

Te
UVH
Qui
a 722
1986

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE FRACCIONES
DEL HELECHO ACUATICO *Salvinia auriculata* QUE
PRESENTAN ACTIVIDAD LARVICIDA SOBRE
ZANCUDOS *Anopheles albimanus*

L. J. A.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE FRACCIONES
DEL HELECHO ACUATICO *Salvinia auriculata* QUE
PRESENTAN ACTIVIDAD LARVICIDA SOBRE
ZANCUDOS *Anopheles albimanus*

EDGAR E. ARCIA MORALES

Trabajo de investigación presentado
para optar al grado académico de

Licenciado en Química

Guatemala

1988

Vo. Bo. :

(f) Juan de Dios Calle

Dr. Juan de Dios Calle
Asesor

Tribunal:

(f) Juan de Dios Calle

Dr. Juan de Dios Calle

(f) Margaret Dix

Dra. Margaret Dix

(f) Margarita Selle

Licda. Margarita Selle

Fecha de aprobación: 21 de abril de 1988.

A mi madre,
A mi esposa,
A mi hijo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al financiamiento otorgado por The National Academy of Sciences de los Estados Unidos de América, al Proyecto Salvinia dirigido por la Dra. Margaret Dix en la Universidad del Valle de Guatemala.

Agradezco a todos los miembros del grupo que han trabajado en el proyecto Salvinia su invaluable ayuda; especialmente a Milena Montúfar y Maria Olga Menéndez el haber realizado los bioensayos para el presente trabajo. Asimismo a la Ing. Lilian Paiz, Lic. Margarita Selle, Dra. Margaret Dix, Dr. Juan de Dios Calle y Dr. William S. Bowers, la orientación que en su oportunidad me brindaron.

INDICE

	Páginas
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	5
A. Malaria	5
B. Control de la malaria	5
1. Control con insecticidas	6
2. Control biológico	9
C. <i>Salvinia auriculata</i>	12
1. Descripción botánica	12
2. Estudios realizados	14
D. Cromatografía	16
1. Cromatografía en columna	18
2. Cromatografía en capa fina	19
3. Mecanismo de separación	21
4. Adsorbentes	22
5. Fase móvil	22
III. OBJETIVOS	25
IV. TRABAJO EXPERIMENTAL	27
A. Recolección, preparación y extracción de <i>Salvinia auriculata</i>	27
1. Recolección y procesamiento	27
2. Extracción	28
B. Ensayo biológico del extracto crudo y las fracciones	29
C. Fraccionamiento de los extractos crudos de raíz y de hoja en pequeña escala	32

D.	Fraccionamiento de los extractos crudos de raíz y de hoja en escala grande	38
1.	Primera etapa	38
2.	Segunda etapa	39
3.	Tercera etapa	40
4.	Cuarta etapa	41
E.	Tratamiento estadístico de los da- tos de los bioensayos	46
1.	Análisis de varianza	47
2.	Prueba de Student-Newman-Keuls	48
V.	RESULTADOS	51
A.	Extractos crudos	51
1.	Obtención	51
2.	Proporción letal media (LC-50)	51
3.	Comparación de actividad de los extractos	53
B.	Fraccionamiento preliminar en pe- queña escala de los extractos crudos de raíz y hoja	57
1.	Primera etapa de fracciona- miento de los extractos crudos	57
a.	Fracciones del extracto de raíz	57
b.	Fracciones del extracto de hoja	61
c.	Comparación de fracciones del extracto de raíz y de hoja	66
2.	Segunda etapa de fracciona- miento de los extractos crudos	67
a.	Fracciones del extracto de raíz	67
b.	Fracciones del extracto de hoja	71
c.	Comparación de fracciones del extracto de raíz y de hoja	76

	Páginas
C. Fraccionamiento de los extractos crudos de raíz y de hoja en escala grande	80
1. Primera etapa de fracciona- miento de los extractos	81
2. Segunda etapa de fracciona- miento de los extractos	83
a. Subfracciones del extrac- to de raíz	83
b. Subfracciones del extrac- to de hoja	87
3. Tercera etapa de fraccionamien- to del extracto de hoja	88
4. Cuarta etapa de fraccionamien- to del extracto de hoja	94
VI. DISCUSION	109
A. Extractos crudos	109
B. Fraccionamiento preliminar	110
C. Fraccionamiento en escala grande	112
VII. CONCLUSIONES	121
VIII. RECOMENDACIONES	123
IX. BIBLIOGRAFIA	125
APENDICES	
A. Datos crudos de los bioensayos	131
B. Transformación probit	145
C. Programa de computadora para hacer el análisis probit	157
D. Variación de los parámetros esti- mados en el análisis probit	179

	Páginas
E. Análisis de varianza y comparaciones <i>a posteriori</i> de los extractos crudos y las fracciones	183
F. Placas de cromatografía en capa fina	191

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Valor elutrópico de solventes comunes utilizados en cromatografía en columna	23
2	Mortandad de larvas de <i>A. albimanus</i> al cuarto día de exposición a extractos crudos de raíz, hoja, y planta entera de <i>S. auriculata</i>	52
3	Mortandad cumulativa corregida de larvas de <i>A. albimanus</i> expuestas a fracciones preliminares del extracto crudo de raíz, de <i>S. auriculata</i>	58
4	Componentes de las fracciones preliminares del extracto crudo de raíz de <i>S. auriculata</i> observados en los cromatogramas en capa fina	61
5	Mortandad cumulativa corregida de larvas de <i>A. albimanus</i> expuestas a fracciones preliminares del extracto crudo de hoja de <i>S. auriculata</i>	63
6	Componentes de las fracciones preliminares del extracto crudo de hoja de <i>S. auriculata</i> observados en los cromatogramas en capa fina	66
7	Mortandad cumulativa corregida de larvas de <i>A. albimanus</i> expuestas a subfracciones preliminares de raíz de <i>S. auriculata</i>	70
8	Componentes observadas con los cromatogramas en capa fina de las subfracciones preliminares de raíz de <i>S. auriculata</i>	71
9	Mortandad cumulativa corregida de larvas de <i>A. albimanus</i> expuestas a subfracciones preliminares de hoja de <i>S. auriculata</i>	73

Tabla	Página
10 Componentes de las subfracciones preliminares de hoja de <i>S. auriculata</i> observados en los cromatogramas en capa fina	75
11 Componentes de las fracciones del extracto crudo de raíz de <i>S. auriculata</i> observados en los cromatogramas en capa fina	82
12 Componentes de las fracciones del extracto crudo de hoja de <i>S. auriculata</i> observados en los cromatogramas en capa fina	83
13 Mortandad cumulativa corregida de larvas de <i>A. albimanus</i> expuestas a subfracciones de raíz de <i>S. auriculata</i>	85
14 Componentes de las subfracciones de raíz de <i>S. auriculata</i> observados en los cromatogramas en capa fina	87
15 Componentes de las subfracciones de H-A de <i>S. auriculata</i> observados en los cromatogramas en capa fina	88
16 Mortandad cumulativa corregida de larvas de <i>A. albimanus</i> expuestas a subfracciones de HA-1 de <i>S. auriculata</i>	90
17 Componentes de las subfracciones de HA-1 de <i>S. auriculata</i> observados en los cromatogramas en capa fina	91
18 Mortandad cumulativa corregida de larvas de <i>A. albimanus</i> expuestas a las subfracciones de HA-1.4 de <i>S. auriculata</i>	96
19 Componentes de las subfracciones de HA-1.4 de <i>S. auriculata</i> observados en los cromatogramas en capa fina	98
20 Componentes de las subfracciones HA-1.1, HA-1.4-1 y HA-1.4-2 de <i>S. auriculata</i> observados en los cromatogramas en capa fina	102

Tabla	Página
A.1 Larvas sobrevivientes de <i>A. albimanus</i> expuestas al extracto crudo de raíz de <i>S. auriculata</i>	132
A.2 Larvas sobrevivientes de <i>A. albimanus</i> expuestas al extracto crudo de hoja de <i>S. auriculata</i>	133
A.3 Larvas sobrevivientes de <i>A. albimanus</i> expuestas al extracto crudo de planta entera de <i>S. auriculata</i>	134
A.4 Larvas sobrevivientes de <i>A. albimanus</i> en los controles del bioensayo de los extractos crudos de raíz, de hoja y de planta entera de <i>S. auriculata</i>	135
A.5 Larvas sobrevivientes de <i>A. albimanus</i> expuestas a fracciones preliminares del extracto crudo de raíz de <i>S. auriculata</i>	136
A.6 Larvas sobrevivientes de <i>A. albimanus</i> expuestas a fracciones preliminares del extracto crudo de hoja de <i>S. auriculata</i>	137
A.7 Larvas sobrevivientes de <i>A. albimanus</i> en los controles del bioensayo de fracciones preliminares del extracto crudo de raíz y de hoja de <i>S. auriculata</i>	137
A.8 Larvas sobrevivientes de <i>A. albimanus</i> expuestas a subfracciones preliminares de RA' de <i>S. auriculata</i>	138
A.9 Larvas sobrevivientes de <i>A. albimanus</i> expuestas a subfracciones preliminares de HA' de <i>S. auriculata</i>	138
A.10 Larvas sobrevivientes de <i>A. albimanus</i> en los controles del bioensayo de las subfracciones de R-A' y H-A' de <i>S. auriculata</i>	140

Tabla	Página
A.11 Larvas sobrevivientes de <i>S. auriculata</i> expuestas a subfracciones de HA-1 de <i>S. auriculata</i> y sus controles	141
A.12 Larvas sobrevivientes de <i>A. albimanus</i> expuestas a la subfracción HA-1.4-1 de <i>S. auriculata</i> y sus controles	142
A.13 Larvas sobrevivientes de <i>A. albimanus</i> expuestas a subfracciones HA-1.4-2 y HA-1.4-3 de <i>S. auriculata</i> y sus controles	143
D.1 Parámetros para el análisis probit de la actividad antilarvaria del extracto crudo de raíz de <i>S. auriculata</i> sobre <i>A. albimanus</i>	179
D.2 Parámetros para el análisis probit de la actividad antilarvaria del extracto crudo de hoja de <i>S. auriculata</i> sobre <i>A. albimanus</i>	180
D.3 Parámetros para el análisis probit de la actividad antilarvaria del extracto crudo de planta entera de <i>S. auriculata</i> sobre <i>A. albimanus</i>	181
E.1 Análisis de varianza de la actividad de las fracciones R-A', R-B', R-C', R-D' y R-E' de <i>S. auriculata</i> sobre <i>A. albimanus</i>	183
E.2 Prueba 'a posteriori' para comparación de medias (test de Student-Newman-Keuls) de la actividad de las fracciones R-A', R-B', R-C', R-D' y R-E' de <i>S. auriculata</i> sobre <i>A. albimanus</i>	183
E.3 Análisis de varianza de la actividad de las fracciones H-A', H-B', H-C' y H-D' de <i>S. auriculata</i> sobre <i>A. albimanus</i>	184

Tabla	Página
E.4 Prueba 'a posteriori' para comparación de medias (test de Student-Newman-Keuls) de la actividad de las fracciones H-A', H-B', H-C' y H-D' de <i>S. auriculata</i> sobre <i>A. albimanus</i>	184
E.5 Análisis de varianza de la actividad de las fracciones RA'-1, RA'-2, RA'-3,4 y RA'-5,6 de <i>S. auriculata</i> sobre <i>S. albimanus</i>	185
E.6 Prueba 'a posteriori' para comparación de medias (test de Student-Newman-Keuls) de la actividad de las fracciones RA'-1, RA'-2, RA'-3,4 y RA'-5,6 de <i>S. auriculata</i> sobre <i>A. albimanus</i>	185
E.7 Análisis de varianza de la actividad de las fracciones HA'-1, HA'-2, HA'-3, HA'-4 y HA'-5,6 de <i>S. auriculata</i> sobre <i>A. albimanus</i>	186
E.8 Prueba 'a posteriori' para comparación de medias (test de Student-Newman-Keuls) de la actividad de las fracciones HA'-1, HA'-2, HA'-3, HA'-4 y HA'-5,6 de <i>S. auriculata</i> sobre <i>A. albimanus</i>	186
E.9 Análisis de varianza de la actividad de las fracciones RA-1, RA-2 y RA-3,4 de <i>S. auriculata</i> sobre <i>A. albimanus</i>	187
E.10 Prueba 'a posteriori' para comparación de medias (test de Student-Newman-Keuls) de la actividad de las fracciones RA-1, RA-2 y RA-3,4 de <i>S. auriculata</i> sobre <i>S. auriculata</i>	187
E.11 Análisis de varianza de la actividad de las fracciones HA-1.1, HA-1.2, HA-1.3 y HA-1.4 de <i>S. auriculata</i> sobre <i>A. albimanus</i>	188

Tabla		Página
E.12	Prueba 'a posteriori' para comparación de medias (test de Student-Newman-Keuls) de la actividad de las fracciones HA-1.1, HA-1.2, HA-1.3 y HA-1.4 de <i>S. auriculata</i> sobre <i>A. albimanus</i>	188
E.13	Análisis de varianza de la actividad de las fracciones HA-A.4-1, HA-1.4-2 y HA-1.4-3 de <i>S. auriculata</i> sobre <i>A. albimanus</i>	189
E.14	Prueba 'a posteriori' para comparación de medias (test de Student-Newman-Keuls) de la actividad de las fracciones HA-1.4-1, HA-1.4-2 y HA-1.4-3 de <i>S. auriculata</i> sobre <i>A. auriculata</i>	189

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructuras químicas de algunos insecticidas	7
2	Estructuras químicas de hormonas de muda	11
3	Estructuras químicas de hormonas juveniles	11
4	<i>Salvinia auriculata</i>	12
5	Estructura química de vainillina	20
6	Reacción de vapor de yodo con carbonos insaturados	20
7	Fraccionamiento preliminar, en pequeña escala, del extracto crudo de raíz de <i>S. auriculata</i> .	36
8	Fraccionamiento preliminar, en pequeña escala, del extracto crudo de hoja de <i>S. auriculata</i>	37
9	Fraccionamiento del extracto crudo de raíz de <i>S. auriculata</i> , en escala grande	43
10	Fraccionamiento del extracto crudo de hoja de <i>S. auriculata</i> , en escala grande	44
11	Espectro infrarrojo de la subfracción preliminar RA'-1 de <i>S. auriculata</i>	78
12	Espectro infrarrojo de la subfracción preliminar HA'-1 de <i>S. auriculata</i>	79
13	Espectro infrarrojo de la subfracción HA-1.1 de <i>S. auriculata</i>	93
14	Espectro ¹ H-NMR de la subfracción HA-1.1 de <i>S. auriculata</i>	93
15	Espectro infrarrojo de la subfracción HA-1.4-1 de <i>S. auriculata</i>	103

Figura	Página
16	Espectro infrarrojo de la subfracción HA 1.4 2 de <i>S. auriculata</i> 143
17	Espectro $^1\text{H-NMR}$ de la subfracción HA-1.4-1 de <i>S. auriculata</i> 145
18	Espectro $^1\text{H-NMR}$ de la subfracción HA-1.4-2 de <i>S. auriculata</i> 146
19	Espectro $^1\text{H-NMR}$ de la subfracción HA-1.4-3 de <i>S. auriculata</i> 147
20	Espectro ultravioleta-visible de la subfracción HA-1.4-2 de <i>S. auriculata</i> 148
B.1	Distribución normal y distribución normal acumulada 147
F.1	Placa de cromatografía en capa fina de las subfracciones preliminares de HA'-1 a HA'-6 de <i>S. auriculata</i> ; y de las subfracciones preliminares RA'-1 a RA'-6 de <i>S. auriculata</i> 192
F.2	Placa de cromatografía en capa fina de las subfracciones de RA-1 a RA-4 de <i>S. auriculata</i> 193
F.3	Placa de cromatografía en capa fina de las subfracciones HA-1.1 a HA-1.4 de <i>S. auriculata</i> 194
F.4	Placa de cromatografía en capa fina de las subfracciones de hoja HA-1.4-1 a HA-1.4-3 de <i>S. auriculata</i> 195
F.5	Placa de cromatografía en capa fina de las subfracciones HA-1.1, HA-1.4-1 y HA-1.4-2 de <i>S. auriculata</i> 196

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica		Página
1	Mortandad (en unidades probit) de larvas de <i>A. albimanus</i> al cuarto día de exposición al extracto crudo de raíz de <i>S. auriculata</i> y recta de regresión del Análisis Probit	54
2	Mortandad (en unidades probit) de larvas de <i>A. albimanus</i> al cuarto día de exposición al extracto crudo de hoja de <i>S. auriculata</i> y recta de regresión del Análisis Probit	55
3	Mortandad (en unidades probit) de larvas de <i>A. albimanus</i> al cuarto día de exposición al extracto crudo de planta entera de <i>S. auriculata</i> y recta de regresión del Análisis Probit	56
4	Mortandad corregida de larvas de <i>A. albimanus</i> expuestas a fracciones preliminares del extracto crudo de raíz de <i>S. auriculata</i>	59
5	Mortandad corregida de larvas de <i>A. albimanus</i> expuestas a fracciones preliminares del extracto crudo de hoja de <i>S. auriculata</i>	64
6	Mortandad corregida de larvas de <i>A. albimanus</i> expuestas a subfracciones preliminares de raíz de <i>S. auriculata</i>	69
7	Mortandad corregida de larvas de <i>A. albimanus</i> expuestas a subfracciones preliminares de hoja de <i>S. auriculata</i>	74
8	Mortandad corregida de larvas de <i>A. albimanus</i> expuestas a subfracciones de raíz de <i>S. auriculata</i>	86

Gráficas

Página

- | | | |
|----|--|----|
| 9 | Mortandad corregida de larvas de <i>A. albimanus</i> expuestas a subfracciones de HA-1 de <i>S. auriculata</i> | 90 |
| 10 | Mortandad corregida de larvas de <i>A. albimanus</i> expuestas a subfracciones de HA-1.4 de <i>S. auriculata</i> | 97 |

INTRODUCCION

En las regiones tropicales y subtropicales del mundo se presentan hoy en día cientos de miles de casos de malaria al año. El control de esta enfermedad se basa en el uso de medicamentos para prevenir y curar la enfermedad, y en el uso de insecticidas para disminuir la población de los diferentes tipos de zancudos que actúan como vectores de la enfermedad (Pan American Health Organization, 1961). En el transcurso del último siglo se han empleado diferentes tipos de insecticidas para controlar las poblaciones de zancudos, y en las últimas décadas se ha observado que los zancudos han desarrollado resistencia a algunos de estos insecticidas (Pant, et al, 1981).

El número de casos de malaria reportados en 1984 en Guatemala fue de 74,132 (Youmans et al, 1980). En este país el principal vector de la malaria es el zancudo *Anopheles albimanus* (Clark-Gil & Darsie, 1936) y algunos de los insecticidas que más se han utilizado para disminuir su población son el DDT, malathion, temephos, fenitrothion y propoxur (Pant, et al 1981).

En la actualidad, el control de la malaria, además de verse afectado por la resistencia de los vectores a

ciertos insecticidas, se ve influenciado por el alza en el costo de nuevos insecticidas; relacionado con estos datos se ha observado un aumento del número de casos de personas con malaria, tanto en Guatemala como en otras regiones tropicales del mundo (Pan American Health Organization, 1981). El uso de un insecticida de origen natural proporcionaría un control efectivo y específico a determinadas especies de zancudos. Este insecticida conlleva la ventaja de un bajo costo, que lo haría accesible a muchas áreas afectadas por la malaria y que no pueden utilizar insecticidas caros.

Hay evidencia que el helecho acuático *Salvinia auriculata*, considerado una peste en ciertas regiones tropicales del mundo por su rápido desarrollo y recubrimiento de mantos de agua, posee actividad larvicida sobre *Anopheles albimanus* y podría ser un medio eficaz de control de estos vectores de la malaria (Navajas, 1982; Hobbs y Molina, 1983; Montúlar, 1987; Córdoba, por completarse).

Para reforzar la evidencia obtenida por un grupo de investigadores en esta Universidad, acerca de que existe un efecto larvicida de *S. auriculata* sobre *A. albimanus*, es necesario realizar un estudio fitoquímico. Tal estudio debe conducir al aislamiento e identificación del o

de los compuestos responsables del efecto larvicida mencionado. El presente trabajo pretende avanzar en el mencionado estudio fitoquímico, preparando y fraccionando extractos de *S. auriculata* y caracterizando las fracciones que presenten actividad antilarvaria sobre *A. albimanus*.

II. ANTECEDENTES

A. Malaria

La malaria o paludismo es una de las enfermedades infecciosas más antiguas en la historia de la humanidad (Macfarlane & White, 1972). En 1979 las regiones del mundo con mayor número de casos de malaria fueron India con 3.05 millones y el este de Asia y Oceanía con 3.18 millones (Pan American Health Organization, 1981). En Guatemala los casos reportados aumentaron de 67,994 en 1981 a 74,132 en 1984 (Pan American Health Organization, 1986).

La infección palúdica se debe a la inoculación de esporozoítos de *Plasmodium* causada por la picadura de un zancudo hembra portador (Youmans *et al*, 1980). En Guatemala el principal vector de la malaria es el zancudo, *Anopheles albimanus* (Clark-Gil & Darsie, 1983).

B. Control de malaria

La erradicación de la malaria depende de la eliminación de lugares de proliferación de zancudos, de protección personal contra los zancudos (repelentes, mallas, etc.), terapia con drogas supresoras para personas expuestas, y un tratamiento adecuado de casos (Wernsdorfer, 1984; Davidson, 1982).

1. Control con insecticidas. El control de la malaria se basa, en su mayor, parte en el uso de una gran variedad de insecticidas para controlar las poblaciones de zancudos. Los insecticidas se han empleado por su acción inmediata, y su alta efectividad se debe a que pueden controlar rápidamente una población grande de insectos y están disponibles cuando se necesitan (Wernsdorfer, 1984; World Health Organization, 1981).

