Maxima : 19,9 Media : 13,1 Mínima : 6,6
Brillo solar horas/año	1220,7	----	1158,5

Fuente. IDEAM

ANEXO D. Figuras comparativas entre capítulos y flores de *B. latifolia*.



Baccharis latifolia: A, capítulo masculino (Cuatr. 18690), x 6; B, flor masculina, x 10; C, corola masculina, x 10; D, pelo del vilano masculino, aumentado; E, filaria interior, x 6; F, androceo abierto, extendido, x 20; G, estilo de flor pseudohermafrodita, x 50; H, capítulo femenino (Cuatr. 20012), x 6; I, flor femenina x 15; J, pelo del vilano aumentado; K, flor, mas esquematica, x 10; L, corola femenina x 30; M y N, filarias interiores, x 6; O, ramas estilares de flor femenina, x 50. (Cuatrecasas,1967)

Inflorescencia de *Baccharis latifolia* hembra



Inflorescencia de *Baccharis latifolia* macho



Fuente : Cuatrecasas, 1967

ANEXO F. Determinación del peso seco de las hojas y cogollos de *Baccharis latifolia*.

Material	Muestra	Peso fresco(g)	Peso seco (g)	Peso seco %	Humedad%
<i>B .latifolia</i> hembra	1	30,36	11,49	34,44	65,56
	2	33,43	11,45	34,55	65,45
	3	33,45	11,69	34,95	65,05
	4	33,48	11,83	35,33	64,67
	5	20,23	8,08	39,94	60,06
Promedio				35,84	64,16
Cogollos de <i>B. latifolia</i>	1	30,48	11,46	34,23	65,77
Promedio				35,04	64,97

ANEXO G. Análisis probit de la actividad biológica BST del extracto crudo acuoso de *B. latifolia*.

ENSAYO I

Tabla general de Análisis

n	Dosis (ppm)	Mort corr %	Probit	Total de individuos	Mortalidad	Mortalidad esperada	Contribución $\frac{1}{n^2}$
1	32,0000	0,0	/	11	0	0,65	0,6925
2	100,0000	7,7	3,573661	13	1	1,64	0,2892
3	100,0000	25,0	4,325811	12	3	1,52	1,562
4	100,0000	27,3	4,395766	11	3	1,39	2,1284
5	319,9998	0,0	/	10	0	2,37	3,1057
6	319,9998	18,2	4,09165	11	2	2,61	0,1850
7	319,9998	18,2	4,09165	11	2	2,61	0,1850
8	1000,0000	41,7	4,789954	12	5	4,59	0,0579
9	1000,0000	25,0	4,325811	8	2	3,06	0,5980
10	1000,0000	54,5	5,113924	11	6	4,21	1,2302
11	1000,0000	50,0	5	10	5	3,83	0,5803
12	4000,0020	40,0	4,747067	10	4	5,84	1,3862
13	4000,0020	83,3	5,967363	12	10	7,00	3,0810
14	4000,0020	44,4	4,860591	9	4	5,25	0,7165
15	4000,0020	54,5	5,113924	11	6	6,42	0,0657

Mortalidad en el control: 0%

Number of interacciones: 3

$p(\chi^2 = 15,95797, df = 13) = 0,7485922$; $p < 0,95$ Se acepta H_0 , los datos están bien representados por el modelo.

Parámetros de la línea de cómputo

Línea de regresión: $y = A + \text{pendiente}^*(x - M)$

$A = 4,596492 \pm 0,1083179$ $4,488174 < A < 4,70481$

$\text{Pendiente} = 0,8451929 \pm 0,175385$ $0,669808 < \text{pendiente} < 1,020578$

$M = 12,87504$

Heterogeneidad = 1

LC	Valor	Nivel de confianza	Rango
2	8,35643	0,95	$0,34755 < LC < 33,59110$
50	2251,42800	0,95	$1220,59800 < LC < 6430,26100$
90	73952,18000	0,95	$17934,23000 < LC < 1893544,00000$
95	199071,60000	0,95	$36801,15000 < LC < 9914325,00000$
98	606590,50000	0,95	$82198,49000 < LC < 64194630,00000$