A finales del siglo pasado se usaron como insecticidas diferentes compuestos de arsénico. A principios de este siglo se utilizaron insecticidas sintéticos, como tiocianatos, dinitroortocresol y fenotiazina (National Academy of Sciences, 1971). En 1939 se descubrió el diclorodifeniltricloroetano, DDT, que posee una actividad alta sobre muchos insectos. La utilización del DDT como insecticida ha disminuído considerablemente porque también es tóxico a organismos útiles (ganado, peces) y posee una persistencia larga. Además, aparecieron cepas de insectos resistentes a él y es un compuesto que puede concentrarse a través de la cadena alimenticia (Davidson, 1982; World Health Organization, 1981). Posteriormente otros compuestos clorados han sido sintetizados y utilizados como insecticidas; tal es el caso del hexaclorohexano, HCH, y de derivados del ciclopentadieno, como

el aldrin y el endosulfan; estos compuestos presentan problemas similares al DDT y su uso es menor (Roussel-Uclaf, 1983; National Academy of Sciences, 1971). Ante esta situación se sintetizaron insecticidas fosforados para desplazar los clorados; algunos de éstos son: el tetraetilpirofosfato y el paration, los cuales presentan toxicidades altas a los mamíferos.

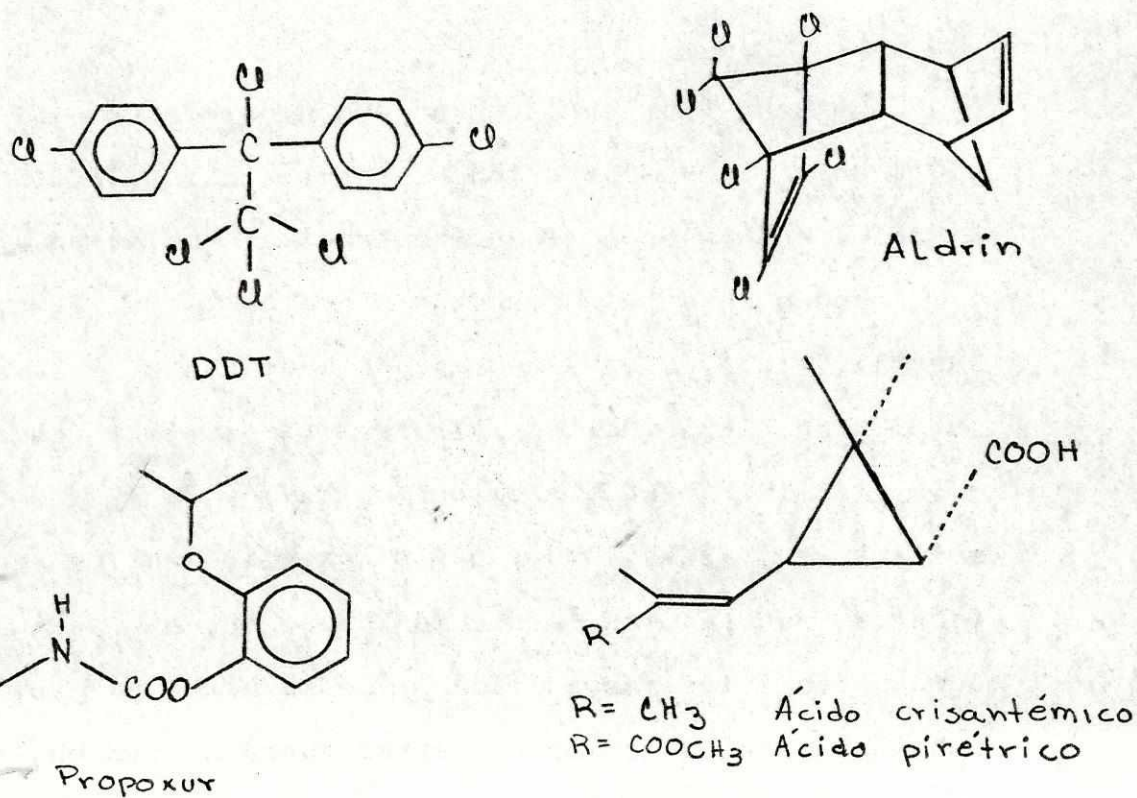


Figura 1. Estructuras químicas de algunos insecticidas.

En la década de los años sesenta se desarrollaron los carbamatos, entre ellos el propoxur y aldicarb. Los piretroides son otra familia de insecticidas que se desarrollaron a partir de los ácidos pirétrico y crisantémico. Estos últimos compuestos se descubrieron en extractos de las flores *Chrysanthemum roseum* y *C. cinerariaefolium*, que antes se usaban como insecticidas naturales (Roussel-Uclaf, 1983; National Academy of Sciences, 1971).

Se han buscado sustancias con propiedades insecticidas entre las plantas (Supavarn *et. al.*, 1974). Por ejemplo, se ha encontrado sustancias que matan larvas de zancudos en Garlic (Amonkar y Reeves, 1970; Amonkar y Banerji, 1971), en el aceite de Neem (Attri y Prasad, 1980), en extractos de *Lithospermum arvense* (Madrigal *et. al.*, 1979), en *Podocarpus nivalis* y *P. hallii* (Russell *et. al.*, 1972). Hay otros estudios en los que se reporta sustancias provenientes de fuentes naturales como potenciales insecticidas, no se hizo una revisión bibliográfica de ellos por estar fuera de los objetivos de este trabajo.

El número de especies de *Anopheles* que muestran resistencia a insecticidas se ha incrementado en los

últimos años y el desarrollo de resistencia se ha expandido geográficamente. Hay 51 especies de zancudos reconocidas como resistentes al menos a un insecticida. También es común hoy día una resistencia doble, al DDT y al dieldrín o al hexaclorohexano. Además, unas diez especies del género en cuestión son resistentes a insecticidas fosforados y otras cuatro a los carbanatos (World Health Organization, 1981). En América Central, *A. albimanus* es resistente a insecticidas órganoclorados y órganofosforados, lo que causa problemas en el control de la malaria (World Health Organization, 1981; Georghiou, 1972).

2. Control biológico. Debido al desarrollo de resistencia de los zancudos a los insecticidas, y a que el número de compuestos nuevos para utilizarse como insecticidas se está reduciendo, el control biológico de los vectores está recibiendo mayor atención como un componente principal de un método integrado y, además, provee nuevas formas de controlar a los zancudos resistentes a los insecticidas convencionales. Se está investigando el uso de patógenos y predadores de zancudos.

Entre los patógenos, el mayor progreso en cuanto a control de poblaciones de zancudos se ha logrado con

Bacilus thuringiensis y con el nemátodo Romanomermis culicivorax. También, se han hecho estudios de hongos como Culicinomyces, Coelomyces, Lagenidium, Leptolegnia y Metarhizium. Entre los predadores se han usado peces larvivoros como Gambusia, Tilapia y Poecilla. Sin embargo, la eficiencia ha sido determinada empíricamente, con resultados alentadores en algunos países y desalentadores en otros (World Health Organization, 1981).

En el caso de poblaciones de A. albimanus en Guatemala, se han observado que la población de larvas es significativamente menor en estanques donde crece Salvinia auriculata que en estanques que carecen de ella (Hobbs y Molina, 1983; Navajas, 1982). Esta observación señaló que quizás se podría usar como un medio de control biológico o natural de la malaria.

3. Control químico por reguladores del crecimiento.

El desarrollo de los insectos es controlado por hormonas (Turner, 1977). Existen hormonas de muda y hormonas juveniles (Novák, 1975; Wigglesworth, 1970). Las hormonas de muda promueven la muda al siguiente estadio. La α -ecdisona y la β -ecdisona son de esta clase de hormonas, sus estructuras se muestran en la figura 2.

2. Las hormonas juveniles permiten el crecimiento

del insecto en el estadio actual e impiden que desarrolle al siguiente. La estructura de la hormona juvenil se presenta en la Figura 3 (Novák, 1975; Wigglesworth, 1970).

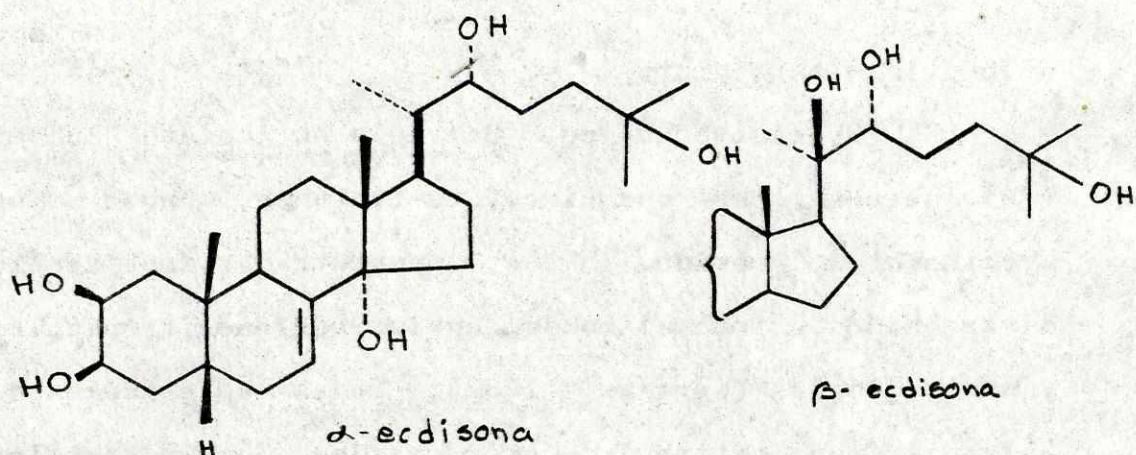
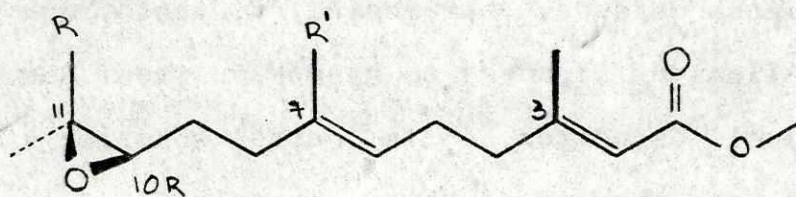


Figura 2. Estructura química de hormonas de muda.



- | | |
|---|---|
| 1 | $R = R' = \text{CH}_2\text{CH}_3$ |
| 2 | $R = \text{CH}_2\text{CH}_3 \quad R' = \text{CH}_3$ |
| 3 | $R = R' = \text{CH}_3$ |

Hormona Juvenil	I
Hormona Juvenil	II
Hormona Juvenil	III

Figura 3. Estructura química de hormonas juveniles.

El control de insecticidas utilizando reguladores del crecimiento empezó alrededor de los 70 (Novak, 1975), y hoy en día se hacen principalmente estudios de laboratorio y campo con sustancias análogas a hormonas juveniles (Mian & Mulla, 1982).

C. Salvinia auriculata

El helecho acuático, Salvinia auriculata Aublet (Salvineaceae), es una hidrofita flotante, capaz de un crecimiento rápido. Se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, en las regiones tropicales y subtropicales (Navajas, 1982). Todas las especies de Salvinia son nativas de América del Sur y América Central.

1. Descripción botánica S. auriculata posee un rizoma delgado, horizontal, flotante, que produce hojas (llamados frondes) en grupos de tres: dos hojas sésiles de peciolo cortos, en la parte superior y una tercera hoja con aspecto de raíz, larga y filiforme que cuelga debajo. En el haz de las hojas aéreas, que son verdes, crecen pelos hidrófugos en filas apretadas; estos pelos terminan en forma de jaula, en donde el aire es atrapado. La hoja sumergida es de color marrón y de aspecto plumoso; se encuentra muy dividida y

funciona como una raíz verdadera, absorbiendo agua y nutrientes; además sustenta los esporocarpos, que son indehiscentes (Navajas, 1962).

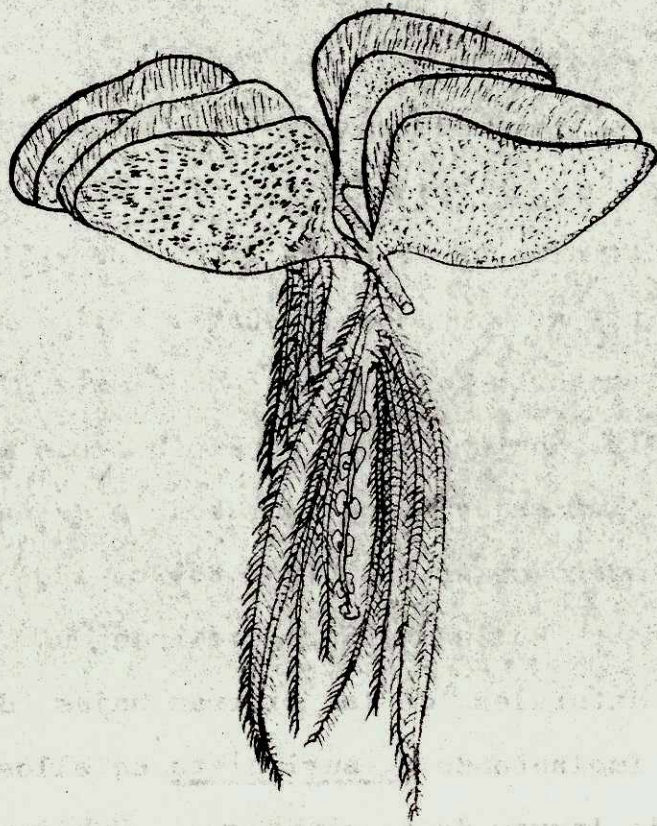


Figura 4. *Salvinia auriculata*

2. Estudios realizados. En algunas partes del mundo, por ejemplo en Asia y Australia, por su crecimiento rápido, S. auriculata es considerada una peste; puede causar problemas en las hidroeléctricas, y la pérdida de agua por la transpiración es cinco veces mayor que la evaporación de la superficie libre en el agua (Bhambie y Darsie, 1979; Guillarmod, 1979). Este helecho acuático interfiere directamente con la agricultura, la pesca y el transporte acuático (Divakaran, et.al., 1930). Sin embargo, en las Américas no causa problema porque es controlado adecuadamente por insectos herbívoros nativos.

Se han hecho estudios para controlar el rápido crecimiento de S. auriculata, utilizando herbicidas y otros métodos de control (Considine, 1984; Thomas, 1979; Filayson e.t. a.l., 1987; Bahadir e.t. a.l. 1987). También, se reporta la utilización de esta planta en la India en la manufactura de papel (Bhambie & Bardowaj, 1979) y, en Yugoslavia, en la remoción de nutrientes en aguas de desecho doméstico (Ignjatovic, 1986).

Hobbs y Molina (1983) hicieron un estudio en estanques naturales de las tierras bajas del sur de Guatemala, implantando S. auriculata en ellos y midiendo el número de larvas de A. albimanus. Cubrieron la mitad de los estanques con la planta y la otra la dejaron libre, formando una barrera con bambú a la mitad del estanque.

Encontraron que el número de larvas en A. albimanus era significativamente menor en la región cubierta con la planta que en la región sin ella. También mostraron, en pruebas hechas en el laboratorio, que en las hembras de A. albimanus preferían ovipositar en recipientes sin el helecho que en recipientes con él.

Como continuación del estudio en Guatemala, Navajas (1982) estudió el efecto de S. auriculata sobre A. albimanus. El estudio sugirió que los principales efectos antilarvarios se debían a la interferencia mecánica de las hojas sumergidas y a un incremento de depredadores asociados a la planta; no se detectó la presencia de sustancias químicas con efecto antilarvario en S. auriculata.

Posteriormente, dentro del proyecto de investigación que se desarrolló al respecto de S. auriculata como posible control de poblaciones de A. albimanus en Guatemala, Dix, Bosque y Navajas (1985) y Montúfar (1987) encontraron que extractos de S. auriculata mostraban efectos antilarvarios en larvas de primer estadio de A. albimanus. Utilizaron métodos de extracción con Soxhlet y por inmersión, usaron la planta seca y molida o fresca y macerada. Para hacer el extracto utilizaron metano y/o cloroformo. Para hacer dicho estudio se

determinó que el extracto que causa mayor mortandad es el extracto clorofórmico obtenido por inmersión durante 72 horas de la planta seca y molida, previamente extraída por inmersión en metanol durante 72 horas.

Paiz (1985) hizo un fraccionamiento del extracto crudo de *S. auriculata*. Las tres primeras etapas del fraccionamiento fueron por cromatografía en columna utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y metanol como eluyente. El último paso del fraccionamiento lo hizo por cromatografía en capa preparativa (Sílica gel). El espectro $^1\text{H-NMR}$ de la subfracción más pura obtenida presenta resonancias en 7.29 ppm (hidrógenos aromáticos), en 1.30 y 0.83 ppm (hidrógenos en hidrocarburos). En este trabajo se concluyó que el principio activo posee un grupo aromático monosustituído con una cadena alifática, y la relación de hidrógenos aromáticos a los alifáticos es de 1 a 7.5.

D. Cromatografía

Existen varios métodos para separar compuestos en una mezcla. Algunos métodos se basan en sus propiedades físicas, como punto de fusión, ebullición, polaridad, etc.

La cromatografía separa compuestos de acuerdo a la diferencia de adsorción de compuestos a una fase dada. Se utilizó por primera vez en 1906 para separar carotenos y xantofilas de extractos de hojas. Aunque este método era selectivo, no se utilizó por 25 años. En 1931 se reintrodujo esta técnica y se demostró su potencial de separación. En la actualidad es el método más utilizado y a él se debe la separación y purificación de varios pigmentos de plantas, vitaminas, hormonas, etc. (Berg, 1963).

El término cromatografía puede definirse como un método de separación en el que una mezcla se aplica en una zona angosta inicial de una fase estacionaria y los componentes de la mezcla son forzados a una migración diferencial en la fase estacionaria por el flujo de una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas (CRC Handbook Series in Chromatography, 1978).

La cromatografía puede clasificarse de acuerdo al tipo de fase móvil, en cromatografía líquida o cromatografía de gases. En la primera, un líquido disuelve el soluto y lo hace migrar a través de la fase estacionaria, que puede estar en una columna, en una capa fina o ser un papel. En la segunda, un gas inerte acarrea la

mezcla gaseosa a través de la columna de fase estacionaria.

La cromatografía líquida en columna puede ser líquido-sólido o líquido-líquido (partición). Si la fase estacionaria es un adsorbente, el proceso se llama cromatografía líquida de adsorción. Si la fase sólida es un material de intercambio iónico, se denomina cromatografía de intercambio iónico, y si es un gel polimérico no iónico, se utiliza el término cromatografía de permeación de gel, de filtración de gel o de exclusión molecular. Los otros tipos de cromatografía líquida que no son en columna, son cromatografía en capa fina y cromatografía en papel. También se pueden clasificar de acuerdo al tipo de fase estacionaria, en cromatografía de fase normal y de fase reversa (CRC Handbook Series in Chromatography, 1978).

1. Cromatografía en columna. Consiste en un tubo de vidrio o de plástico inerte, con una razón de ancho:largo entre 1:10 y 1:100, lleno con la fase estacionaria y el solvente a utilizar. En la parte inferior de la columna se coloca arena (Sílice) o fibra de vidrio, para evitar que pasen partículas de la fase estacionaria a las fracciones que se colecten. La mezcla a

separar se coloca en la parte superior de la columna y se deja correr el solvente a un flujo constante. Los componentes de la mezcla se colectan conforme van eluyendo de la columna cromatográfica.

2. Cromatografía en capa fina. Consiste en una capa delgada de adsorbente, de 0.1 a 0.25 mm de grosor, colocadas sobre una placa de vidrio o de aluminio. La mezcla se aplica en este adsorbente, luego la placa se coloca verticalmente en una cámara de vidrio que contiene el solvente y este sube por capilaridad y separa los componentes de la mezcla. Los componentes se observan a simple vista o se ilumina la placa con luz ultravioleta (si la fase estacionaria contiene un indicador fluorescente), o se pone en contacto un compuesto que reaccione con los componentes y produzca manchas coloreadas. La sustancia con que se revela se puede asperjar como una solución o exponer la placa a sus vapores. En este trabajo se utilizó una solución de vainillina y vapores de yodo. La vainillina (Fig. 5) puede reaccionar con muchas sustancias, a través del grupo fenólico del aldehído o del grupo metoxi; por ser un compuesto aromático producirá diferentes colores, lo que sirve como indicación de la presencia de otras sustancias que no pueden detectarse a simple vista o con luz ultravioleta. Por otro lado, el yodo reacciona con los

dobles enlaces entre carbonos, produciendo manchas de color amarillo en la placa (Figura 6).

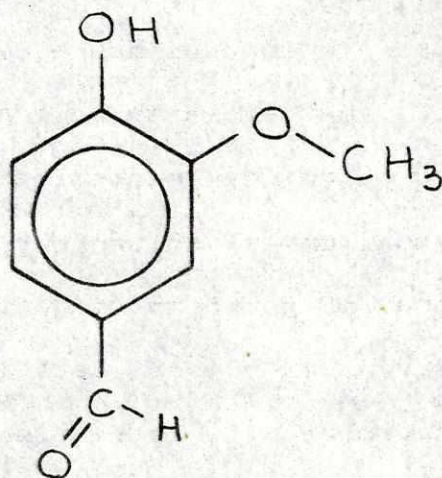


Figura 5. Estructura química de Vainillina.

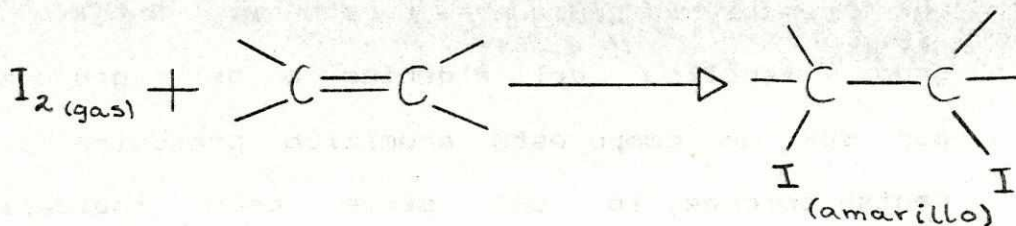


Figura 6. Reacción del vapor de yodo con carbonos insaturados

3. Mecanismo de separación. La característica de la cromatografía de adsorción es la afinidad observada entre el soluto y el adsorbente. Esta afinidad y las relaciones entre soluto, solvente y adsorbente determinan las velocidades de migración de los solutos. Tanto el solvente como el soluto son adsorbidos de la solución. Hay competencia entre las partículas del solvente y el soluto para ocupar la superficie del adsorbente. Para desarrollar un cromatograma, el adsorbente debe adsorber al soluto reversiblemente y exhibir afinidades selectivas o preferenciales para diferentes solutos. Simultáneamente, el solvente debe disolver al soluto y proveer una fuerza de arrastre para la migración del soluto a través de la columna o de la placa. La diferencia de adsorción de compuestos similares causa que éstos migren a diferentes velocidades y, así, puedan ser separados.

Las velocidades de migración de los solutos son una medida de la interacción del soluto con el solvente y con el adsorbente. Una medida conveniente es la razón de la distancia viajada por el soluto a la realizada por el solvente. Esta cantidad se designa R_f .

$$R_f = \frac{\text{Distancia viajada por el soluto}}{\text{Distancia viajada por el solvente}}$$

Para un sistema de solvente-adsorbente dado, el valor de R_f es característico y reproducible para cada soluto, mientras se mantengan constantes la temperatura, concentración del soluto y la velocidad de flujo del solvente.

4. Adsorbentes. El adsorbente debe ser insoluble en el solvente a usarse, para prevenir la disolución de la columna cuando el solvente pase a través de ella. No debe interactuar (excepto por el mecanismo de adsorción) con el soluto o el solvente.

Los adsorbentes más comunes son la alúmina (Al_2O_3), gel de sílice (SiO_2), Celite, tierra de diatomeas, hidróxido y óxido de magnesio, carbón activado, silicato de magnesio, silicato de calcio y carbonato de calcio. La actividad de la sílica gel se debe a la presencia de grupos hidroxilo que forman enlaces de hidrógeno con compuestos polares e insaturados. El Florisil es un silicato de magnesio activado, usado en análisis de vitaminas, procesamiento de antibióticos y cromatografía en general.

5. Fase móvil. El solvente se escoge de manera que los componentes de la mezcla que se van a sepa-

rar sean solubles en él, o una mezcla de solventes, en la que las proporciones se van cambiando gradualmente, para obtener una mejor separación. Cuando se utilizan dos o más solventes, se empieza con una mezcla de baja polaridad y ésta se va incrementando, hasta obtener una mezcla de alta polaridad. Cuando no se conoce nada de la composición de la mezcla a separar, se empieza a eluir con solventes no polares (como hexano o benceno) y se va aumentando la polaridad de los solventes, hasta eluir con etanol o metanol. En la Tabla 1 se presentan datos de poder de elución para los solventes más utilizados en cromatografía en columna.

Tabla 1

Valor elutrópico de solventes comunes utilizados en cromatografía en columna (1)

SOLVENTE	E°
hexano	0.0
isooctano	0.01
tolueno	0.29
benceno	0.32
éter etílico	0.38
cloroformo	0.40
acetona	0.56
acetato de etilo	0.58
etanol	0.88
metanol	0.95

(1) Escala de solventes de Hildebrandt, es una lista de solventes en orden creciente de energía de adsorción en alúmina. El orden es similar en sílica, aunque la magnitud es diferente. (CRC Handbook Series in Chromatography, 1978).

III. OBJETIVOS

En el presente trabajo de investigación se hicieron extractos de *Salvinia auriculata* que fueron procesados para aislar y caracterizar las fracciones que presentan actividad antilarvaria sobre *A. albimanus*. Los objetivos específicos del presente trabajo se indican a continuación.

Comparar los extractos clorofórmicos de hojas y de raíces, y determinar si la actividad se encuentra en las dos partes o solamente en una de ellas.

Determinar la proporción letal media de los extractos clorofórmicos de hojas y de raíces.

Fraccionar los extractos clorofórmicos de hojas y de raíces de *Salvinia auriculata*.

Caracterizar las fracciones activas obtenidas.

Determinar si hay más de un compuesto que presente actividad antilarvaria.

IV. TRABAJO EXPERIMENTAL

A. Recolección, preparación y extracción de *Salvinia auriculata*

1. Recolección y procesamiento. En el presente estudio se utilizó *Salvinia auriculata* proveniente de estanques naturales de la finca San Bernardo, localizada en el municipio de Escuintla, del departamento del mismo nombre, en la costa sur de Guatemala.

La planta fue recolectada durante los meses de julio a septiembre de 1986, siendo trasladada a esta Universidad dentro de bandejas con agua el mismo día de su recolección. La planta se limpió, removiendo material muerto o extraño; por una parte, se procesó planta entera y por otra se separaron las raíces y las hojas; cada parte, por separado, se pesó y se puso a secar durante dos o tres días sobre malla metálica dentro de un invernadero.

Las raíces, las hojas y la planta entera secas se pesaron por separado, luego se pulverizaron en un molino eléctrico tipo Wiley a un tamaño de partícula de 0.85 mm y se guardaron en bolsas de polietileno bajo refrigeración a aproximadamente 5 °C hasta el momento de su extracción.

2. Extracción. El material vegetal seco y molido se colocó en bolsas de manta de algodón para ser extraído por inmersión en metanol en una primera etapa, y en cloroformo en una segunda etapa. Las bolsas de algodón utilizadas fueron previamente remojadas en metanol y en cloroformo calientes.

Las bolsas se colocaron en recipientes de acero inoxidable, agregándoseles metanol grado industrial a razón de 1 litro por cada 100 g de material vegetal seco. Después de cada uno de dos períodos de 24 horas de inmersión se decantó la mayor cantidad posible del extracto metanólico, y se repuso el volumen de extracto obtenido con un volumen igual de metanol grado industrial. Después de 72 horas de inmersión, se decantó todo el extracto metanólico, se sacó el material vegetal de las bolsas y se colocó sobre papel filtro dentro de la campana de extracción de vapores, evaporándose durante dos días el metanol remanente en el material vegetal.

El material vegetal seco, ya extraído con metanol, se colocó nuevamente dentro de bolsas de manta, en recipientes de acero inoxidable. Se agregó cloroformo grado industrial a razón de 1 litro por cada 100 g de material vegetal seco y se hizo una extracción clorofór-

mica exhaustiva. Cada dos o tres días se decantó la mayor cantidad posible de extracto clorofórmico y se agregó un volumen de cloroformo grado industrial igual al volumen de extracto removido. Este proceso de extracción clorofórmica exhaustiva duró entre 40 y 45 días.

El extracto clorofórmico obtenido se guardó en frascos de vidrio color ámbar, bajo refrigeración aproximadamente a 5 C. Luego, el extracto se encontró por evaporación del solvente a presión reducida en un rotavapor calentándolo con un baño de agua a 45°C. La remoción del cloroformo se completó haciendo pasar nitrógeno sobre el recipiente, y luego colocándolo en un horno al vacío, a temperatura ambiente. Los extractos obtenidos de esta manera, a partir de hojas, raíces y planta entera, se designaron "extractos crudos" y se guardaron en refrigeración a aproximadamente 5°C, hasta antes de ser bioensayados.

B. Ensayo Biológico del extracto crudo y sus fracciones

Los extractos crudos y las fracciones que más adelante se obtuvieron de éstos, fueron bioensayados usando larvas con *Anopheles albimanus* de primer estadio proveniente de una cepa de Finca San Bernardo, Escuintla, y mantenido en cautiverio con renovaciones trimestrales de hembras silvestres de la misma cepa. En

vasos de vidrio de 100 mL de capacidad se pusieron 15 mL del medio acuoso a bioensayar y 25 larvas. Se trabajó con seis réplicas y cada día, a lo largo de cuatro días, se contó el número de larvas vivas en cada réplica. Al cuarto día, las larvas sobrevivientes fueron trasladadas a agua desionizada y se continuó el conteo de individuos vivos y la observación de su desarrollo hasta su eventual llegada a adultos.

Cada medio acuoso a bioensayar se preparó en base a una proporción (g de extracto o fracción utilizados : mL de medio acuoso preparados) considerada conveniente para evaluar la toxicidad del material en cuestión. Se prepararon 100 mL de cada medio a bioensayar y para ello se pesó la cantidad de extracto o fracción necesaria para dar la proporción deseada. El extracto o la fracción fue tratada con 1 o 2 mL de acetona, buscando solubilizarla lo más posible. El medio resultante se filtró con papel Whatman No. 51 hacia un balón volumétrico de 100 mL y se aforó con agua desionizada. Dado que sólo una parte del extracto crudo o la fracción se disuelve en acetona y pasa al medio que se bioensayó, no se habla de concentración del medio a bioensayar sino que solamente de la proporción (g de extracto o fracción utilizados : mL de medio acuoso preparados). La concentración del

medio bioensayado se podría calcular utilizando el dato de masa de extracto o fracción remanente en el papel filtro utilizado, pero no se consideró necesario para los propósitos de este estudio.

Por la presencia de acetona en los medios recién preparados y el efecto letal de este compuesto sobre las larvas, se esperó el tiempo necesario para su evaporación antes de colocar las larvas e iniciar los bioensayos. Este tiempo previo de evaporación fue de 4 y 5 horas, respectivamente, en el caso de los medios conteniendo 1% y 2% de acetona (Montúfar, 1987). En cada bioensayo se corrieron seis réplicas de cada uno de dos controles, uno con agua y otro con solución de acetona al 1% o 2%, según hubiera sido el caso del medio preparado para bioensayar.

Se calculó el porcentaje de mortandad corregido según la fórmula de Abbot (1925), utilizando ambos controles como base para la corrección (ver Sección III.E).

Para evaluar el grado de toxicidad de los extractos crudos se determinó su valor de proporción letal media, esto es, la proporción (gr extracto o fracción utilizado : mL medio preparado) que causa una mortandad del 50% de

las larvas a un día determinado del bioensayo.

La proporción letal media de los extractos crudos de raíz, hoja y planta entera se determinó bioensayando medios preparados en proporciones de (1:1,000), (1:2,500), (1:5,000), (1:7,500) y (1:10,000). Los datos experimentales de mortandad se analizaron usando la transformación probit y de esta manera se calcularon los valores respectivos de proporción letal media de los extractos crudos de raíz, de hoja y de planta entera. Al ir avanzando en los procesos de fraccionamiento, y por tener en forma más concentrada la o las sustancias activas, las fracciones se bioensayaron utilizando proporciones cada vez menores, (1:5,000), (1:10,000) y (1:20,000).

C. Fraccionamiento de los extractos crudos de raíz y hoja en pequeña escala

En las Figuras 7 y 8 se presentan los diagramas de flujo seguidos en el fraccionamiento preliminar de los extractos crudos de raíz y de hoja.

El extracto crudo de raíz o de hoja de *S. auriculata* se disolvió en tolueno y se fraccionó por cromatografía de columna abierta utilizando Florisil (Fisher Sci. Co.) como fase estacionaria, y el siguiente sistema y orden

de elución:

1. Tolueno
2. Tolueno-éter etílico 1:1 (v:v)
3. Éter etílico
4. Éter etílico-cloroformo 1:1 (v:v)
5. Cloroformo
6. Cloroformo-acetona 1:1 (v:v)
7. Cloroformo-acetona 1:2 (v:v)
8. Acetona
9. Acetona-etanol 1:1 (v:v)
10. Etanol

La masa de extracto crudo a fraccionar fue de 1.88 g en el caso del extracto de raíz y de 1.98 g en el caso del extracto de hoja. Por cada gramo de material a fraccionar se utilizaron alrededor de 70 gramos de Florisil y se emplearon alrededor de 300 mL de cada solvente o mezcla de solventes. Se usó un total de 600 mL de cada eluyente; se colectó como una fracción diferente cada porción de 50 mL del medio eluido; posteriormente aquellas fracciones que en capa fina dieron cromatogramas similares fueron combinadas. La cromatografía analítica en capa fina se corrió sobre material de cromatografía de capa fina del tipo: cromatofolios Al de sílica gel 60 F-254 (Merck), en capas de 0.2 mm de espesor. Los cromatogramas obtenidos en capa fina se examinaron a simple vista y por medio de luz ultravioleta de 254 nm y 366 nm de longitud de onda (lámpara UVGL-58 Mineralight, UVP Inc.), y además se revelaron con el reactivo de vainillina y en algunos casos con vapor de yodo. Dicho

reactivo se preparó disolviendo 0.5 g de Vainillina (99% de pureza, Aldrich) en 9.0 mL de etanol al 95% y agregando 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 3 gotas de ácido acético glacial. Para revelar las placas, se asperjaron con solución de vainillina, se dejaron secar y luego se calentaron en una estufa hasta que se desarrollaron manchas coloreadas. En el caso del revelado con yodo se colocó la placa de cromatografía en una cámara de vidrio cerrada con yodo sólido, hasta que se observó manchas de color amarillo.

Las fracciones que se obtuvieron del extracto crudo de hoja y del extracto crudo de raíz se nombraron H-A', H-B', H-C', etc., y R-A', R-B', R-C', etc., respectivamente.

Realizando bioensayos de las fracciones obtenidas se determinó cuáles presentan actividad larvicida sobre *A. albimanus*. Luego, estas fracciones activas disueltas en hexano fueron sometidas a un segundo paso de fraccionamiento por cromatografía en columna abierta con Florisil trabajando con la proporción (g de material a separar : g Florisil) ya descrita y usando el siguiente sistema y orden de elución:

1. Hexano
2. Hexano-tolueno 1:1 (v:v)
3. Tolueno
4. Tolueno-benceno 1:1 (v:v)
5. Benceno
6. Benceno-éter etílico 1:1 (v:v)

La masa de las fracciones R-A' y H-A' sometida a separación fue entre 0.34 y 0.36 g. Se usó un total de 50 mL de cada eluyente y se colectó como una fracción deferente cada 50 mL del medio eluido. Las fracciones así obtenidas fueron analizadas por cromatografía de capa fina sobre gel de sílice y en base a los cromatogramas obtenidos se unieron las fracciones similares. Las subfracciones se nombraron de acuerdo al orden en que eluyeron, por una parte HA'-1, HA'-2, etc., y por otra RA'-1, RA'-2, etc. Por medio de bioensayos de estas subfracciones se determinó cuáles presentan actividad larvicida.

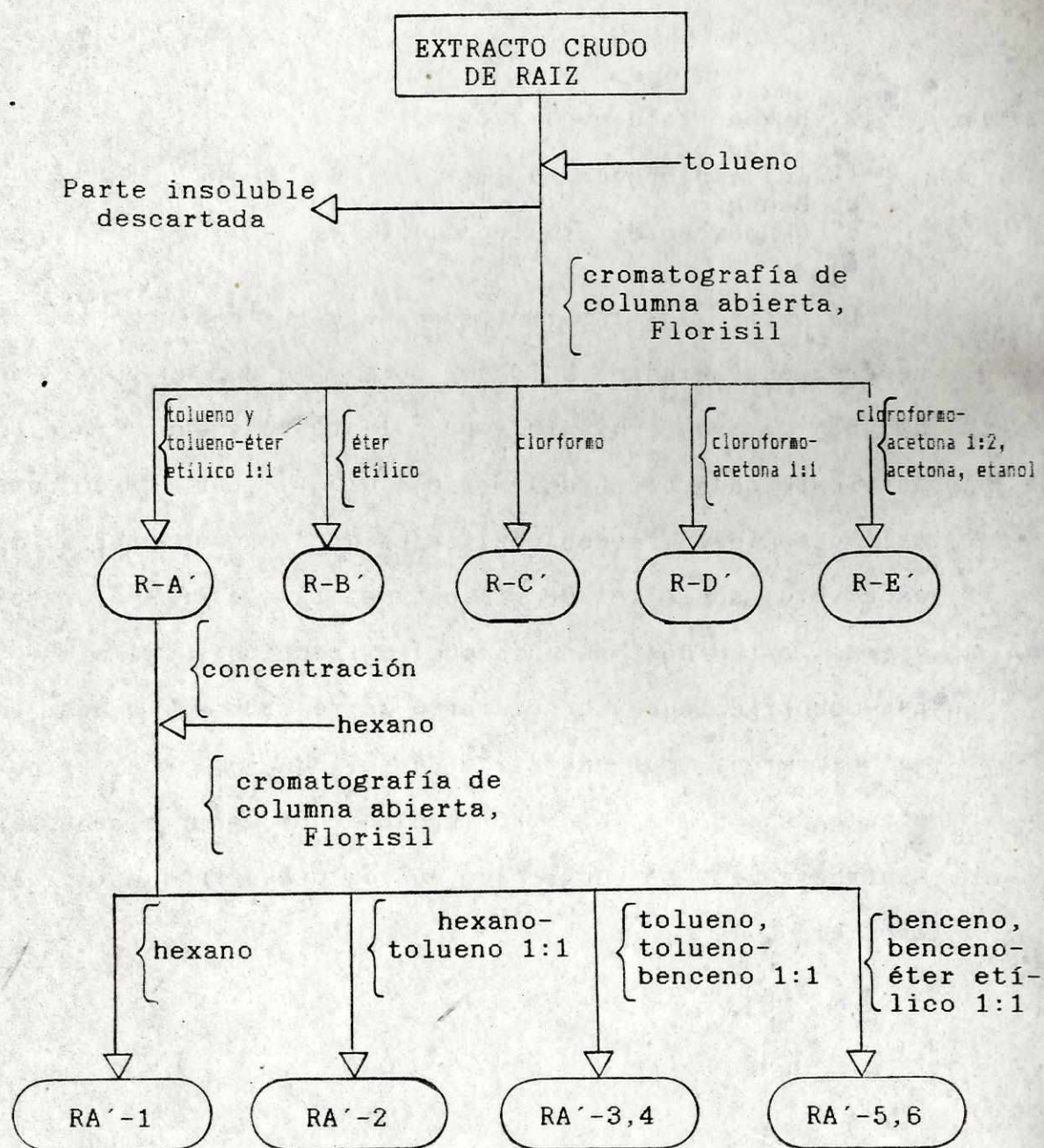


Figura 7. Fraccionamiento preliminar, en pequeña escala, del extracto crudo de raíz de *S. auriculata*

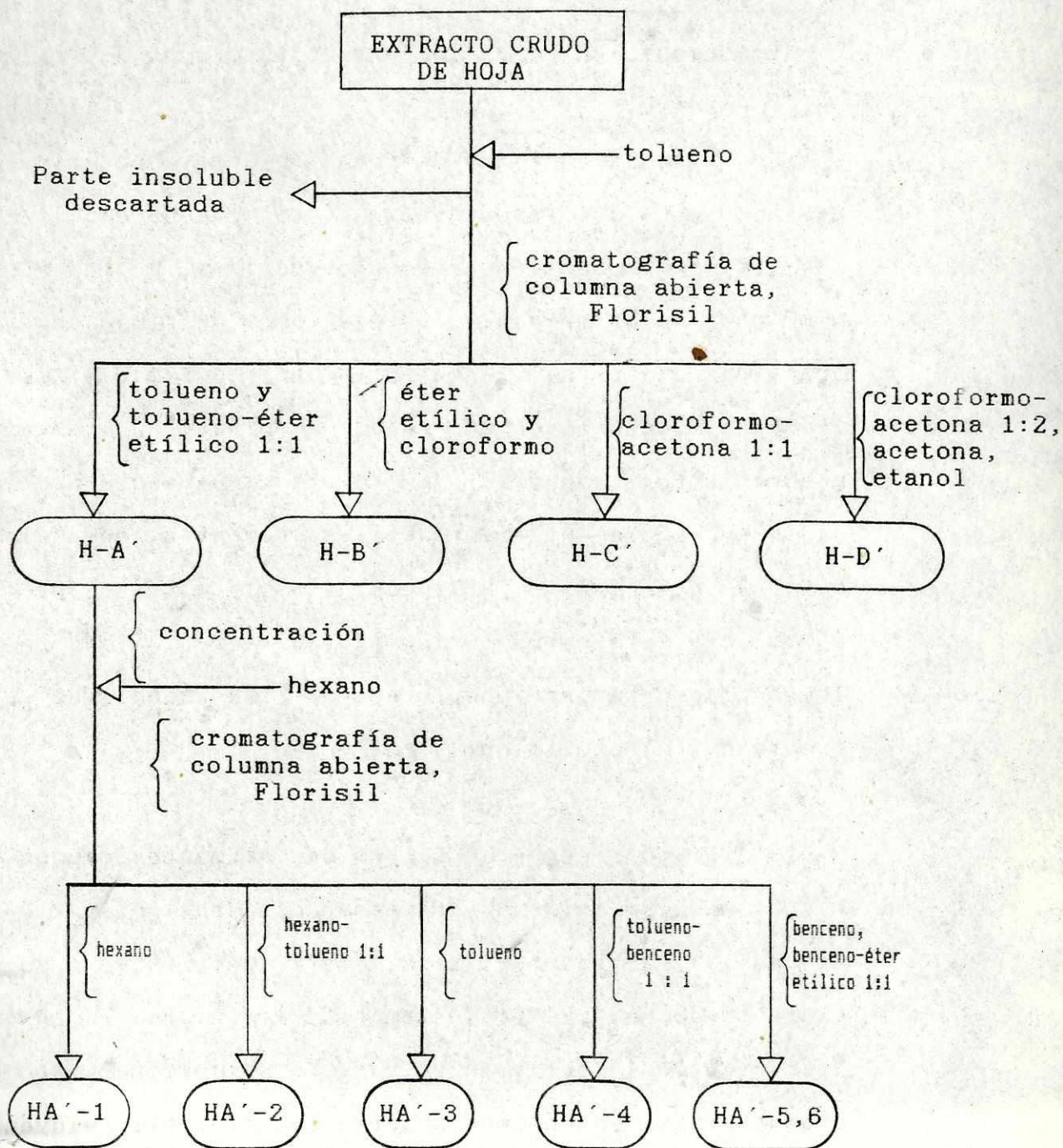


Figura 8. Fraccionamiento preliminar, en pequeña escala, del extracto crudo de hoja de *S. auriculata*

D. Fraccionamiento de los extractos crudos de raíz y hoja en escala grande

Dado que la cantidad de fracción activa obtenida del segundo pase del fraccionamiento en pequeña escala fue muy reducida, se hizo necesario realizar un fraccionamiento en mayor escala. Los diagramas de flujo de estos fraccionamientos se presentan en las figuras 9 y 10. El fraccionamiento en escala grande se planeó en base a los conocimientos adquiridos en el fraccionamiento preliminar, sobre la polaridad de los solventes que eluyen el(los) principio(s) activo(s) y sobre ciertas propiedades de este(estos) principio(s). De tal manera se logró llevar a cabo un proceso de separación más eficiente que el preliminar.

1. Primera etapa. La masa de extractos crudos que fue sometida a esta separación fue de 4.70 g en el caso del extracto de raíz y de 12.80 g en el caso del extracto de hoja. Los extractos se pusieron en hexano-éter etílico 1:1 (v:v), y la parte soluble se trató por cromatografía en columna abierta con Florisil, eluyéndolos con la misma mezcla hexano-éter etílico. Se recogieron los primeros 400 mL y los primeros 1000 mL eluidos, respectivamente para el extracto de raíz y el de hoja. Estas fracciones recogidas contenían el material

que formó una banda de color amarillo en la columna. Posteriormente, el resto del material en la columna se eluyó con acetona y se descartó. Las fracciones obtenidas de los extractos crudos de hoja y de raíz se denominaron H-A y R-A, respectivamente. Se hizo cromatografía de capa fina para determinar si el compuesto activo seguido se encontraba en estas fracciones.