ENSAYO II

Tabla general de Análisis

n	Dosis (ppm)	Mort corr %	Probit	Total de individuos	Mortalidad	Mortalidad esperada	Contribución χ^2
1	32,0000	0,0	/	10	0	0,39	0,4016
2	32,0000	9,1	3,664612	11	1	0,42	0,8104
3	100,0000	0,0	/	12	0	1,26	1,4053
4	100,0000	0,0	/	9	0	0,94	1,0540
5	100,0000	9,1	3,664612	11	1	1,15	0,0227
6	100,0000	0,0	/	11	0	1,15	1,2882
7	319,9998	33,3	4,569709	12	4	2,79	0,6860
8	319,9998	45,5	4,886077	11	5	2,56	3,0445
9	319,9998	25,0	4,325811	12	3	2,79	0,0209
10	1000,000	80,0	5,841457	10	8	4,14	6,1590
11	1000,000	36,4	4,651688	11	4	4,55	0,1129
12	1000,000	27,3	4,395766	11	3	4,55	0,8991
13	1000,000	50,0	5	12	6	4,96	0,3701
14	4000,0020	57,1	5,17966	14	8	9,20	0,4586
15	4000,0020	63,6	5,348312	11	7	7,23	0,0215
16	4000,0020	77,8	5,764481	9	7	5,92	0,5797
17	4000,0020	40,0	4,747067	10	4	6,57	2,9398

Mortalidad en el control: 0%

Number of interacciones: 4

$p(\chi^2 = 20,2742, df = 15) = 0,838335$; se acepta H_0 , los datos están bien representados por el modelo.

Parámetros de la línea de computo

Línea de Regresión: $y = A + \text{pendiente} \cdot (x - M)$

$A = 4,620131 \pm 0,10466$ $4,515471 < A < 4,724791$

$\text{pendiente} = 1,036065 \pm 0,1671102$ $0,8689547 < \text{pendiente} < 1,203175$

$M = 12,84426$

Heterogeneidad = 1

LC	Valor	Nivel de Confianza	Rango
2	16,91312	0,95	$2,76977 < LC < 45,08249$
50	1625,20100	0,95	$1014,20000 < LC < 3143,16400$
90	28055,62000	0,95	$10590,62000 < LC < 169192,20000$
95	62928,76000	0,95	$19851,71000 < LC < 543642,10000$
98	156167,10000	0,95	$40055,93000 < LC < 2031708,00000$

ENSAYO III

Tabla general de análisis

n	Dosis (ppm)	Mort corr %	Probit	Total de individuos	Mortalidad	Mortalidad esperada	Contribución \div^2
1	100,0000	7,5	3,567059	10	1	0,46	1,5280
2	100,0000	0,0	/	10	0	0,46	1,1044
3	319,9998	6,6	3,498423	11	1	1,89	0,5706
4	319,9998	6,6	3,498423	11	1	1,89	0,5706
5	319,9998	17,8	4,079556	10	2	1,72	0,0617
6	1000,0000	65,7	5,40594	12	8	5,99	1,3499
7	1000,0000	62,6	5,322571	11	7	5,49	0,8305
8	1000,0000	42,9	4,822994	9	4	4,49	0,1074
9	2000,0010	76,3	5,715947	13	10	9,42	0,1291
10	2000,0010	90,7	6,320691	11	10	7,97	0,0000 p
11	2000,0010	28,1	4,421426	10	3	7,24	1,1655 p

Mortalidad en el control: 2,5 %

Estimación de la mortalidad natural: 2,7 %

Number of interacciones: 4

1 points were pooled together.

$p(\text{CHI}^2 = 7,417914, \text{df} = 8) = 0,5077127$; Se acepta H_0 , los datos están bien representados por el modelo.