2. Segunda etapa. En el caso de la fracción de extracto de hoja, H-A, ésta se concentró en un rotaevaporador, luego se redisolvió en hexano y se trató por cromatografía en columna abierta con Florisil. Se recogieron los primeros 75 mL eluidos con una mezcla de 1% de acetona en hexano, los cuales contenían el material que en la columna formó una banda amarilla. El resto del material se lavó de la columna con acetona y se descartó. A la fracción recogida se le denominó HA-1 y se continuó el proceso para su purificación.

Por otra parte, la fracción de extracto de raíz, R-A, se concentró en un rotaevaporador, y luego se disolvió en hexano y se trató por cromatografía en columna abierta con Florisil, del tipo y composición ya descrito, utilizando el siguiente sistema y orden de elución:

1. Hexano
2. Hexano-tolueno 1:1 (v:v)
3. Hexano-tolueno 1:1 (v:v) con 1% de acetona
4. Tolueno con 1% de acetona

Se usó un total de 30 mL de cada eluyente y se colectó ese mismo volumen de cada diferente fracción. Las fracciones recogidas se designaron RA-1, RA-2, RA-3 y RA-4. Por cromatografía de capa fina se determinó que dichas fracciones correspondieron con las del fraccionamiento preliminar RA'-1 a RA'-4. Dado que estas fracciones se obtuvieron en cantidades muy reducidas y que las dos primeras de ellas presentaron cromatogramas de capa fina muy similares a la fracción equivalente en el fraccionamiento del extracto crudo de hoja, no se continuó el proceso para su purificación.

3. Tercera etapa. La fracción HA-1 se concentró en un rotaevaporador, se redisolvió en hexano y se corrió en cromatografía de capa preparativa (gel de sílice, 2000 µm de espesor, Analtech). Se usó hexano-acetato de etilo 9:1 (v:v) como eluyente y se hicieron dos corridas sucesivas de la misma placa para obtener una mejor separación de los componentes de la fracción.

A simple vista se observaron tres regiones de color amarillo. Bajo luz ultravioleta se distinguían estas

mismas tres regiones como regiones oscuras y una cuarta, en el frente del solvente, con fluorescencia de color celeste-azul.

La placa se cortó de acuerdo al patrón observado bajo luz ultravioleta en cuatro regiones. Las fracciones obtenidas se denominaron HA-1.1, HA-1.2, HA-1.3 y HA-1.4, siendo la fracción HA-1.4 la que más se desplazó y la HA-1.1 la que se desplazó menos. Al bioensayar estas fracciones se encontró que las de los extremos, HA-1.1 y la HA-1.4, presentaron mayor actividad antilarvaria. Se continuó la purificación de la fracción HA-1.4 pero no la de la fracción HA-1.1 pues se obtuvo una cantidad muy reducida de ella.

4. Cuarta etapa. La fracción activa HA-1.4 se concentró en un rotaevaporador y se redisolvió en hexano, luego se trató por cromatografía en columna abierta, usando como eluyente 120 mL de hexano-acetato de etilo 9:1 (v:v). Se recogieron tres fracciones, la primera incluyó el material eluido hasta antes que empezara a eluir una banda amarilla, la segunda fue la constituida por la banda amarilla, y la tercera fue la eluida por el resto del eluyente. Estas fracciones se denominaron HA-1.4-1, HA-1.4-2 y HA-1.4-3, respectiva-

mente. Entre ellas, la HA-1.4-2, fue la fracción que causó mayor mortandad de larvas de *A. albimanus*.

Dado que la fracción HA-1.4-2 presentó contaminación probablemente debida al contacto con plásticos durante su procesamiento, fue necesario purificarla pasándola sobre Florisil, y usando hexano-acetato de etilo 9:1 (v:v) como eluyente. Tanto la presencia original de la impureza como su ausencia posterior, fueron determinados por cromatografía analítica en capa fina.

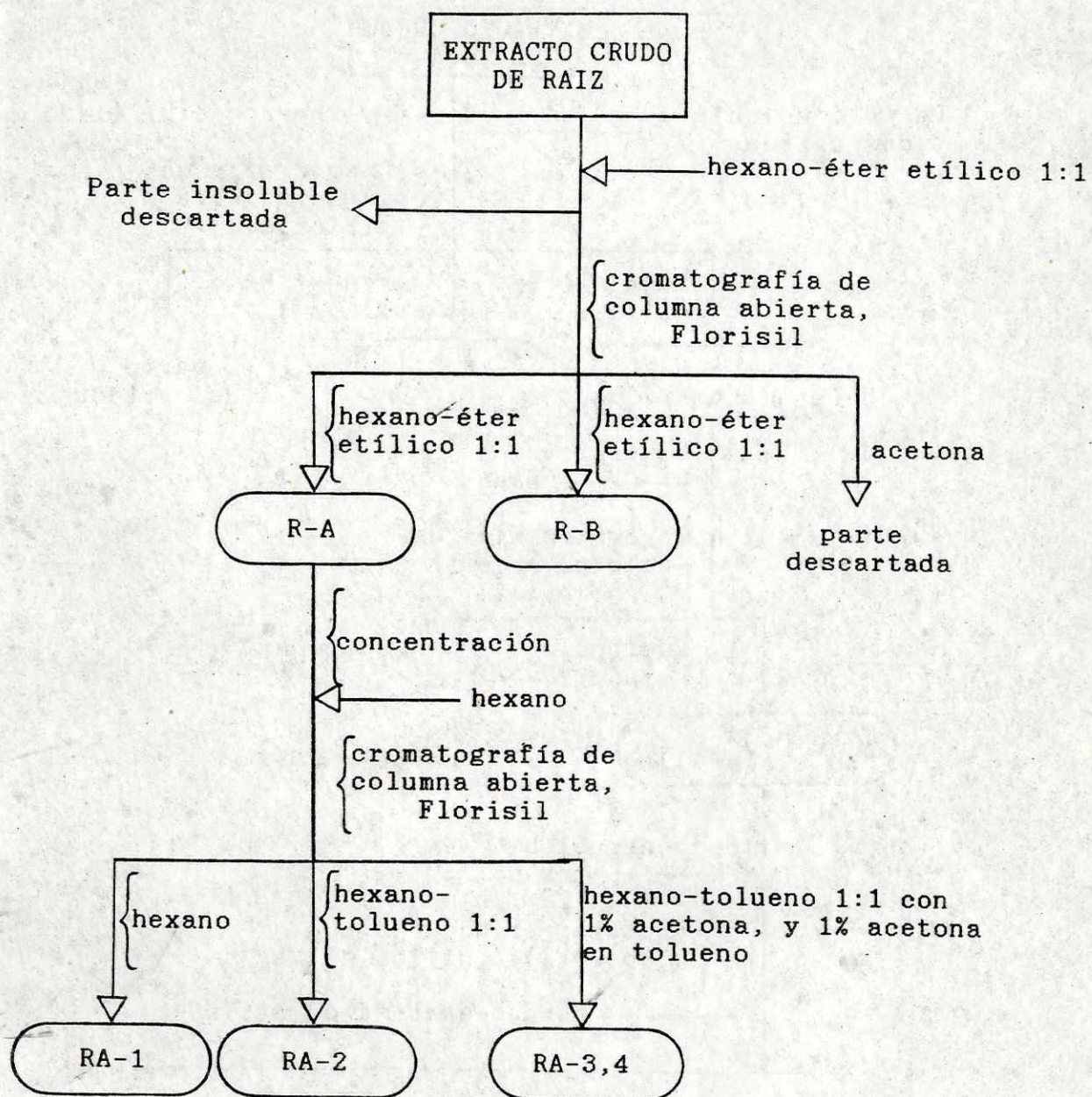


Figura 9. Fraccionamiento del extracto crudo de raíz de *S. auriculata*, en escala grande.

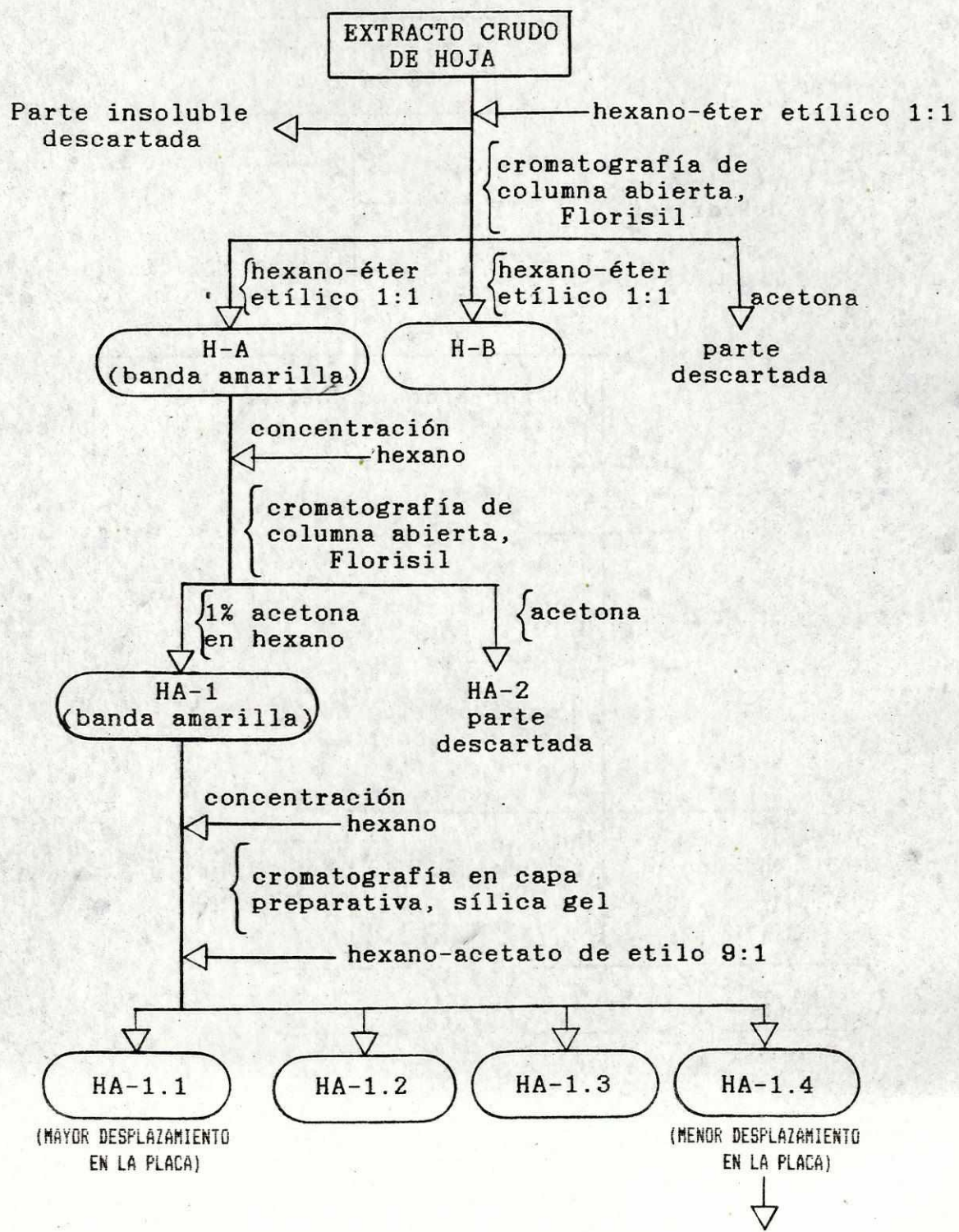
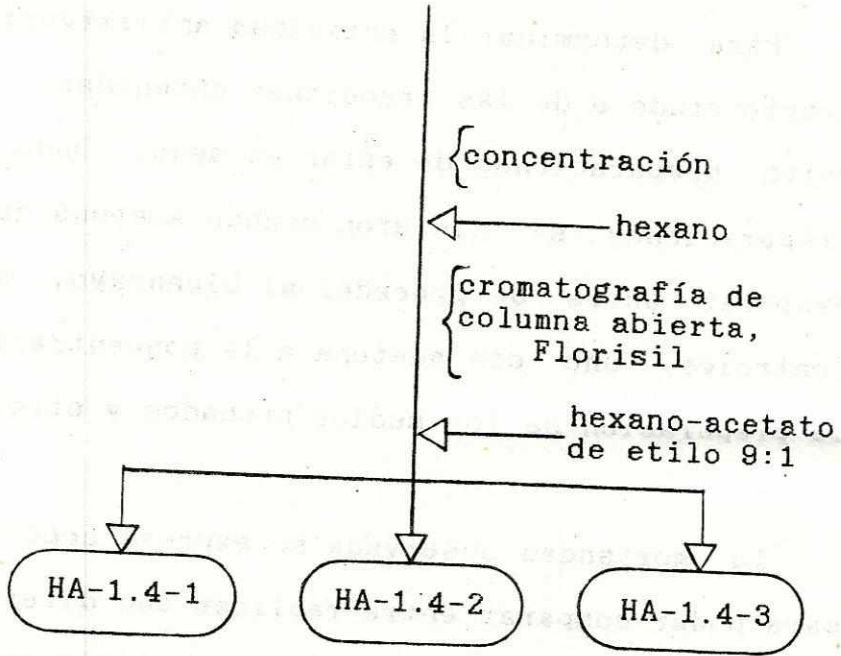


Figura 10. Fraccionamiento del extracto crudo de hoja de *S. auriculata*, en escala grande.



Continuación Figura 10.

E. Tratamiento estadístico de los datos de los bioensayos

Para determinar la actividad antilarvaria del extracto crudo o de las fracciones obtenidas, se bioensayaron preparaciones de éstas en agua. Dado que dichas preparaciones se hicieron usando acetona que se dejó evaporar antes de proceder al bioensayo, se usó dos controles, uno con acetona a la concentración usada en la preparación de los medios probados y otro con agua.

La mortandad observada se expresó como porcentaje, para poder comparar entre réplicas con diferente número de larvas. Se hizo un análisis de varianza para comparar la actividad larvicida de los extractos o fracciones y una prueba 'a posteriori' (prueba de Student-Newman-Keuls) de comparación de medias para determinar diferencias entre ellas.

Se utilizó la fórmula de Abbott (1925) para corregir por la mortandad en el control:

$$P = \frac{P* - K_o}{100 - K_o} * 100 \tag{1}$$

en donde P es el % de mortandad real
P* es el % de mortandad observada en la solución probada
K_o es el % de mortandad observada en el control

Se utilizó los datos de los dos controles (acetona y

agua) para calcular K_0 .

Se determinó la concentración a la que una solución de extracto crudo de raíz, hoja o planta entera mata el 50% de las larvas (LC-50). Para ello se usó la transformación Probit. En el Apéndice A se describe esta transformación y en el Apéndice B se presenta el programa de computadora usado para desarrollar esa transformación y calcular el LC-50. A continuación se describen las otras pruebas estadísticas realizadas.

1. Análisis de varianza. Para hacer comparaciones entre las actividades de los extractos entre las actividades de las fracciones que se obtuvieron de ellos, se utilizó antes un análisis de varianza simple; de esta manera se determinó si había o no diferencia significativa entre las varianzas de los medios bioensayados. Como tratamiento se usó cada extracto crudo (hoja, raíz y planta entera) o las fracciones que se obtuvieron a partir de ellos. Una descripción del análisis de varianza puede encontrarse en textos de biometría (Sokal y Rolf, 1969), por lo que no se describe aquí. La prueba indica si hay o no diferencia significativa entre los tratamientos, pero indica entre cuales. Para obtener esta información es

necesario hacer una prueba estadística adicional, la de Student-Newman-Keuls.

2. Prueba de Student-Newman-Keuls. Este método es un proceso por pasos, y usa el rango como un estadístico para medir diferencias entre medias. Primero se calcula el error estándar común del grupo de medias:

$$S = \frac{MS_{\text{error}}}{n} \quad (2)$$

En donde S es el error estándar común del grupo de medias
MS error es la media cuadrada del error encontrado en el análisis de varianza
n es el número de réplicas del que se obtuvo cada media

Se obtienen los valores críticos del estadístico Q a un nivel de significancia α , para grupos de a, a-1, ..., y 2 medias, con grados de libertad iguales a los de la suma de cuadrados del error. Se calcula el rango menos significativo (LSR), para grupos de a, a-1, ..., y 2 medias, de acuerdo a:

$$LSR = Q_{\alpha} [k, g.l.] \frac{MS_{\text{error}}}{n} \quad (3)$$

En esta fórmula Q se obtiene de tablas, con una significancia α , para comparar k medias y con grados de libertad 'g.l.'.

Las medias se arreglan en orden ascendente o descendente. Primero se prueba comparando el rango total (media más grande menos media más pequeña) con el LSR para 'a' medias. Luego comparamos el rango de 'a-1' medias con el LSR respectivo, después se compara el rango de 'a-2' medias, etc. Este proceso se continúa hasta comparar todos los pares de medias consecutivas.

The first part of the report
deals with the general
principles of the
method and the
results of the
experiments.

The second part
describes the
apparatus used
and the
method of
measurement.

The third part
contains the
discussion of
the results
and the
conclusions.

V. RESULTADOS

A. Extractos crudos

1. Obtención. El extracto crudo de raíz se obtuvo a partir de 6.30 Kg. de raíces húmedas, que dieron 380.0g. de material seco (porcentaje de humedad en las raíces alrededor de 94%). Se obtuvieron 4.75 g. de extracto crudo (1.3 % de rendimiento en base seca).

El extracto crudo de hoja provino de 8.72 Kg. de hojas húmedas, que pesaron 800.0 g. al secarse (porcentaje de humedad = 91%). De ellas se obtuvo 9.70 g. de extracto crudo (1.2% de rendimiento en base seca).

El extracto crudo de planta entera se obtuvo de 1.0 Kg. de material seco. Se obtuvieron 8.30 g. de extracto crudo, que representan el 0.83% de rendimiento en base seca.

2. Proporción letal media. Se realizaron bioensayos para determinar la concentración letal media al cuarto día de exposición a los extractos crudos de raíz, hoja y planta entera. Para ello se prepararon cinco soluciones acuosas de los extractos crudos a proporciones entre 1:1,000 y 1:10,000 (g. de extracto : mL

de medio acuoso preparado). En la Tabla 2 se presentan los datos de mortandad obtenidos en los bioensayos.

Tabla 2

Mortandad de larvas de *A. albimanus* al cuarto día de exposición a extractos crudos de raíz, hoja, y planta entera, de *S. auriculata*. (1)

EXTRACTO O CONTROL	PROPORCION (g extracto: mL medio prep.)	LARVAS MUERTAS	LARVAS EXPUESTAS	LC-50 (g extracto: mL medio prep.)
RAIZ	1:1,000	125	125	1:5680
	1:2,500	145	150	
	1:5,000	85	150	
	1:7,500	30	150	
	1:10,000	24	150	
HOJA	1:1,000	122	122	1:5850
	1:2,500	141	145	
	1:5,000	85	146	
	1:7,500	42	117	
	1:10,000	8	150	
PLANTA ENTERA	1:1,000	125	125	1:6900
	1:2,500	138	150	
	1:5,000	75	150	
	1:7,500	72	150	
	1:10,000	56	150	
ACETONA 2% EN AGUA	---	0	150	---
AGUA	---	0	150	---

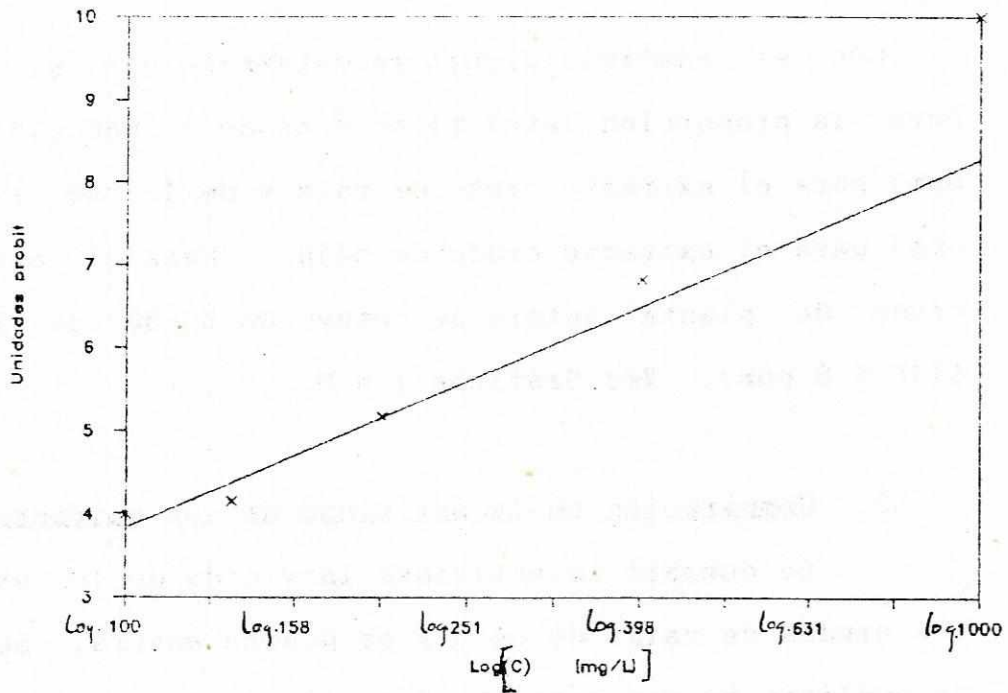
(1) Resultados totales de 6 réplicas

Se utilizó un programa de computadora (Apéndice C) para hacer el análisis probit. En el Apéndice D se presentan tablas con los parámetros estimados y cómo varían éstos en cada iteración realizada.