Parámetros de la línea de Computo

Línea de Regresión: $y = A + \text{pendiente} \cdot (x - M)$

$A = 4,91538 \pm 0,1407382$ $4,774642 < A < 5,056118$

$\text{Pendiente} = 2,027249 \pm 0,4261242$ $1,601125 < \text{Pendiente} < 2,453374$

$M = 12,97664$

Heterogeneidad = 1

LC	Valor	Nivel de Confianza	Rango
2	101,17910	0,95	$19,95798 < LC < 204,87100$
50	1043,22800	0,95	$751,48990 < LC < 1506,46600$
90	4473,30900	0,95	$2641,83400 < LC < 6284,7730000$
95	6759,70200	0,95	$3590,12000 < LC < 9969,2840000$
98	10756,42000	0,95	$5042,12500 < LC < 16469,7230000$

ANEXO H. Determinación de los valores f y de la desviación típica de cada uno de los ensayos

Calculo de f a partir de los datos en escala transformada y en escala original

Muestra	Limite	CL ₅₀	Escala transformada			Antilog S (prom)	Escala original	
			Log CL ₅₀	S	S (prom)		(L _s /L _i)=f	Log f
ExtCrud1 E1	Media	2251,428	3,35246					
	L _s	1220,598	3,08657	0,26598				
	L _i	6430,261	3,80823	0,45577	0,36083	2,29525	2,29524	0,36083
ExtCrud2 E2	Media	1625,20100	3,21085					
	L _s	1014,20000	3,00612	0,20473				
	L _i	3143,16400	3,49737	0,28652	0,245625	1,760455	1,760442	0,245622
ExtCrud3 E3	Media	1043,27600	3,01840					
	L _s	781,70750	2,89304	0,12536				
	L _i	1454,21600	3,16263	0,14423	0,134795	1,363939	1,363931	0,134792
Spe-MeOH 1 M1	Media	2579,934	3,41160					
	L _s	1828,261	3,26204	0,14956				
	L _i	3598,400	3,55611	0,14451	0,147035	1,40293	1,40293	0,147036
Spe-MeOH 2 M2	Media	3578,92700	3,55375					
	L _s	1907,04100	3,28036	0,27339				
	L _i	23661,46000	4,37404	0,82029	0,54684	3,52241	3,52242	0,54684
E	Media	1562,78800	3,19390				1,76636	0,24708
	L _s	2760,44621						
	L _i	884,75056						
M	Media	3038,61000	3,48267				2,22294	0,346938
	L _s	6574,79964						
	L _i	1366,90224						

E₁: extracto crudo acuoso 1 E₂: extracto crudo acuoso 2 E₃: extracto crudo acuoso 3

M₁: MEOH SPE- ODS 1 M₂: MEOH SPE-ODS 2

E: CL₅₀ promedio extracto crudo

M: CL₅₀ promedio fracción MeOH SPE-ODS

CL_{50s}: CL₅₀ superior

CL_{50i}: CL₅₀ inferior

S: desviación típica

L_s: limite superior CL₅₀

L_i: limite inferior CL₅₀

Obsérvese en la tabla anterior el cálculo de las desviaciones típicas para cada una de los ensayos a partir de los datos de los intervalos de confianza de la CL₅₀ obtenidos por el programa Probit. Para efectos de comparación se muestra el cálculo a partir de los datos en la escala original y en la escala transformada, asumiendo en ambos casos intervalos de confianza simétricos. La CL₅₀ promedio se calculo a partir de los valores transformados de

las concentraciones (Log CL₅₀), al igual que el intervalo de confianza promedio se calculo a partir de los valores transformados de los intervalos de confianza (S).

Calculo de la significancia de la diferencia entre las CL₅₀ (DSM, o f_{1,2})

CL _{50s} /CL _{50i}	VALOR	$f_{s,i} = \text{antilog } ((\log f_s)^2 + (\log f_i)^2)$	Observaciones
E₁/E₂	1,38532	antilog $((0,36083)^2 + (0,245622)^2)$	1,38532 < 2,73211 NS
E₁/E₃	2,15804	antilog $((0,36083)^2 + (0,134791)^2)$	2,15804 < 2,42766 NS
E₂/E₃	1,55779	antilog $((0,245625)^2 + (0,13479)^2)$	1,55779 < 1,90624 NS
M₂/M₁	1,38722	antilog $((0,54684)^2 + (0,147036)^2)$	1,38722 < 3,68349 NS
E / M	1,94435	antilog $((0,12037)^2 + (0,06105)^2)$	1,94435 < 2,66646 NS

E₁: CL₅₀ extracto crudo acuoso 1; E₂: extracto crudo acuoso 2 E₃: extracto crudo acuoso 3

M₁: MeOH SPE- ODS 1 M₂: MeOH SPE-ODS 2

E: CL₅₀ promedio extracto crudo

M: CL₅₀ promedio fracción MeOH SPE-ODS

NS: Diferencias No Significativas

CL_{50s}: CL₅₀ superior

CL_{50i}: CL₅₀ inferior

ANEXO I. Análisis probit de la actividad biológica BST de la fracción MeOH SPE-ODS del extracto crudo acuoso de *B. latifolia*.

ENSAYO I

Tabla general de análisis

n	Dosis (ppm)	Mort corr %	Probit	Total de individuos	Mortalidad	Mortalidad esperada	Contribución χ^2
1	319,9998	10,0	3,718271	10	1	1,50	0,1955
2	319,9998	25,0	4,325811	12	3	1,80	0,9433
3	319,9998	0,0	/	13	0	1,95	2,2925
4	319,9998	30,0	4,475998	10	3	1,50	1,7676
5	1000,0000	36,4	4,651688	11	4	3,21	0,2728
6	1000,0000	0,0	/	12	0	3,50	4,9498
7	1000,0000	45,5	4,886077	11	5	3,21	1,4052
8	1000,0000	33,3	4,569709	9	3	2,63	0,0743
9	3199,9980	45,5	4,886077	11	5	5,29	0,0304
10	3199,9980	44,4	4,860591	9	4	4,33	0,0477
11	3199,9980	45,5	4,886077	11	5	5,29	0,0304
12	3199,9980	60,0	5,252934	10	6	4,81	0,5689

Mortalidad en el control: 0%

Number of interacciones: 3

$p(\chi^2 = 12,57862, df = 10) = 0,751804$; Se acepta H_0 , los datos están bien representados por el modelo.

Parámetros de la línea de cómputo

Línea de Regresión: $y = A + \text{pendiente}^* (x - M)$

$A = 4,504587 \pm 0,1197024$ $4,384885 < A < 4,624289$

$\text{Pendiente} = 0,9888468 \pm 0,2993688$ $0,689478 < \text{pendiente} < 1,288215$

$M = 13,05275$

Heterogeneidad=1

LC	Valor	Nivel de Confianza	Rango
2	29,94986	0,95	$0,13748 < LC < 124,10170$
50	3578,92700	0,95	$1907,04100 < LC < 23661,46000$
90	70784,46000	0,95	$14251,14000 < LC < 32199580,00000$
95	165013,60000	0,95	$24480,51000 < LC < 256622100,00000$
98	427672,30000	0,95	$44846,22000 < LC < 2661048000,00000$

ENSAYO II

Tabla general de Análisis

n	Dosis (ppm)	Mort corr %	Probit	Total de individuos	Mortalidad	Mortalidad esperada	Contribución χ^2
1	319,9998	8,5	3,618695	11	1	2,08	0,7112
2	319,9998	8,5	3,618695	11	1	2,08	0,7112
3	319,9998	7,7	3,56718	12	1	2,27	0,8996
4	319,9998	22,6	4,243517	13	3	2,46	0,1474
5	319,9998	0,0	/	14	0	2,65	3,3442
6	319,9998	0,0	/	13	0	2,46	3,1053
7	1000,0000	49,7	4,989993	10	5	3,46	1,0579
8	1000,0000	61,3	5,284901	13	8	4,49	4,2026
9	1000,0000	32,9	4,554974	12	4	4,15	0,0082
10	1000,0000	54,3	5,10476	11	6	3,80	1,9507
11	1000,0000	36,0	4,638081	11	4	3,80	0,0156
12	1000,0000	54,3	5,10476	11	6	3,80	1,9507
13	3199,9980	58,1	5,20151	12	7	6,48	0,0908
14	3199,9980	54,3	5,10476	11	6	5,94	0,0013
15	3199,9980	69,8	5,5171.2	10	7	5,40	1,0302
16	3199,9980	53,5	5,087042	13	7	7,02	0,0001
17	3199,9980	61,3	5,284901	13	8	7,02	0,2975
18	3199,9980	54,3	5,10476	11	6	5,94	0,0013
19	3199,9980	61,3	5,284901	13	8	7,02	0,2975
20	10000,0000	76,8	5,729998	13	10	9,39	0,1434
21	10000,0000	66,5	5,422961	12	8	8,66	0,1829
22	10000,0000	58,1	5,20151	12	7	8,66	1,1467
23	10000,0000	63,4	5,340566	11	7	7,94	0,4012
24	10000,0000	79,9	5,835745	10	8	7,22	0,3013
25	10000,0000	74,8	5,667898	12	9	8,66	0,0464
26	10000,0000	54,3	5,10476	11	6	7,94	1,7033
27	40000,0500	91,6	6,78891	12	11	10,58	0,1380
28	40000,500	81,7	5,902845	11	9	9,70	0,4276
29	40000,0500	90,9	6,33095	11	10	9,70	0,0773
30	40000,0500	100,0	/	10	10	8,82	1,3308
31	40000,0500	66,5	5,422961	12	8	10,58	5,3141