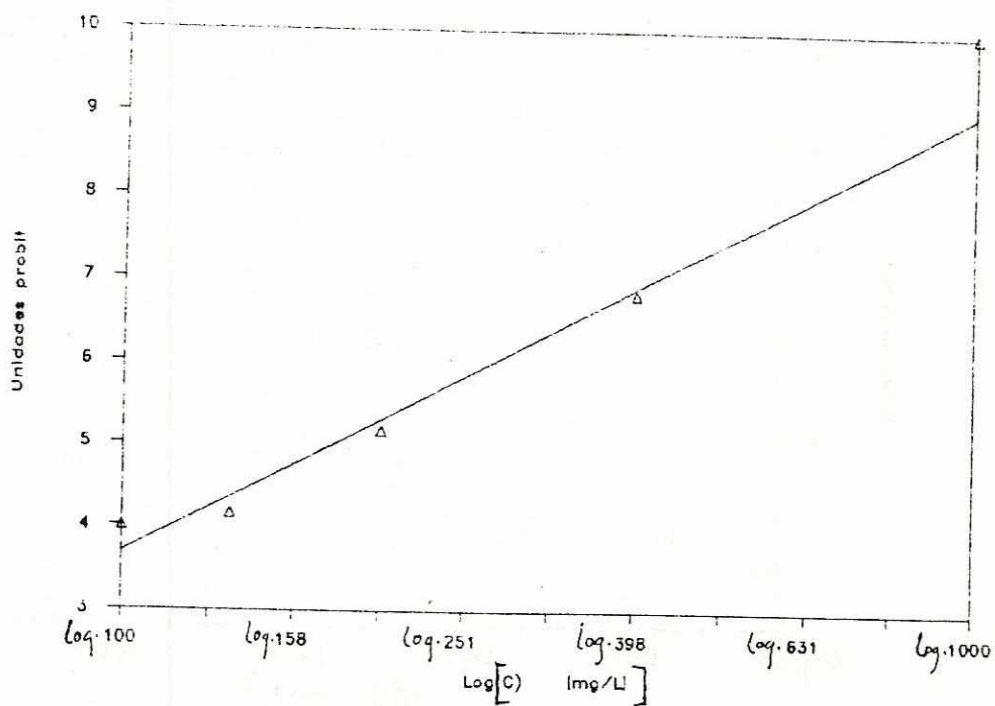
Con el análisis probit se determinó que el valor para la proporción letal al 50 % es de 1:5680 (171 ± 5 ppm) para el extracto crudo de raíz y de 1:5850 (176 ± 5 ppm) para el extracto crudo de hoja. Para el extracto crudo de planta entera se obtuvo un LC-50 de 1:6900 (145 ± 8 ppm). Ver Gráficas 1 a 3.

3. Comparación de la actividad de los extractos.

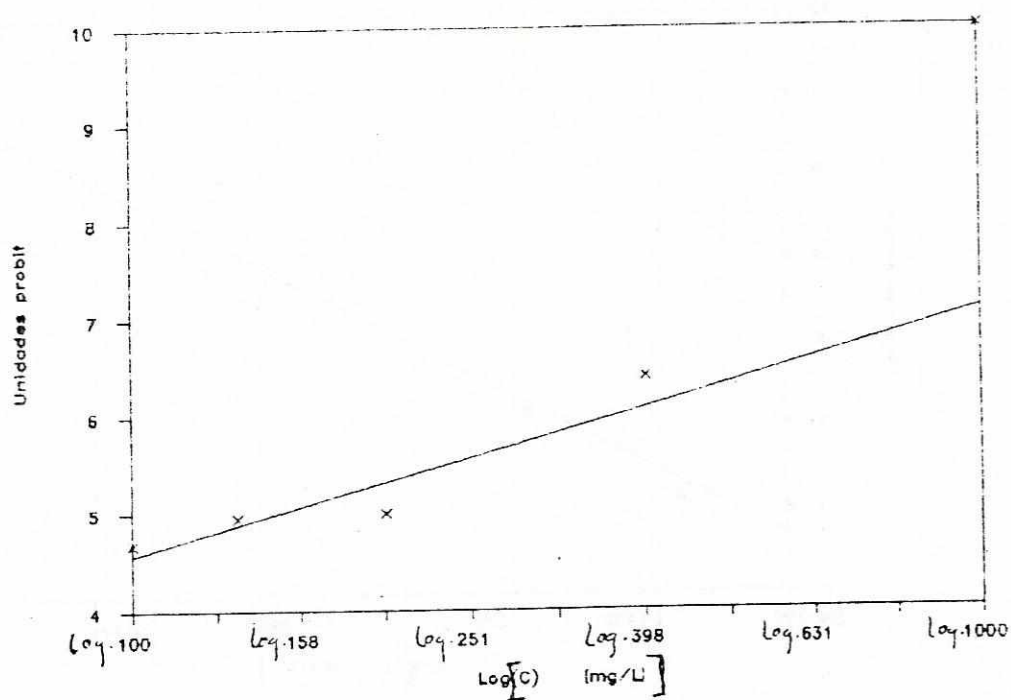
Se comparó la actividad larvicida de los extractos crudos de raíz, de hoja y de planta entera. Se hizo un análisis de varianza (Tabla E.15), en donde se muestra que no hay diferencia significativa (con probabilidad $p=0.12$) entre la actividad de los tres extractos a una proporción de 1:5,000, que es la proporción cercana a la letal media.



Gráfica 1. Mortandad (corregida con la fórmula de Abbot y expresadas en unidades probit) de larvas *A. albimanus* al cuarto día de exposición al extracto crudo de raíz de *S. auriculata* y recta de regresión del Análisis Probit.



Gráfica 2. Mortandad (corregida con la fórmula de Abbott y expresadas en unidades probit) de larvas *A. albimanus* al cuarto día de exposición al extracto crudo de hoja de *S. auriculata* y recta de regresión del Análisis Probit.



Gráfica 3. Mortandad (corregida con la fórmula de Abbott y expresadas en unidades probit) de larvas *A. albimanus* al cuarto día de exposición al extracto crudo de planta entera de *S. auriculata* y recta de regresión del Análisis Probit.

B. Fraccionamiento preliminar en pequeña escala de los extractos crudos de raíz y hoja

1. Primera etapa de fraccionamiento de los extractos crudos.

a. Fracciones del extracto crudo de raíz. Después de unir las fracciones similares obtenidas de la cromatografía en columna abierta resultaron cinco fracciones como se indica en la Figura 7.

En la Tabla 3 y en la Gráfica 4 se muestra la mortandad corregida por la fórmula de Abbott de las larvas de *Anopheles albimanus* expuestas a los medios con las fracciones del extracto crudo de raíz a una proporción de 1:5,000. De las cinco fracciones únicamente la fracción R-A' presenta alta actividad antilarvaria, un 100% de mortandad al segundo día. La fracción siguiente a ésta, la R-B', muestra poca actividad, un 29% de mortandad al cuarto día, y las fracciones subsiguientes muestran aún menores actividades.

Tabla 3

Mortandad cumulativa corregida de larvas de *A. albimanus* expuestas a fracciones preliminares del extracto crudo de raíz de *S. auriculata*. (1)

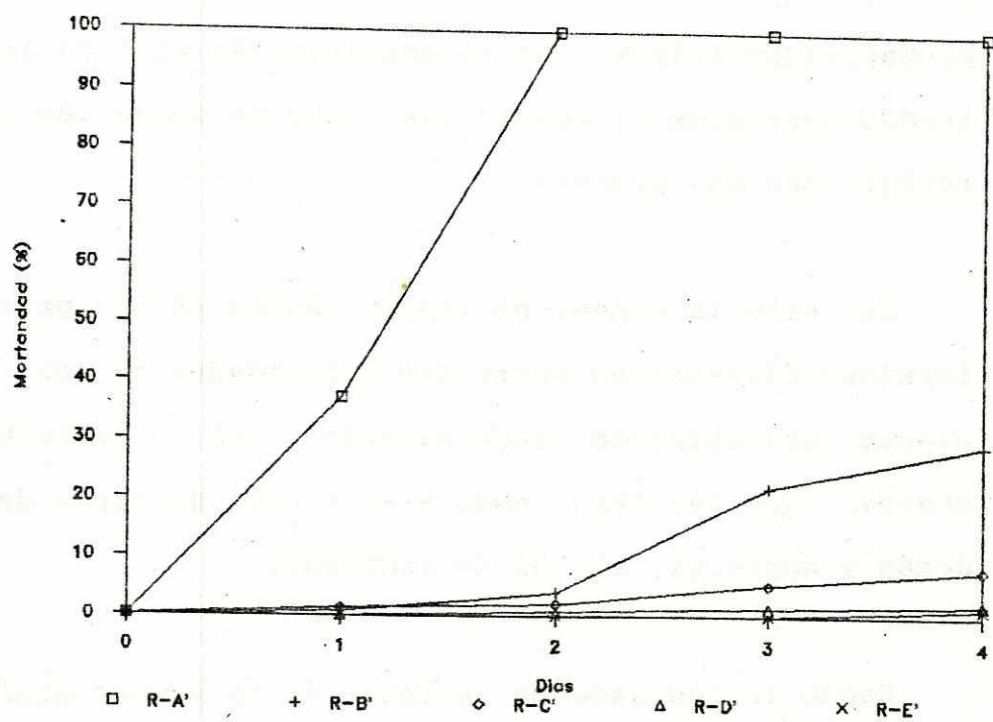
FRACCION	DIA	MORTANDAD (%) (2)	DESV. STD.
R-A' (3)	1	37	19
	2	100	0
	3	100	0
	4	100	0
R-B' (3)	1	1	2
	2	4	6
	3	19	12
	4	25	12
R-C' (4)	1	1	3
	2	1	3
	3	1	6
	4	8	5
R-D' (4)	1	0	0
	2	0	2
	3	0	2
	4	0	3
R-E' (4)	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	3
CONTROL AGUA <i>Control</i>	1	0	0
	2	0	0
	3	3	5
	4	3	6

(1) Fracciones en medio acuoso a una proporción de 1:5,000. Resultados promedio de 6 réplicas.

(2) ANOVA: $F=208.01$ $p<10^{-4}$

(3) Difiere significativamente (95% Conf.) de las demás fracciones (Test SNK)

(4) Difiere significativamente (95% Conf.) de R-A' y R-B' (Test SNK)



Gráfica 4. Mortalidad corregida de larvas de *A. albimanus* expuestas a fracciones preliminares del extracto crudo de raíz de *S. auriculata*. (Proporción bioensayada 1:5,000)

En la Tabla E.1 se presentan los resultados del análisis de varianza realizado para determinar si existen diferencias significativas entre las actividades de las fracciones preliminares de raíz. El análisis indica una diferencia significativa entre las fracciones a una probabilidad $p < 10^{-4}$. En el análisis se utilizó la mortandad corregida al cuarto día, que es donde las diferencias son más grandes.

Se hizo la prueba de Student-Newman-Keuls para determinar diferencias entre las actividades de las fracciones del extracto crudo de raíz. En la Tabla E.2 se observa que las fracciones R-A' y R-B' difieren de las demás y entre sí, al 95% de confianza.

Según lo indicado en la Tabla 4, la cromatografía de capa fina realizada bajo las condiciones de la sección IV.C, muestra una mancha azul-morada con $R_f = 0.59$ en la fracción R-A' al revelar la placa con vainillina. Las fracciones R-B' y R-C' también presentan esta misma mancha pero con una intensidad gradualmente menor y un R_f levemente diferente (0.68). Dado que entre las dos fracciones R-A' y R-B' ésta es la única mancha en común, y que no aparece en forma tan intensa en los cromatogramas de las otras fracciones se concluye que dicha mancha

contiene el o los principios activos; y por la diferencia en su concentración la fracción R-A' presenta una actividad antilarvaria mayor que la fracción R-B'.

Tabla 4

Componentes de las fracciones preliminares del extracto crudo de raíz de *S. auriculata* observados en los cromatogramas en capa fina. (1)

FRACCION	TIPO DE REVELADO			
	VISIBLE	UV (254 nm)	UV (366 nm)	VANILINA
R-A'	0.54 Amarillo	0.54	0.53 Azul	0.59 Moraco-azul. 0.37 Moraco
R-B'	0.54 Cafe	0.54 intenso 0.28 intenso	0.30 Rojo 0.07 Rojo	0.28 Amarillo 0.36 Azul-celeste 0.41 Rojo 0.56 Amarillo 0.08 Moraco-azul
R-C'	--	0.57 tenue 0.28 intenso	0.57 Azul	0.28 Amarillo 0.36 Azul-celeste 0.41 Rojo 0.08 Moraco-azul claro
R-D'	--	0.25 tenue	0.58 Rojo	0.38 Azul-celeste 0.43 Rojo
R-E'	--	--	0.64 Azul	0.00 Verde

(1) Se usó cloroformo-acetona 9:1 (v:v) como fase móvil y cromatofolios Al de Sílica gel 60 F-254 (Merck) como fase estacionaria

b. Fracciones del extracto crudo de hoja. Las fracciones provenientes de la cromatografía en columna que mostraron similitud se unieron, y como se muestra en la Figura 8 resultaron cuatro fracciones.

Se bioensayaron estas cuatro fracciones que se obtuvieron del extracto crudo de hoja y los datos de mortandad se presentan en la Tabla 5 y en la Gráfica 5.

La primera fracción H-A', la menos polar, fue la que presentó actividad antilarvaria (99% de mortandad al tercer día). Las otras tres fracciones mostraron un efecto muy leve sobre las larvas. El análisis de varianza de la actividad de las fracciones al cuarto día (Tabla E.3) indica que hay una diferencia significativa ($p < 10^{-4}$) entre la actividad de las fracciones. La prueba de Student-Newman-Keuls mostró que la fracción H-A' difiere de las demás fracciones, al 95% de confianza (Tabla E.4).

Al hacer cromatografía de capa fina de las fracciones H-A', H-B', H-C', H-D', usando cloroformo-acetona 8:1 (v:v) como eluyente se obtuvo lo indicado en la Tabla 6. Al observar los cromatogramas revelados con vainillina se nota que la fracción H-A' contiene una mancha morada-azul ($R_f = 0.70$), semejante a la detectada en la fracción R-A', y designada como la que contiene el o los principios activos. Esta misma mancha se observa más tenue (menor concentración) en las fracciones H-B' y

H-C' (Rf=0.69 y 0.68, respectivamente). El Rf de la mancha en discusión en H-A' es mayor al de la mancha en la fracción R-A', pero corresponde a aquel de la mancha en R-B' y R-C'.

Tabla 5

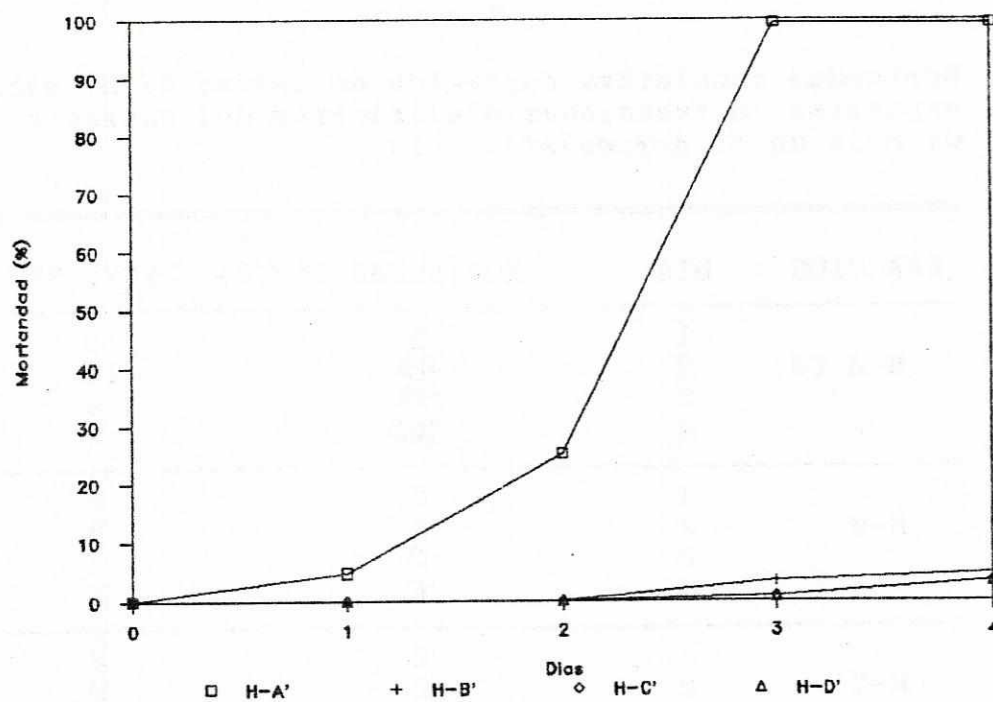
Mortandad cumulativa corregida de larvas de *A. albimanus* expuestas a fracciones preliminares del extracto crudo de hoja de *S. auriculata*. (1)

FRACCION	DIA	MORTANDAD (%) (2)	DESV. STD.
* H-A' (3)	1	1	8
	2	23	11
	3	99	2
	4	100	2
H-B'	1	0	0
	2	0	0
	3	0	5
	4	0	5
H-C'	1	0	0
	2	0	0
	3	1	2
	4	1	4
H-D'	1	0	0
	2	0	0
	3	0	2
	4	0	4
CONTROL AGUA	1	0	0
	2	0	0
	3	3	5
	4	3	6

(1) A una proporción de 1:5,000. Resultado promedio de 6 réplicas.

(2) ANOVA: F=987.88 p<10⁻⁴

(3) Difiere significativamente (95% Conf.) de las demás fracciones (Test SNK)



Gráfica 5. Mortalidad corregida de larvas de *A. albimanus* expuestas a fracciones preliminares del extracto crudo de hoja de *S. auriculata*. (Proporción bioensayada 1:5,000)

Table 2

Comparison of the frequencies of the various types of errors made by the subjects in the different conditions of the experiment. (i)

Type of Error	Condition A		Condition B	
	No. of Errors	% of Total	No. of Errors	% of Total
1. Omission	12	15.0	8	10.0
2. Commission	35	45.0	42	55.0
3. Substitution	18	23.0	25	33.0
4. Transposition	15	19.0	15	20.0
5. Reversal	10	13.0	12	16.0
6. Other	5	6.5	3	4.0
Total	80	100.0	105	100.0

100 = total number of trials. The number of errors in each condition is given in parentheses.

Comparison of the frequencies of the various types of errors made by the subjects in the different conditions of the experiment. (i)

Table X lists the various types of errors made by the subjects in the different conditions of the experiment. It will be seen that the most frequent type of error is commission, and that this is true in both conditions. The next most frequent type of error is substitution, and this is also true in both conditions. The frequency of omission errors is lower in both conditions, and the frequency of transposition and reversal errors is also lower. The frequency of other errors is the lowest in both conditions.

Tabla 6

Componentes de las fracciones preliminares del extracto crudo de hoja de *S. auriculata* observados en los cromatogramas en capa fina. (1)

FRACCION	TIPO DE REVELADO			
	VISIBLE	UV (254 nm)	UV (366 nm)	VAINILLINA
H-A'	-----	0.65 Tenue	0.64 Azul	0.76 Morado-Azul 0.42 Morado
H-B'	0.57 Cafe	0.69 Tenue 0.30 Tenue	0.69 Rojo 0.62 Rojo 0.49, 0.06 Rojo	0.37 Azul-celeste 0.69 morado-azul tenue
H-C'	0.65 Verde 0.51 Verde	0.65 0.52	0.65 Rojo 0.51 Rojo	0.37 Azul-celeste tenue 0.65 Morado-azul tenue
H-D'	-----	0.64	0.64 Azul	0.00 Verde oscuro

(1) Se usó cloroformo-acetona 9:1 (v:v) como fase móvil y cromatofolios Al de Silica gel 60 F-254 (Merck) como fase estacionaria

c. Comparación de fracciones de extracto crudo raíz y hoja. De los resultados de esta primera etapa de fraccionamiento de extractos crudos de raíz y de hoja se obtiene que la fracción activa es similar en la raíz y en la hoja. Esta fracción activa es altamente apolar ya que en la cromatografía en columna es eluida con solventes no polares (tolueno, éter etílico). En base a esta naturaleza altamente apolar, y a los cromatogramas de capa fina de las diferentes fracciones

se concluye que en las fracciones activas, R-A' y H-A', el(los) componente(s) responsable(s) de la actividad está(n) presente(s) en la mancha observada con revelado de vainillina como aquella con mayor migración y Rf de 0.59-0.70, color morado-azul, al usar cloroformo-acetona 9:1 (v:v) como fase móvil y cromatofolios Al de Sílica gel 60 F-254 (Merck) como fase estacionaria. Al llevar a sequedad las fracciones activas de raíz R-A' y de hoja H-A', se obtiene un polvo de color amarillo.

2. Segunda etapa de fraccionamiento de los extractos crudos. Las fracciones activas R-A' y H-A', por separado, se sometieron a una segunda etapa de separación cromatográfica (Figuras 7 y 8). La fracción R-A' dio cuatro subfracciones y la fracción H-A' cinco subfracciones. Las subfracciones se identificaron por RA'-1, RA'-2, ..., y HA'-1, HA'-2, ..., según su polaridad creciente y orden de elución de la columna cromatográfica.

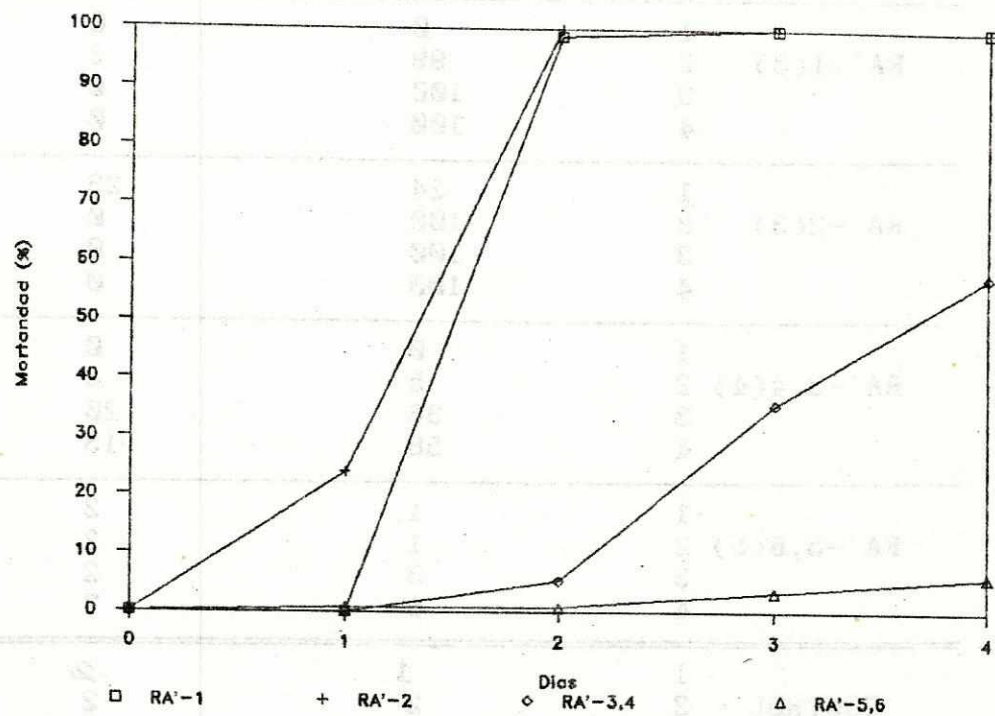
a. Subfracciones del extracto crudo de raíz. La fracción R-A' se separó por cromatografía en columna abierta sobre Florisil, dando seis fracciones; se combinaron las fracciones que mostraron cromatogramas de capa fina similares, resultando cuatro subfracciones

(Figura 7). La identificación de estas subfracciones indica el orden con que fueron eluidas de la columna cromatográfica, y las subfracciones originales que se unieron.