Mortalidad en el control: 0,6944445%

Estimación de la mortalidad natural: 6%

Numero de interacciones: 3

$p(\chi^2 = 31,03642, df = 29) = 0,6362888$; se acepta H_0 , los datos están bien representados por el modelo.

Parámetros de la línea de cómputo

Línea de regresión: $y = A + \text{pendiente}^*(x - M)$

$A = 5,048669 \pm 0,0722524$ $4,976417 < A < 5,120921$

$\text{Pendiente} = 0,9920698 \pm 0,1120357$ $0,8800341 < \text{pendiente} < 1,104105$

$M = 13,46067$

$\text{Varianza of the } CL_{50} = 5,334897e^{-0,3}$

Heterogeneidad=1

LC	Valor	Nivel de Confianza	Rango
2	21,92803	0,95	$5,20109 < LC < 55,83018$
50	2579,93400	0,95	$1828,26100 < LC < 3598,40000$
90	50533,90000	0,95	$27739,57000 < LC < 123737,50000$
95	117481,90000	0,95	$56281,11000 < LC < 359648,10000$
98	303541,20000	0,95	$123926,00000 < LC < 1202735,00000$

ANEXO J. Datos calculados por el programa PROBIT para la elaboración de las curvas log-dosis probit-respuesta, y log-dosis mortalidad-respuesta.

% Mortalidad	Probit	Concentración Ext.crud 1	Concentración Ext.crud 2	Concentración Ext.crud3	Concentración SPE MEOH 1	Concentración SPE MEOH 2
2	2,95	8,35643	16.91312	121,90530	29.94986	21.92803
50	5	2251,42800	1625.20100	1043,27600	3578.92700	2579.93400
90	6,28	73952,18000	28055.62000	3982,58100	70784.46000	50533.90000
95	6,64	199071,60000	62928.76000	5822,97900	165013.60000	117481.90000
98	7,05	606590,50000	156167.10000	8928,45100	427672.30000	303541.20000

ANEXO K. Presentación de un programa básico de análisis log-probit para un microordenador.

Traducción del original en francés *Probit Analysis Program. March 1987 version.*
Laboratoire de génétique. Institut des Sciences de l'Evolution, U.S.T.L. Place E. Bataillon,
34060, Montpellier, France.

Michael Rymond

El análisis estadístico de las pruebas insecticidas necesita de los cálculos log-probi, método que es difícil de tratar manualmente. Hemos desarrollado un conjunto de programas en Microsoft Basic, Nivel IV, funcionando sobre el micro-ordenador TandyTRS-80, modelo III o IV y fácilmente adaptable a cualquier tipo de computador. Se describen las diferentes etapas del programa principal y los resultados de este.

Palabras clave: Probit- informática- prueba biológica-estadística.