La mortandad de larvas de *A. albimanus* expuestas a estas subfracciones en medio acuoso se presenta en la Tabla 7. En la Gráfica 6 se observa que las subfracciones que presentan considerable actividad antilarvaria son la RA'-1 y la RA'-2, que son aquellas de carácter más apolar.

Se hizo un análisis de varianza para comparar las actividades de las subfracciones obtenidas de R-A' y se encontró que sí hay diferencia significativa entre la actividad de las subfracciones al cuarto día, con una probabilidad $p < 10^{-4}$ (Tabla E.5).

La prueba de Student-Newman-Keuls muestra que la actividad de las dos primeras subfracciones, RA'-1 y RA'-2, es similar y que esta actividad difiere significativamente respecto de las otras dos subfracciones, RA'-3,4 y RA'-5,6, al 95% de confianza (Tabla E.6).



Gráfica 6. Mortalidad corregida de *A. albimanus* expuestas a subfracciones preliminares de raíz de *S. auriculata*. (Proporción bioensayada 1:10,000)

Tabla 7

Mortandad cumulativa corregida de larvas de *A. albimanus* expuestas a subfracciones preliminares de raíz de *S. auriculata* (1)

FRACCION	DIA	MORTANDAD (%) (2)	DESV. STD.
RA'-1(3)	1	0	0
	2	99	2
	3	100	0
	4	100	0
RA'-2(3)	1	24	23
	2	100	0
	3	100	0
	4	100	0
RA'-3,4(4)	1	0	0
	2	5	8
	3	36	20
	4	58	13
RA'-5,6(5)	1	1	2
	2	1	2
	3	3	2
	4	6	7
CONTROL AGUA	1	1	2
	2	2	2
	3	4	4
	4	4	4

- (1) A una proporción de 1:1,000. Resultados promedio de 6 réplicas
 (2) ANOVA: $F=211.48$ $p<10^{-4}$
 (3) Difiere significativamente (95% Conf.) de RA'-3,4 y de RA'-5,6
 (4) Difiere significativamente (95% Conf.) de RA'-1 y de RA'-2
 (5) Difiere significativamente (95% Conf.) de las demás subfracciones

La cromatografía de capa fina mostró, al revelar con vainillina, que las subfracciones RA'-1 y RA'-2 poseen una mancha morada con Rf de 0.68 y 0.64, respectivamente.

te. La subfracción RA'-3,4 presenta esta mancha (Rf=0.68) pero con poca intensidad, no así la RA'-5,6 (Tabla 8 y Figura F.1).

Tabla 8

Componentes de las subfracciones preliminares de raíz de *S. auriculata* observados en los cromatogramas en capa fina(1)

FRACCION	TIPO DE REVELADO			
	VISIBLE	UV (254 nm)	UV (366 nm)	VAINILLINA
RA'-1	0.64 Amarillo	0.66 Obsc.	0.66 Celeste	0.68 Morado
RA'-2	0.57 Cafe	0.62 0.56 0.58	0.63 Celeste 0.52 Celeste	0.30, 0.38 Cafe 0.53 Azul 0.57 Cafe-rojo 0.64 Morado
RA'-3,4	0.65 Verde 0.51 Verde	0.67, 0.38 0.29	0.32 Celeste	0.21 Azul 0.27, 0.32 Cafe claro 0.68 Morado claro
RA'-5,6	----	----	0.33 Celeste	0.17 Cafe 0.43, 0.62 Cafe claro

(1) Se usó cloroformo como fase móvil y cromatofolios Al de Silica gel 60 F-254 (Merck) como fase estacionaria

b. Subfracciones del extracto crudo de hoja.

De la fracción activa del extracto crudo de hoja, H-A', se obtuvieron seis subfracciones, las cuales se compararon por cromatografía de capa fina,

luego combinándose las similares y quedando sólo cinco subfracciones (Figura 8). La identificación de estas subfracciones indica el orden en que fueron eluidas de la columna cromatográfica y las subfracciones originales que se unieron.

Los resultados del bioensayo de las subfracciones obtenidas se presentan en la Tabla 9 (ver Gráfica 7). Se puede observar que las dos primeras subfracciones, HA'-1 y HA'-2, poseen actividad antilarvaria considerable y las demás subfracciones actividades mucho menores.

Se hizo un análisis de varianza (Tabla E.7) para comparar la actividad antilarvaria de estas subfracciones al cuarto día y se encontró que sí hay una diferencia significativa, con probabilidad $p < 10^{-4}$. El análisis de Student-Newman-Keuls (Tabla E.8) indica que la actividad de las dos primeras subfracciones, HA'-1 y HA'-2, son semejantes y éstas difieren del resto, al 95% de confianza.

Tabla 9

Mortandad cumulativa corregida de larvas de *A. albimanus* expuestas a subfracciones preliminares de hoja de *S. auriculata* (1)

FRACCION	DIA	MORTANDAD (%) (2)	DESV. STD.
HA'-1(3)	1	0	0
	2	99	2
	3	99	2
	4	99	2
HA'-2(3)	1	4	10
	2	67	13
	3	99	2
	4	100	0
HA'-3(4)	1	1	2
	2	5	8
	3	18	16
	4	25	22
HA'-4(5)	1	0	0
	2	0	0
	3	1	2
	4	6	6
HA'-5,6(5)	1	2	3
	2	2	3
	3	2	3
	4	7	7
CONTROL AGUA	1	1	2
	2	2	2
	3	4	4
	4	4	4

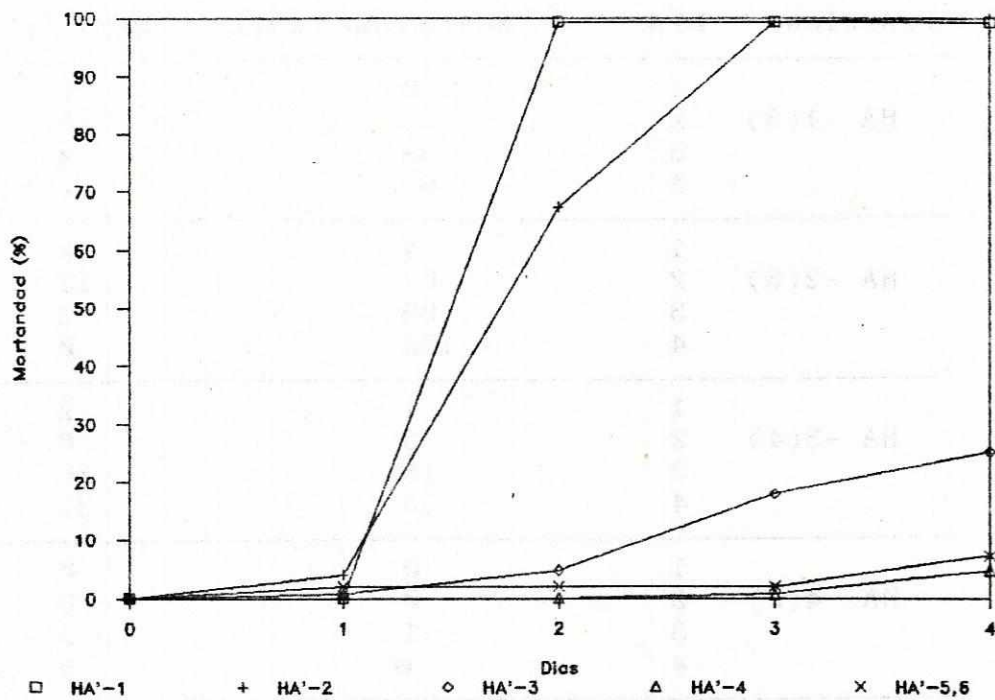
(1) A una proporción de 1:1,000. Resultados promedio de 6 réplicas

(2) ANOVA: $F=120.93$ $p<10^{-4}$

(3) Difiere significativamente (95% Conf.) de HA'-3, de HA'-4 y de HA'-5,6

(4) Difiere significativamente (95% Conf.) de las demás sustracciones

(5) Difiere significativamente (95% Conf.) de HA'-1, de HA'-2 y de HA'-3



Gráfica 7. Mortalidad corregida de larvas de *A. albimanus* expuestas a subfracciones preliminares de hoja de *S. auriculata*. (Proporción bioensayada 1:10,000)

La cromatografía de capa fina de estas subfracciones, al revelar con vainillina, muestra la mancha morada-azul ($R_f = 0.68$) que se observó en las subfracciones activas del extracto crudo de raíz, en las subfracciones activas HA'-1 y HA'-2, y con menor intensidad en las subfracciones HA'-3, HA'-4 y HA'-5,6.

Tabla 10

Componentes de las subfracciones preliminares de hoja de *S. auriculata* observados en los cromatogramas en capa fina. (1)

FRACCION	TIPO DE REVELADO			
	VISIBLE	UV (254 nm)	UV (366 nm)	VAINILLINA
HA'-1	0.64 Amarillo 0.62 Amarillo	0.67 Obsc.	0.66 Celeste	0.68 Morado
HA'-2	--	0.59 Obsc.	0.62 Celeste	0.50 Azul-morado 0.56 Morado claro
HA'-3	--	0.62 0.47	0.52 Celeste	0.26, 0.31 Cafe 0.53, 0.56 Morado claro
HA'-4	--	0.67, 0.38 0.38	0.32 Celeste	0.20 Azul obsc. 0.26 Cafe 0.38, 0.56 Morado claro 0.70 Morado claro
HA'-5,6	0.41 Cafe 0.17 Amarillo 0.08 Amarillo	--	0.39 Rojo 0.25 Rojo	0.00 Oscuro 0.20 Azul Obsc. 0.13 Azul 0.31, 0.41, 0.56, 0.64 Morado

(1) Se usó cloroformo como fase móvil y cromatofolios Al de Silica gel 60 F-254 (Merck) como fase estacionaria

c. Comparación de subfracciones de extractos crudos de raíz y hoja. Se observó similitud en los resultados de los fraccionamientos de los extractos crudos de raíz y de hoja. El patrón de actividad antilarvaria fue el mismo, ya que las subfracciones eluidas con hexano y hexano-tolueno 1:1 (v:v), RA'-1 y 2, y HA'-1 y 2, mostraron la mayor mortandad (aproximadamente 100% al segundo o tercer día).

Segun indican los datos en las Tablas 8 y 10, los cromatogramas en capa fina de las subfracciones HA'-1 y RA'-1 son similares. Se considera que el(los) principio(s) activo(s) está(n) incluido(s) en la mancha que al revelar con vainillina se ve morada con $R_f=0.68$. La actividad observada en las segundas subfracciones, HA'-2 y RA'-2, se debe a que el(los) principio(s) activo(s) no fue(ron) eluido(s) en forma completa como parte de la primera subfracción, sino que terminó(aron) de salir en la segunda. Se observa en las Tablas 9 y 11 que las subfracciones HA'-2 y RA'-2 también contienen la mancha morada antes mencionada con $R_f=0.64-0.66$. En forma más tenue, esta mancha aún se observa en algunas de las subfracciones subsiguientes.

Se obtuvo el espectro infrarrojo (IR) (espectrofotó-

metro 735B Perkin-Elmer) de las subfracciones activas, preparadas en pastillas de bromuro de potasio. El espectro IR de RA'-1 (Figura 11) muestra la presencia de grupos metilo y metilenos (2900-2850 cm-1, 1460 cm-1 y 720 cm-1), metilos geminales (1390 cm-1, 1200 cm-1 y 1040 cm-1), carbonilos (1740) y vibraciones de carbono-oxígeno en 1260 cm-1 (podría ser un grupo éster o un éter). El espectro IR de HA'-1 (Figura 12) muestra grupos funcionales similares: metilos y metilenos (2850-2800 cm-1, 1540 cm-1), metilos geminales (1360 cm-1 y 1040 cm-1), grupo carbonilo (1640) y una vibración C-O (1240 cm-1) de un éster o un éter. (De estas subfracciones no se sacó espectro de resonancia magnética nuclear de protones.)

Figura II. Espectro infrarrojo de la subfracción preliminar RA'-1 de *S. auriculata*. (En pastilla de KBr. Modo de barrido "Survey". Espectrómetro PERKIN-ELMER, mod. 135 B)

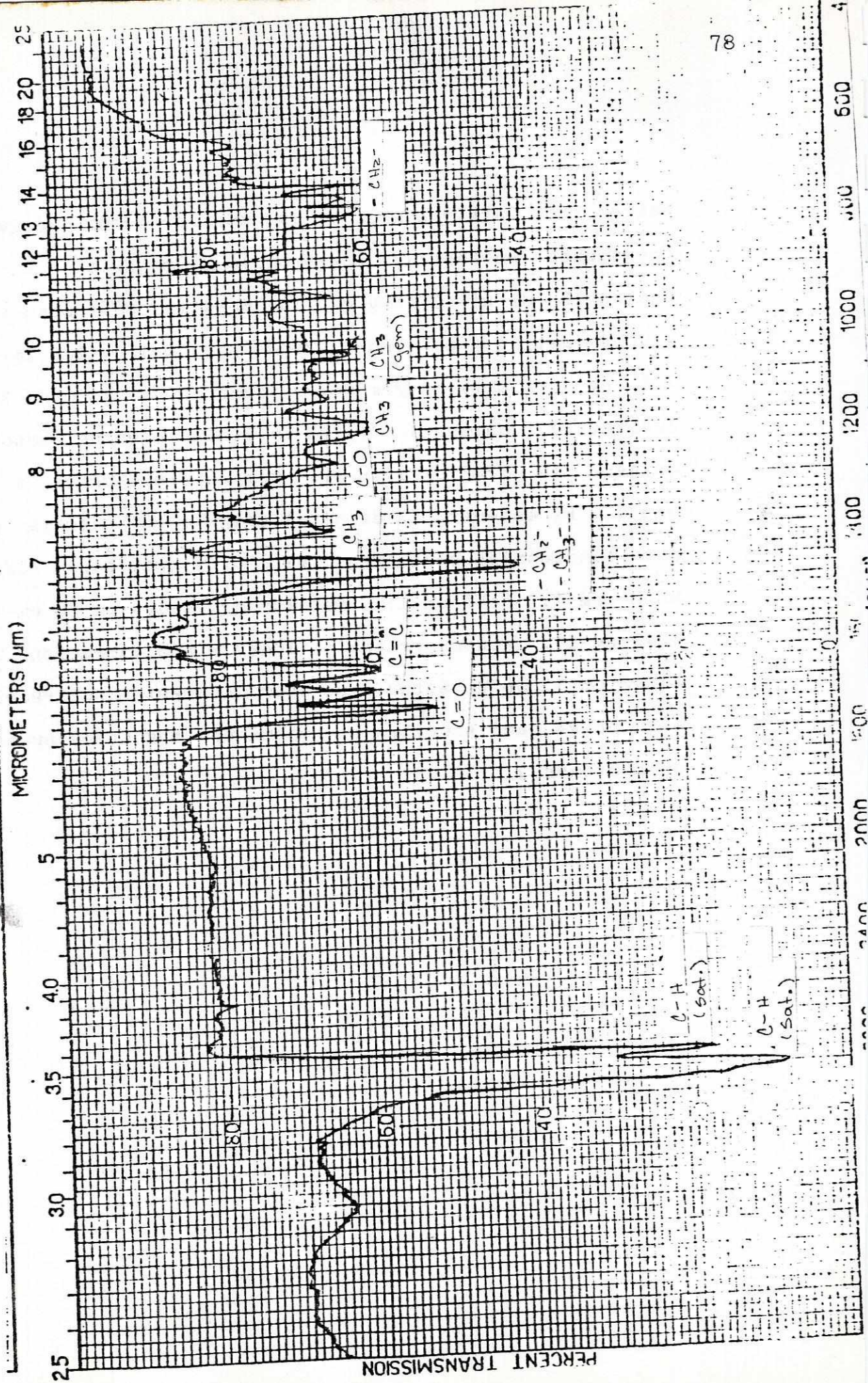
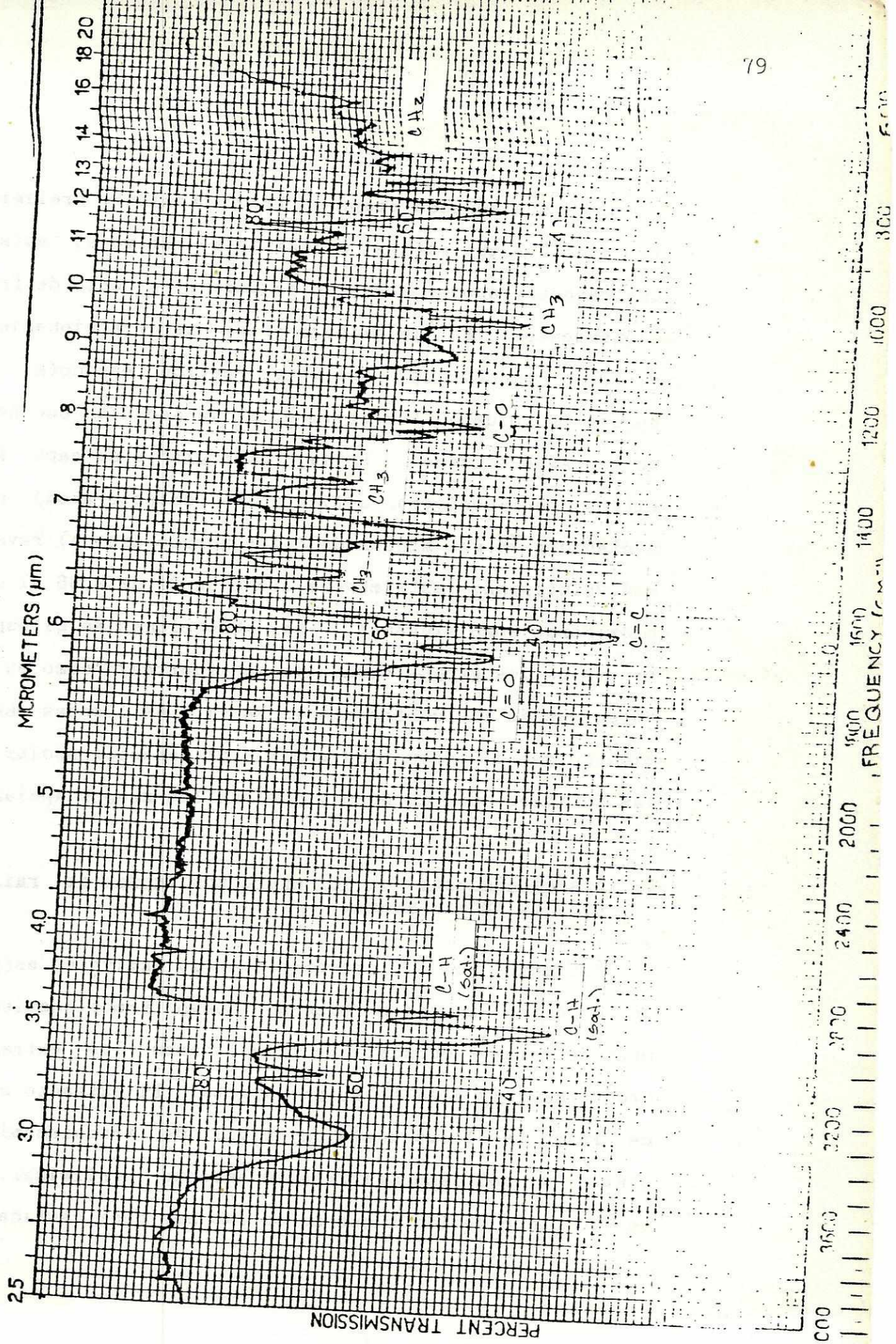


Figura 12. Espectro infrarrojo de la subfracción preliminar HA'-1 de *S. auriculata*; (En pastilla de KBr. Modo de barrido "Survey". Espectrómetro Perkin-Elmer, mod. 435 B)



Con esta segunda etapa de fraccionamiento preliminar se concluye que el(los) principio(s) activo(s) es(son) de carácter apolar según lo sugiere el proceso de fraccionamiento. En la primera etapa de fraccionamiento el(los) compuesto(s) activo(s) fue(ron) eluido(s) con tolueno y tolueno-éter etílico; en la segunda, con hexano y hexano-tolueno. En la cromatografía de capa fina el(los) compuesto(s) activo(s) se detectó(aron) como contenidos en una mancha de color morado-azul al revelar con vainillina; esta mancha tiene un Rf de 0.66 al usar cloroformo como eluyente. Las absorciones en el espectro IR de los grupos carbonilo son fuertes; como en los espectros de las subfracciones RA'-1 y HA'1 estas absorciones son de intensidad media, el carácter apolar de las subfracciones es poco y dominan los grupos apolares.

C. Fraccionamiento de los extractos crudos de raíz y hoja en escala grande

Sabiendo que el(los) principio(s) activo(s) es(son) de carácter apolar se hizo un nuevo fraccionamiento, pero en mayor escala. Se fraccionaron los extractos crudos de raíz y de hoja, por aparte. El extracto crudo de raíz se llevó hasta un nivel de fraccionamiento similar al del caso del fraccionamiento preliminar. No se continuó debido a que se obtuvo muy poca cantidad de

la subfracción activa. Por otra parte, el extracto crudo de hoja se llevó a niveles de fraccionamiento más avanzados que en el caso del fraccionamiento preliminar, logrando aislar una subfracción activa con menor número de componentes que lo logrado anteriormente.

1. Primera etapa de fraccionamiento de los extractos crudos. El fraccionamiento en escala grande se hizo de una forma diferente de como se hizo el fraccionamiento preliminar, buscando así aislar el principio activo por medio de un proceso más corto. El extracto crudo se disolvió en hexano-éter etílico 1:1 (v:v) y el sólido insoluble se descartó, habiendo chequeado por cromatografía de capa fina y revelado con vainillina que éste no presentaba la mancha morada-azul que contiene el principio activo. La parte soluble se trató por cromatografía de columna abierta como se indica en la Figura 9. La primera fracción recogida, R-A y H-A, en cada caso, eluida con hexano-éter etílico 1:1 (v:v), estaba constituida por una banda amarilla. La segunda, R-B y H-B, en cada caso, se eluyó con el mismo solvente, pero al haber terminado de eluir la banda amarilla.

Se hizo cromatografía de capa fina de las fracciones recogidas. La fracción de la banda amarilla, R-A y H-A,

fue la única que mostró el componente morado-azul característica del principio activo ($R_f=0.65-0.67$ al eluir con cloroformo). En la Tabla 11 se describen los cromatogramas de las fracciones del extracto crudo de raíz y en la Tabla 12 las del extracto crudo de hoja. Estas fracciones no fueron bioensayadas porque se consideró suficiente la presencia de la mancha morada-azul antes mencionada como evidencia de actividad antilarvaria.

Se evaporó el solvente de las fracciones R-A y H-A y éstas se redisolviéron en hexano para continuar el fraccionamiento.

Tabla 11

Componentes de las fracciones del extracto crudo de raíz de *S. auriculata* observados en los cromatogramas en capa fina. (1)

FRACCION	TIPO DE REVELADO			
	VISIBLE	UV (254 nm)	UV (366 nm)	VAINILLINA
R-A	-----	0.60 oscuro 0.28, 0.11	0.63 celeste 0.21 verde-cafe	0.67 azul intenso 0.62 celeste 0.47 rosado 0.31 verde 0.13 morado 0.05 celeste
R-B	0.55 cafe	0.35 tenue	0.45 rojo 0.33 rojo	0.37 azul-celeste

(1) Se usó cloroformo como fase móvil y cromatofolios Al de Silica gel 60 F-254 (Merck) como fase estacionaria

Tabla 12

Componentes de las fracciones del extracto crudo de hoja de *S. auriculata* observados en los cromatogramas en capa fina. (1)

FRACCION	TIPO DE REVELADO			
	VISIBLE	UV (254 nm)	UV (366 nm)	VAINILINA
H-A	0.64 amarillo	0.63 oscuro	0.64 celeste	0.60 azul intenso 0.35, 0.26 azul tenue
H-B	0.76 amarillo	0.27, 0.15	0.49, 0.28	0.49, 0.28
	0.27 verde	0.04	0.19, 0.15	0.19, 0.15 verdes
	0.15 verde		0.08, 0.03	0.10 azul
	0.07 amarillo		rojos	0.06, 0.02 café

(1) Se usó cloroformo como fase móvil y cromatofolios Al de Silica gel 60 F-254 (Merck) como fase estacionaria

2. Segunda etapa de fraccionamiento de los extractos crudos

a. Subfracciones del extracto crudo de raíz.

La fracción R-A obtenida se trató por cromatografía de columna abierta sobre Florisil, usando como eluyentes hexano, hexano-tolueno 1:1 (v:v), hexano-tolueno 1:1 (v:v) con 1% de acetona y tolueno con 1% de acetona según se indica en la Figura 9. Se utilizó acetona debido a que el Florisil no se desactivó con anticipación y estaba reteniendo parte del material introducido en la columna. Por la manera en que se hizo la elución, el principio activo no salió únicamente en

la primera subfracción RA-1, la más apolar, sino también en la segunda, RA-2. Esto se deduce al observar los resultados de los bioensayos de las subfracciones (ver Tabla 13 y Gráfica 8) y de la cromatografía de capa fina realizada (Tabla 14).

El análisis de varianza muestra que hay diferencia significativa entre la actividad de las fracciones al cuarto día (Tabla E.9), con probabilidad $p < 10^{-4}$. El análisis de Student-Newman-Keuls muestra que las subfracciones RA-1 y RA-2 son semejantes en actividad antilarvaria, y difieren de la subfracción RA-3,4, con un 95% de confianza (Tabla E.10). Esta diferencia se debe a que las dos primeras subfracciones presentan una fuerte actividad antilarvaria (alrededor del 100% al 4to. y 3er. día, respectivamente) en comparación de la RA-3,4 que tiene un efecto despreciable (2% al 4to. día).

La cromatografía de capa fina (Tabla 14 y Figura F.2) muestra que las subfracciones RA-1 y RA-2 presentan en forma importante el componente morado-azul, al revelar con vainillina, el principio activo que se está siguiendo; la siguiente subfracción, RA-3,4, la presenta en forma muy tenue.

Debido a la poca cantidad remanente de las subfracciones RA-1 y RA-2, menos de 100 mg entre ambas, en esta etapa se detuvo el fraccionamiento del extracto crudo de raíz. Dado que se comprobó la similitud entre las fracciones activas de la raíz y de la hoja, se consideró que el continuar únicamente con el fraccionamiento del extracto crudo de hoja era satisfactorio para los objetivos de este trabajo.

Tabla 13

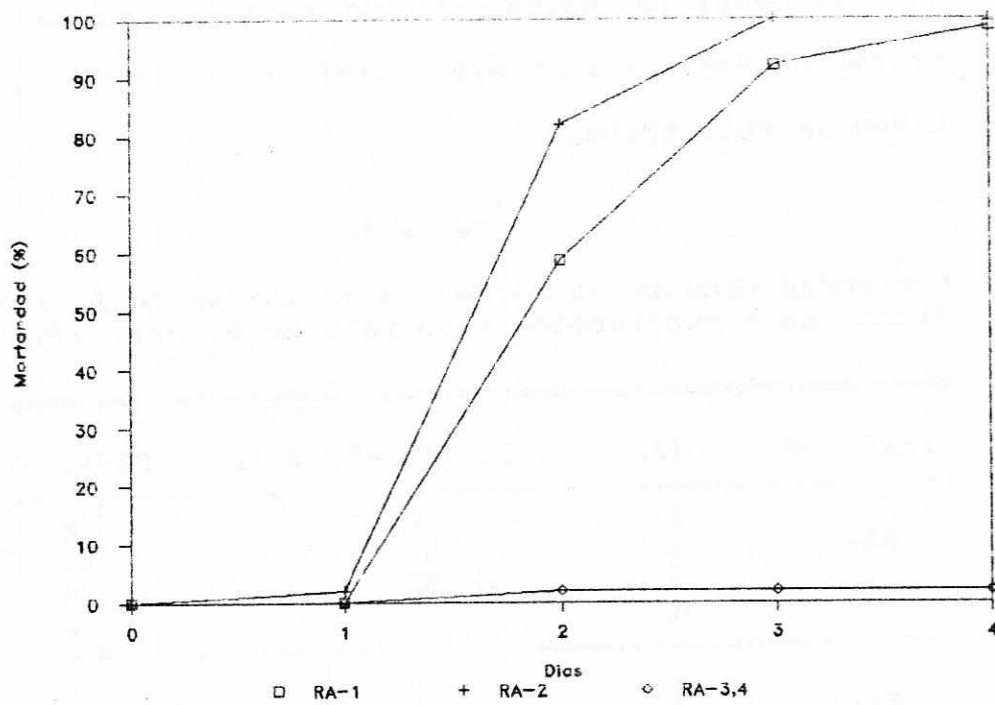
Mortandad cumulativa corregida de larvas de *A. albimanus* expuestas a subfracciones de raíz de *S. auriculata*. (1)

FRACCION	DIA	MORTANDAD (%) (2)	DESV. STD.
RA-1	1	0	0
	2	59	12
	3	92	4
	4	99	2
RA-2	1	2	3
	2	82	3
	3	100	0
	4	100	0
RA-3,4(3)	1	0	0
	2	2	3
	3	2	3
	4	2	3
CONTROL AGUA	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0

1) A una proporción de 1:10,000. Resultados promedio de 3 réplicas

2) ANOVA: $F=1446.3$ $p<10^{-4}$

3) Difiere significativamente (95% Conf.) de RA-1 y de RA-2



Gráfica 8. Mortandad corregida de larvas de *A. albimanus* expuestas a subfracciones de raíz de *S. auriculata*. (Proporción bioensayada 1:10,000)

Tabla 14

Componentes de las subfracciones de raíz de *S. auriculata* observadas en los cromatogramas en capa fina. (1)

FRACCION	TIPO DE REVELADO			
	VISIBLE	UV (254 nm)	UV (366 nm)	VAINILLINA
RA-1	--	0.50 Obsc.	0.64 Celeste	0.52, 0.64 Morado-Azul 0.71 Café
RA-2	--	0.54 Obsc.	0.60 Celeste 0.23 Rojo	0.55, 0.66 Morado-azul 0.45 Café 0.35, 0.38 Azul 0.23 Café-rojo
RA-3,4	--	0.54 Obsc. 0.40	0.32 Celeste	0.23 Café-rojo 0.30 Azul 0.40 Amarillo 0.47 Café-rojo 0.54 Morado claro 0.66 Morado claro

1 Se usó hexano-acetato de etilo 8:2 (v:v) como fase móvil y cromatofolios Al de Sílica gel 60 F-254 (Merck) como fase estacionaria

b. Subfracciones del extracto crudo de hoja.

La fracción H-A se disolvió en hexano y se trató por cromatografía de columna abierta sobre Florisil según lo indicado en la Figura 10; se usó como eluyente hexano con 1% de acetona, para desactivar el Florisil. Se separó una banda amarilla que se recogió como la fracción activa HA-1; después se lavó la columna con acetona. Según se indica en la Tabla 15, se detectó, por desarrollo con vainillina de la cromatografía de capa fina, que

en la fracción HA-1 está presente el componente morado-azul que se siguió como el que contiene el principio activo; y que esta mancha, en cambio, no se detectó en la parte eluida con acetona (Tabla 15).

Tabla 15

Componentes de las subfracciones de H-A de *S. auriculata* observados en los cromatogramas en capa fina. (1)

FRACCION	TIPO DE REVELADO			
	VISIBLE	UV (SW) (254 nm)	UV (LW) (366 nm)	VAINILLINA
HA-1	0.59 amarillo	0.62 oscuro	0.66 celeste 0.59 celeste	0.65 azul intenso 0.35, 0.26 azul tenue
HA-2	-----	0.38, 0.31 0.08	0.39, 0.33 0.22, 0.08 celestes	0.33 morado 0.22 café 0.11 azul

(1) Se usó cloroformo como fase móvil y cromatofolios Al de Sílica gel 60 F-254 (Merck) como fase estacionaria

3. Tercera etapa de fraccionamiento del extracto crudo de hoja. La fracción activa HA-1 fue llevada a sequedad y redisuelta en hexano. Se hizo cromatografía usando placa preparativa. La fracción se colocó a lo largo de uno de los bordes de la placa; ésta se corrió dos veces y luego se partió en cuatro regiones de acuerdo al patrón observado con luz ultravioleta (254

y 366 nm). Según lo indicado en la Figura 10, a la fracción que se movió menos (Rf menor) se le nombró HA-1.1 y a las subsiguientes se les llamó HA-1.2, HA-1.3 y HA-1.4.

Se hizo un bioensayo de estas cuatro subfracciones para determinar su efecto sobre las larvas de *A. albimanus* (Tabla 16, Gráfica 9). Aquí se observó que dos subfracciones son las que presentan la mayor actividad antilarvaria, la HA-1.1 y la HA-1.4. La subfracción HA-1.4 dio una mortandad del 98% al tercer día; se esperaba que esta subfracción fuera activa ya que según los datos en la Tabla 17 y Figura F.3 es la única que incluye la mancha morada-azul al revelar la placa de cromatografía de capa fina con vainillina (Rf=0.66, usando hexano-acetato de etilo 9:1 como eluyente); esta fracción es la mayoritaria y se obtuvieron 680 mg de ella. La subfracción HA-1.1 causó 100% de mortandad al segundo día; esta subfracción no incluye la mancha morada-azul que se encuentra en la subfracción HA-1.4 y que hasta ahora se había seguido como la que contiene al(los) principio(s) activo(s), por lo que se deduce que su actividad se debe a un segundo principio activo; de esta subfracción se obtuvieron sólo 26 mg. De la subfracción HA-1.2 se obtuvo 50 mg y de la HA-1.3 96 mg.

Tabla 16

Mortandad cumulativa corregida de larvas de *A. albimanus* expuestas a subfracciones de HA-1 de *S. auriculata*. (1)

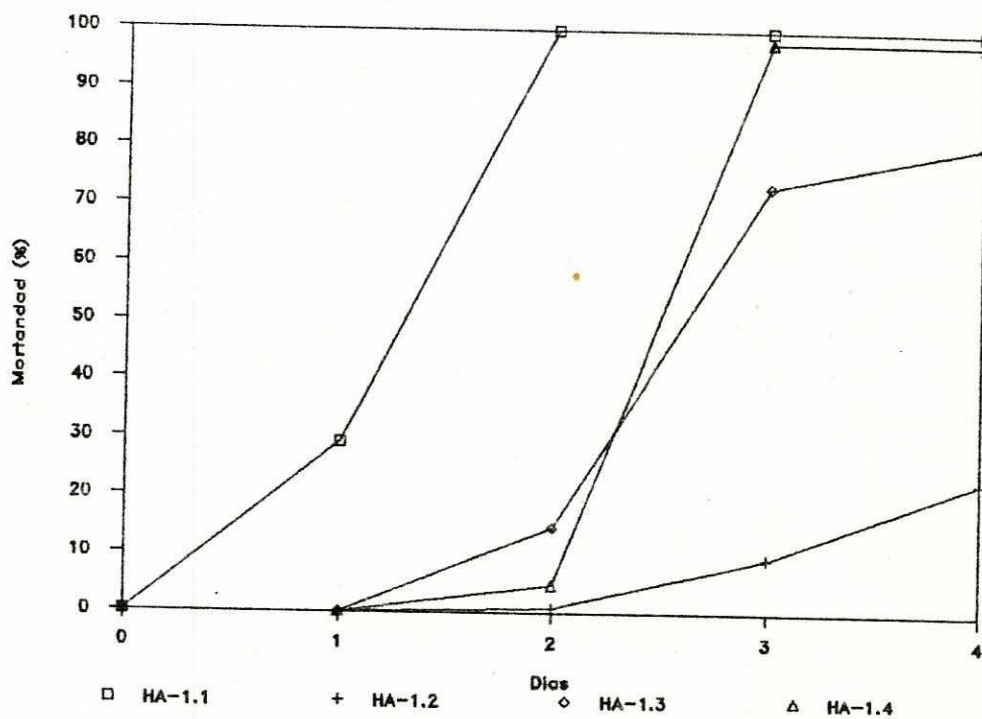
FRACCION	DIA	MORTANDAD (%) (2)	DESV. STD.
HA-1.1(3)	1	29	15
	2	100	0
	3	100	0
	4	100	0
HA-1.2(4)	1	0	0
	2	1	2
	3	9	9
	4	23	11
HA-1.3(4)	1	0	0
	2	15	5
	3	73	11
	4	81	6
HA-1.4(3)	1	0	0
	2	5	3
	3	98	5
	4	98	5
CONTROL AGUA	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0

(1) A una proporción de 1:10,000. Resultados promedio de 6 réplicas.

(2) ANOVA: $F=137.77$ $p<10^{-4}$

(3) Difiere significativamente (95% Conf.) de HA-1.2 y de HA-1.3

(4) Difiere significativamente (95% Conf.) de las demás subfracciones



Gráfica 9. Mortalidad corregida de larvas de *A. albimanus* expuestas a subfracciones de HA-1 de *S. auriculata*. (Proporción bioensayada 1:10,000)

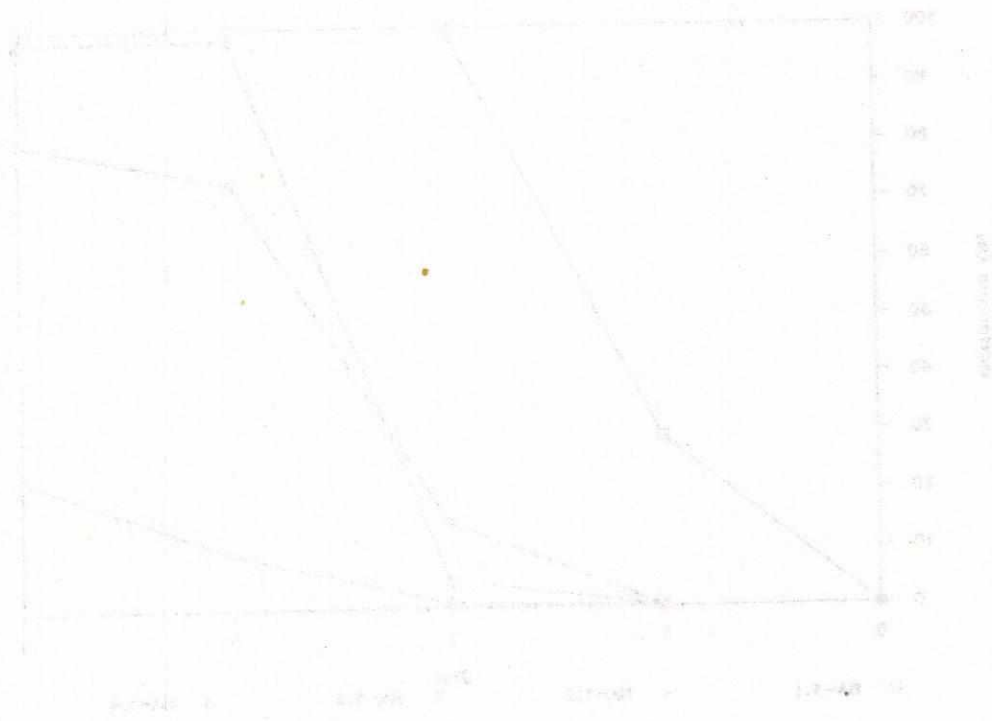


Fig. 8. Temperature dependence of the rate of polymerization of styrene in the presence of benzoyl peroxide at 100°C. The curves correspond to different concentrations of the initiator: 1 - 0.01 mole/l., 2 - 0.02 mole/l., 3 - 0.04 mole/l.

Tabla 17

Componentes de las subfracciones de HA-1 de *S. auriculata* observados en los cromatogramas en capa fina. (1)

FRACCIÓN	TIPO DE REVELADO			
	VISIBLE	UV (366 nm) (254 nm)	UV (254 nm) (366 nm)	F U O R F L U O R I M E T R I A
HA-1.1	0.29 Amarillo	0.10, 0.29 0.37, 0.05	0.29, 0.34 0.51 Celestes	0.41, 0.37, 0.34, 0.31 Morado 0.28 azo; 0.25, 0.17 Morado 0.10, 0.03 Morado 0.2 Rojo-morado
HA-1.2	0.42 Amarillo	0.38 Obsc. 0.41 Obsc.	0.43 Celeste 0.49 Celeste	0.42 Morado 0.34 Morado
HA-1.3	0.50 Amarillo	0.54 Obsc.	0.43 Celeste 0.49 Celeste	0.54 Azul tenue 0.49 Morado-azul 0.03 Rojo intenso
HA-1.4	--	0.42 Obsc. con Fluores- cencia azul	0.48 Celeste	0.66 Azul-morado

(1) Se usó hexano-acetato de etilo 9:1 (v/v) como fase móvil y cromatofolios Al de Sílica gel 60 F-254 (Merck) como fase estacionaria

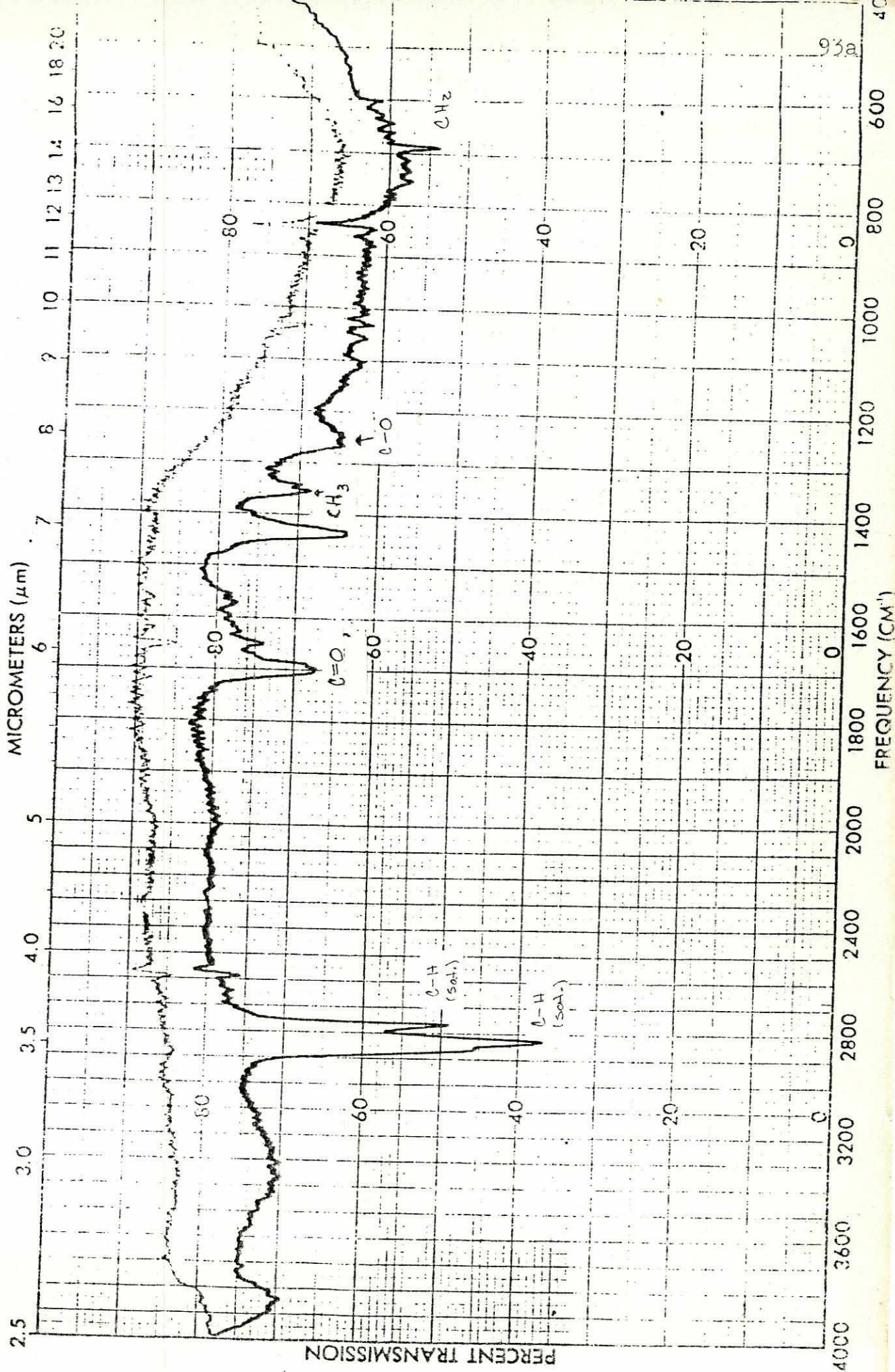
Se hizo un análisis de varianza (Tabla E.11) de la actividad de las subfracciones y éste muestra una diferencia significativa entre ellas ($p < 10^{-4}$). El análisis de Student-Newman-Keuls muestra que la actividad de las subfracciones HA-1.1 y HA-1.4 es similar al 95% de confianza y que difieren del resto. Además la subfracción HA-1.3 difiere en actividad a la HA-1.2, con un 95% de confianza (Tabla E.12). La actividad en las subfraccio-