Resumen

El análisis estadístico de las pruebas insecticidas, o más generalmente de todas las pruebas siguiendo la ley del "todo o nada" (respuesta cuantal), ha sido objeto de un completo estudio en la obra de Finney (1971). Ello implica, sin embargo, una gran cantidad de cálculos fastidiosos que es posible en cambio realizar rápidamente gracias a un tratamiento informático. Presentamos aquí las principales etapas de un programa que efectúa rápidamente la mayor parte de los cálculos del análisis log-probit y damos algunos ejemplos de sus capacidades.

Después de la puesta en el registro de los resultados sin depurar de las pruebas insecticidas bajo la forma de una tabla (Tabla 1), incluyendo el número de muertes observadas en cada concentración, el número total de individuos evaluados y la dosis del insecticida correspondiente, el programa principal calcula:

- La mortalidad relativa a cada concentración, corregida en función de la mortalidad observada en los testigos, según la fórmula de Abbott (1925).

$$M = \frac{M^* - C}{1 - C}$$

Donde M* es la mortalidad observada en la concentración considerada. C es la mortalidad observada en el lote testigo y M la mortalidad corregida;

- La mejor línea de regresión ponderada de la mortalidad sobre la dosis. Este cálculo comprende en orden:
 - a) La transformación en probit de cada mortalidad
 - b) La transformación eventual de la dosis en unida logarítmica arbitraria
 - c) El cálculo de la línea de regresión no ponderada
 - d) El cálculo de la mejor línea de regresión ponderada por interacciones sucesivas.

Así a partir de los datos presentados en la Tabla 1, las características de las diferentes líneas de regresión obtenidas a partir de la interacción son:

Línea de regresión no ponderada

$$y = 4,89681 + 8,12961 * (x - 7,20167)$$

Línea de regresión ponderada:

$$y = 4,8804 + 8,91393 * (x - 7,20258)$$

- Una vez la línea de regresión es calculada, las mortalidades observadas son comparadas con las mortalidades esperadas según una prueba de χ^2 , siguiendo la fórmula (Finney, 1971, p. 66):

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^N \frac{(r_j - n_j * P_j)^2}{n_j * P_j * (1 - P_j)}$$

donde N es el numero de concentraciones evaluadas y donde r_j , para el j punto, r_j es el número de muertes observadas entre los n_j individuos evaluados, y P_j la mortalidad esperada. Esta comparación permite verificar que la ecuación (línea) obtenida representa correctamente los datos.

Si este el caso como en el ejemplo tratado en la tabla 1 ($\chi^2 = 9,9756$ para 6 ddl $P > 0,12$), la DL_{50} así como sus límites de confianza, y eventualmente, de otros DL (Tabla II), se calculan de acuerdo a la fórmula exacta (Finney, 1971, p. 79):

$$DL_x = m + \frac{g * (m - \bar{x})}{b * (1 - g)} \pm \frac{t}{b * (1 - g)} * \sqrt{\left(\frac{1-g}{S_{nw}} + \frac{(m - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right) * H}$$

Donde b es la pendiente de la ecuación; H, el factor de heterogeneidad (ver más abajo), \bar{x} , la mediana ponderada de las abscisas, S_{nw} la suma de los pesos, S_{xx} la varianza ponderada de las abscisas, t el valor de la distribución de student correspondiente al nivel de confianza elegido y el número de grados de libertad (ddl = ∞ si H = 1) y m la abscisa correspondiente a x% de mortalidad.

El cálculo de la varianza de los puntos de la línea de regresión y de los límites de confianza de las mortalidades esperadas (Finney, 1971, p. 76) permite ver si los puntos experimentales son bastante compatibles con la línea de regresión con un grado de confianza elegido (Tabla III).

Si la prueba del χ^2 rechaza la hipótesis de la buena representación de los datos por la línea de regresión, se puede realizar un reagrupamiento de los valores observados y esperados de las mortalidades de los puntos extremos, a fin de disminuir su contribución a χ^2 (Finney, 1971, p. 73), o el cálculo del índice de heterogeneidad, $H = \chi^2/ddl$ (Finney, 1971, p. 70-72), que intervendrá entonces en los cálculos de los DL y del intervalo de confianza de las mortalidades. El valor del χ^2 correspondiente a la línea de regresión obtenida para la prueba insecticida presentada en la tabla IV es muy elevado ($\chi^2 = 944$ para 2ddl, $P < 0,0001$).

El punto número 1 contribuye fuertemente al χ^2 dado el valor muy débil esperado del número de muertes. El reagrupamiento de este punto con el punto siguiente (señalado por la letra R, tabla V) restituye el χ^2 igual a 2,278 para 1ddl; no rechaza más la hipótesis que la línea representa bien los datos.

Tabla 1. Resultado de una prueba insecticida. Una cepa del mosquito *Culex pipiens L.* ha sido evaluado para buscar su sensibilidad a los clorpirifos (Dursban). Para cada dosis de insecticida se revela el número de muertos y el total de individuos que han sido empleados en cada dosis.

Muerte	Total	Dosis
1	80	0,0010
4	80	0,0012
23	120	0,0014
49	140	0,0016
72	120	0,0018
109	160	0,0020
85	100	0,0025
120	120	0,0030
20	26	0,0100

Tabla II. Dosis letales y límites de confianza: para cada nivel de mortalidad elegido; aquí 50, 80 y 90. La dosis letal (DL) correspondiente se calcula así como los límites de confianza deseados para cada DL. Las dosis están en ppm

DL	Nivel de confianza	Límites de confianza de la DL
50	0,95	0,00172 – 0,00161
90	0,95	0,00235 – 0,00258
50	0,98	0,00171 – 0,00162
50	0,999	0,00169 – 0,00185
80	0,95	0,00212 – 0,00226

Tabla III. La prueba de compatibilidad de los puntos respecto de la línea de regresión: para cada punto de la línea (derecha), el cálculo de la varianza permite determinar un valor mínimo y superior (máximo), después de acuerdo al nivel de confianza acordado (aquí 98%). Si la mortalidad observada no está contenida en estos límites, la prueba rechaza el punto. Los puntos número 5 y 7 pueden ser rechazados, con o más de dos oportunidades (sobre 100) de errar para cada uno de ellos. Los puntos extremos (0 y 100 %) de la mortalidad no son tomados en cuenta para esta prueba.

n	dosis	Minimo	Mortalidad	Maximo	Test
1	0,0010	0,46949	0,5	2,90754	
2	0,0012	3,81396	4,3	10,175	
3	0,0014	13,6753	18,6	23,0663	
4	0,0016	30,0109	34,5	39,8518	
5	0,0018	48,0594	59,7	57,6854	
6	0,0020	63,5911	67,9	73,4482	
7	0,0025	87,1717	64,9	94,4627	

Tabla IV. Contribución a χ^2 de cada punto. Resultado del análisis de una prueba de sensibilidad a los clorpirifos sobre la cepa 5S de *Culex pipiens L.* Los datos provienen de Pasteur y Sinègre (1978). El valor esperado del primer punto explica su fuerte contribución a χ^2 total. $P(\chi^2 < 943,776; \text{ddl} = 2) = 1$

Dosis	Mortalidad	Probit	Total	Mortalidad observada	Mortalidad Corregida	Contribución χ^2
0,003	1	2,67321	100	1	0,00105	940,552
0,006	6	3,4449	100	6	10,558	2,20997
0,012	98	7,05419	100	98	96,039	1,01469
0,024	100	7,57624	100	100	99,99	9,9474 e ⁻⁵

Tabla V. La distribución a χ^2 de cada punto después del reagrupamiento de los dos primeros puntos de la tabla IV. El segundo análisis de los resultados de Pasteur y Sinègre (1978) sobre el *Culex pipiens L.* después del reagrupamiento de los dos primeros puntos el χ^2 no es más significativo: no se rechaza más la hipótesis de que la línea de regresión representa bien los datos. $P(\chi^2 < 2,2777; \text{ddl} = 1) = 0,8687$

Dosis	Mortalidad	Probit	Total	Mortalidad observada	Mortalidad Corregida	Contribución χ^2
0,003	1	2,67321	100	1	0,00105	0 R
0,006	6	3,4449	100	6	10,558	1,27421 R
0,012	98	7,05419	100	98	96,039	1,01469
0,024	100	7,57624	100	100	99,99	9,9474 e ⁻⁵