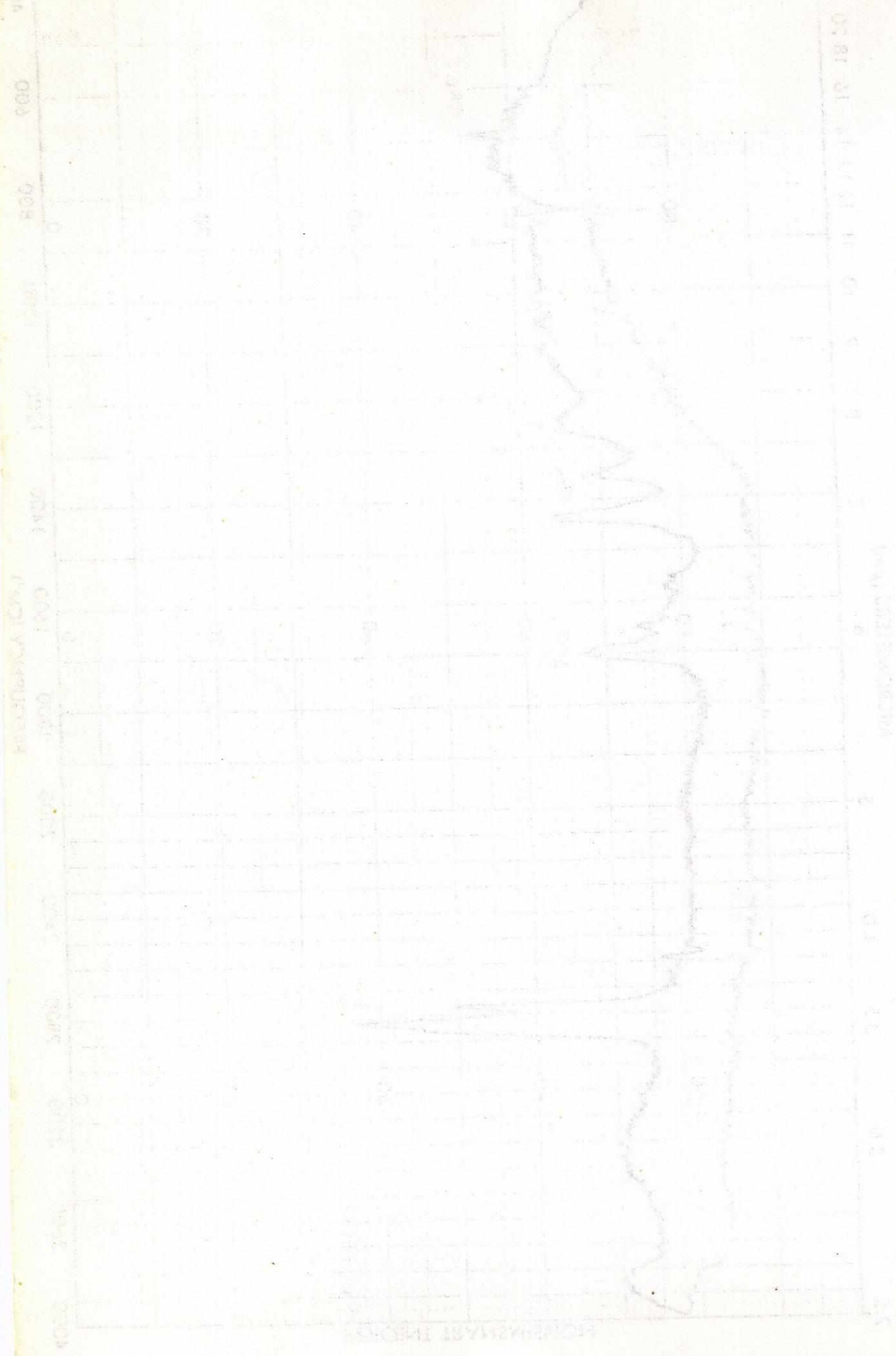
nes intermedias se explica por un traslape con las más más activas. Es de notarse la alta actividad de la subfracción HA-1.3, que causó un 81% de mortandad al cuarto día y no muestra la mancha morada-azul presente en la HA-1.4.

Se obtuvo el espectro de resonancia magnética nuclear de protones ($^1\text{H-NMR}$) de la subfracción HA-1.1 (Figura 14), usando tetrametilsilano (grado NMR, Aldrich) como estándar interno y tetracloruro de carbono como solvente. Su espectro presenta una señal muy débil en 7.0 ppm que podría corresponder a hidrógenos en estructuras aromáticas y dos señales intensas en 1.1 y en 0.7 ppm, correspondientes a hidrógenos de grupos metilo y metileno en cadenas alifáticas.

El espectro infrarrojo de la subfracción HA-1.1 (Figura 13) muestra en 2850-2750 cm^{-1} absorciones de vibraciones C-H en cadenas alifáticas. En 1700 cm^{-1} hay una absorción por la presencia de un grupo carbonilo (C=O). La banda en 1260-1240 cm^{-1} puede deberse a vibraciones carbono-oxígeno. En 1440 cm^{-1} se indica la presencia de metilos o metilenos, y en 1360-1340 cm^{-1} la posible presencia de metilos geminales. En 690 cm^{-1} la absorción se debe a grupos metilenos. No hay evidencia

Figura 13. Espectro infrarrojo de la subfracción HA-1.1 de *S. auriculata*. (Fase líquida, sobre celda de AgCl. Modo de barrido "Survey". Espectrómetro PERRIN-ELMER, mod. 735B)





The graph shows the response of the system to a step change in the input signal. The signal is applied at approximately 10 seconds, causing a sharp increase in the output signal. The system exhibits overshoot and oscillatory behavior before settling to a new steady-state value.

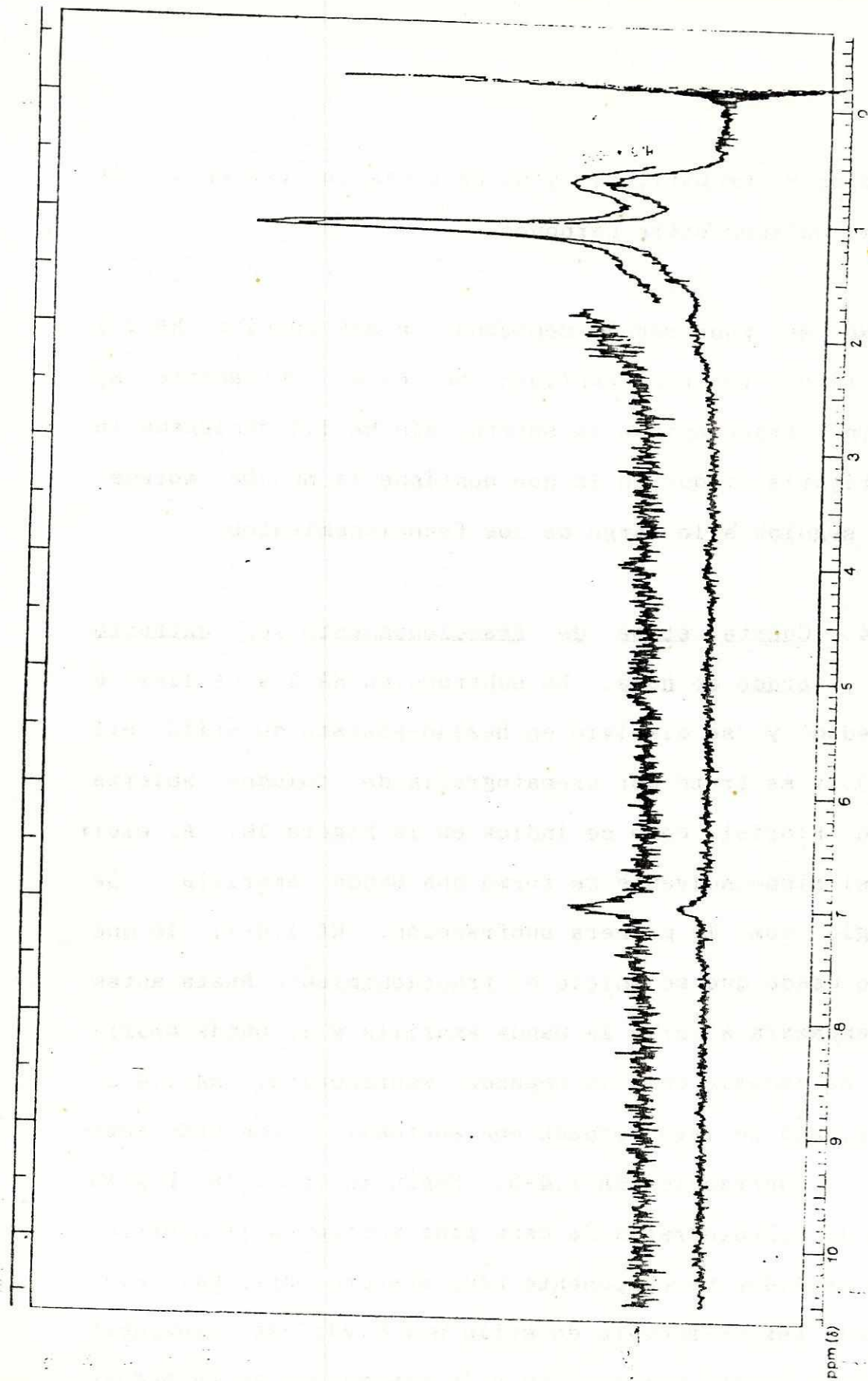


Figura 14. Espectro 1H-NMR de la subfracción HA-1.1 de *S. auriculata*. (Solvente: CCl₄. Referencia: TMS. Tiempo de barrido: 5 min. Ancho de barrido: 10 ppm. Final de barrido: 0 ppm. Amplitud de espectro: 8000. Filtro: 0.05 seg. Potencia Rf: 0.04 mG. Posición de Lock: 0 ppm. Potencia de Lock: 0.01 mG. Espectrómetro VARIAN, EM-360E)

de grupos aromaticos, y no es clara la presencia de dobles enlaces entre carbonos.

No se pudo seguir separando la subfracción HA-1.1 por tener tan poca cantidad de ella, únicamente se continuó fraccionando la subfracción HA-1.4 designada la mayoritaria y que es la que contiene la mancha morada-azul seguida a lo largo de los fraccionamientos.

4. Cuarta etapa de fraccionamiento del extracto crudo de hoja. La subfracción HA-1.4 se llevó a sequedad y se disolvió en hexano-acetato de etilo 9:1 (v:v) y se trató por cromatografía de columna abierta sobre Florisil como se indica en la Figura 10. Al eluir con el mismo solvente se formó una banda amarilla. Se recogió como la primera subfracción, HA-1.4-1, lo que eluyó desde que se inició el fraccionamiento hasta antes que empezara a salir la banda amarilla y la banda amarilla se recogió como la segunda subfracción, HA-1.4-2. La columna se lavó después con acetona, recogiendo esto como la subfracción HA-1.4-3. Según la Tabla 19 (Figura F.4) la cromatografía de capa fina mostró en la subfracción HA-1.4-2 un componente azul oscuro ($R_f=0.60$, eluyente: hexano-acetato de etilo 9:1 v:v); se consideró que esta mancha corresponde a la mancha que se ha segui-

do como la que contiene el(los) principio(s) activo(s). La subfracción HA-1.4-1 mostró una mancha morada similar a la de la HA-1.4-2, pero más alargada y con la parte más intensa un poco más abajo ($R_f=0.55$).

Los datos del bioensayo muestran que la actividad se encuentra principalmente en la HA-1.4-2 (Tabla 18, Gráfica 10). Por escasez de larvas al momento de iniciar este bioensayo se utilizaron seis réplicas para la subfracción HA-1.4-1, pero solamente tres réplicas para las otras dos subfracciones, siendo dos de éstas de 25 larvas y la tercera de 5.

Al hacer un análisis de varianza de la actividad de las subfracciones obtenidas se encontró una diferencia significativa entre las subfracciones ($p=0.0004$) lo que se debe a que la subfracción HA-1.4-2 es la única con alta actividad (Tabla E.13). El análisis de Student-Newman-Keuls muestra que la subfracción HA-1.4-2 difiere significativamente de las otras dos, al 95% de confianza (Tabla E.14).

Tabla 18

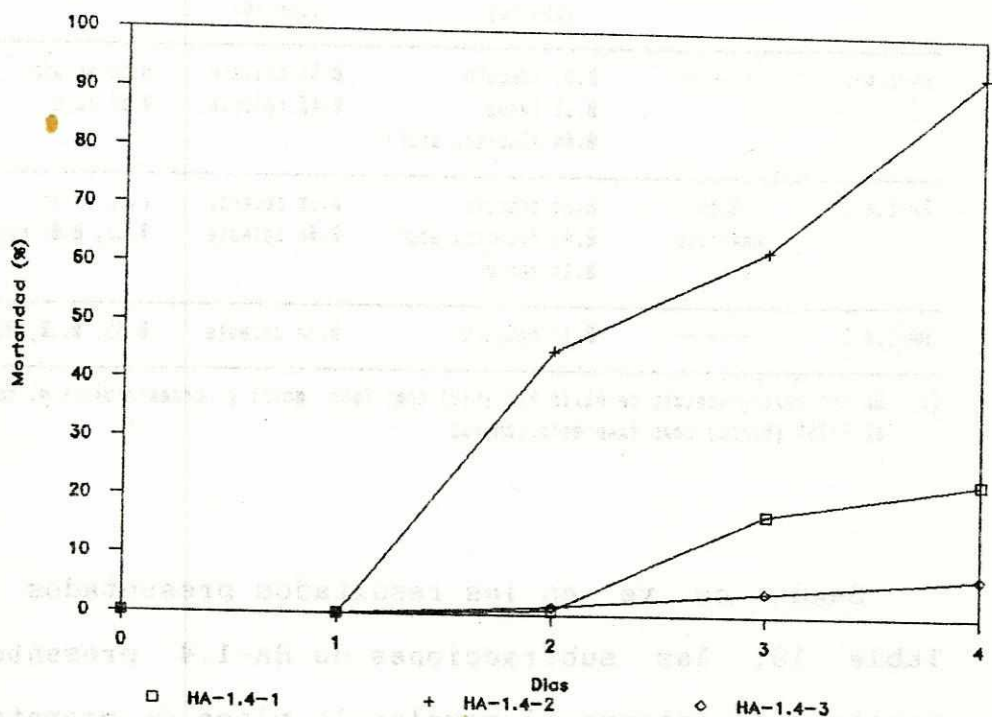
Mortandad cumulativa corregida de larvas de *A. albimanus* expuestas a subfracciones de HA-1.4 de *S. auriculata*. (1)

FRACCION	DIA	MORTANDAD (%) (2)	DESV. STD.
HA-1.4-1	1	0	0
	2	1	2
	3	17	21
	4	23	24
HA-1.4-2(3)	1	0	0
	2	45	6
	3	63	16
	4	93	6
HA-1.4-3	1	0	0
	2	1	2
	3	4	4
	4	7	6
CONTROL AGUA	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	4	2	3

(1) A una proporción de 1:20,000. Resultados promedio de 6 réplicas.

(2) ANOVA: $F=20.555$ $p=0.0004$

(3) Difiere significativamente (95% Conf.) de las demás subfracciones



Gráfica 10. Mortalidad corregida de larvas de *A. albimanus* expuestas a subfracciones de HA-1.4 de *S. auriculata*. (Proporción bioensayada 1:20,000).

Tabla 19

Componentes de las subfracciones de HA-1.4 de *S. auriculata* observados en los cromatogramas en capa fina. (1)

FRACCION	TIPO DE REVELADO			
	VISIBLE	UV (254 nm)	UV (366 nm)	VAINILLINA
HA-1.4-1	-----	0.55 obscuro 0.15 tenue 0.44 fluorosc. azul	0.55 celeste 0.43 celeste	0.55 morado 0.06 rojo
HA-1.4-2	0.52 amarillo	0.57 obscuro 0.45 fluorosc. azul 0.15 tenue	0.60 celeste 0.46 celeste	0.60 morado 0.32, 0.07 rojo
HA-1.4-3	-----	0.17 obscuro	0.50 celeste	0.35, 0.10, 0.06 rojo

(1) Se usó hexano-acetato de etilo 9:1 (v:v) como fase móvil y cromatofolios Al de Sílica gel 60 F-254 (Merck) como fase estacionaria

Según se ve en los resultados presentados en la Tabla 19, las subfracciones de HA-1.4 presentan una mancha roja intensa al revelar la placa de cromatografía de capa fina con vainillina, con un Rf de 0.06-0.10. Esta mancha por ser de carácter polar no puede pertenecer a esta fracción, hecho que indica que la fracción fue contaminada en algún paso intermedio o de almacenamiento. Para purificar la fracción activa, HA-1.4-2, ésta fue eluida con hexano-acetato de etilo 9:1 (v:v) a través de Florisil, y como la fracción purificada se recogió la banda amarilla que bajó.

La subfracción HA-1.4-1 presenta en su espectro ¹H-NMR (Figura 17) señales relativamente débiles en 7.2 ppm, que indica la posible presencia de hidrógenos unidos a carbonos aromáticos. En 1.2 ppm y entre 0.8 y 1.1 ppm presenta señales intensas correspondientes a hidrógenos de grupos metilo y metileno en cadenas alifáticas. El espectro ¹H-NMR de la subfracción HA-1.4-2 (Figura 18) es similar al de la subfracción HA-1.4-1; presenta señales en las mismas regiones y con intensidades relativas similares. Dado que la cromatografía de capa fina de la subfracción activa HA-1.4-2 (Tabla 20) indica la presencia de al menos cuatro componentes diferentes, se consideró que no era el caso, con algo aún tan impuro, integrar el área bajo las señales del espectro de ¹H-NMR. El espectro de HA-1.4-3 (Figura 19) presenta una señal correspondiente a hidrógenos de grupos metilénos (\approx 1.2 ppm) y otras señales en 2.5 y 3.1 ppm; sin embargo, no presenta resonancia en la región alrededor de 7 ppm como las subfracciones HA-1.4-1 y HA-1.4-2.

El espectro infrarrojo de HA-1.4-1 (Figura 15) presenta vibraciones de estiramiento de C-H. (3000-2800 cm⁻¹). El espectro indica la posible presencia de un grupo carbonilo, absorciones en 1730 cm⁻¹, y un grupo C-O de un éter o un éster en 1260 cm⁻¹. Parecen existir

metilos geminales segun absorciones en 1380 cm-1 y en 1040-1020 cm-1. En 700 cm-1 se indica la presencia de metilenos. No hay evidencia de carbonos en grupos aromaticos ni en cadenas insaturadas.

El espectro IR de la subfraccion HA-1.4-2 (Figura 16) es similar al de la subfraccion HA-1.4-1. Presenta vibraciones de grupos C-H en cadenas alifaticas (3000-2800 cm-1), de metilos geminales (1380 cm-1 y 1040 cm-1) y de grupos metileno (700 cm-1). No hay evidencia suficiente de grupos carbonilo y C-O. No hay evidencia de carbonos en grupos aromaticos ni en cadenas insaturadas.

Se obtuvo el espectro UV-VIS de la subfraccion HA-1.4-2 (Figura 20); este muestra una banda de absorcion fuerte con un maximo en 230 nm, que puede deberse a la excitacion de electrones pi en carbonos insaturados. Ademàs presenta otra absorcion bastante debil en 445 nm que puede deberse a dobles enlaces conjugados.

De los espectros y la cromatografia en capa fina se concluye que la subfraccion activa HA-1.4-2 contiene compuestos con fragmentos alifaticos y carbonos insaturados. Segun lo indicado en las Tablas 19 y 21 uno de

sus componentes ($R_f=0.60-0.62$) posee fluorescencia azul al irradiarlo con luz ultravioleta de onda larga (366 nm); este mismo componente es el que se colorea azul-morado al revelar con vainillina.

Se hizo una cromatografía de capa fina para comparar las subfracciones HA-1.1, HA-1.4-1 y HA-1.4-2 en forma cuantitativa, colocando 160 μg por subfracción. En la Tabla 20 (Figura F.5) se observa que las subfracciones HA-1.4-1 y HA-1.4-2 poseen dos componentes en común, de $R_f=0.62$ y $R_f=0.47$. En el cromatograma de HA-1.1 se encuentran estas dos componentes, pero con valores de R_f levemente mayores ($R_f=0.62-0.65$ y 0.49), y con poca intensidad.

Dado que de la subfracción activa HA-1.4-2 se obtuvo muy poca cantidad (≈ 150 mg), esta se guardó bajo refrigeración, disuelta en tetracloruro de carbono, y no se fraccionó más. Se dejó como referencia a futuros trabajos con *S. auriculata*.

Tabla 20

Componentes de subfracciones de hoja HA-1.1, HA-1.4-1 y HA-1.4-2 de *S. auriculata* observados en los cromatogramas en capa fina. (1)

FRACCION	TIPO DE REVELADO				
	VISIBLE	UV (254 nm)	UV (366 nm)	VAINILLINA	YODO
HA-1.1	0.02 Amarillo	0.61, 0.52 0.35, 0.27 0.10	0.49, 0.44 0.29, 0.05 Celestes	0.65, 0.37, 0.32, 0.29 Morado 0.26, 0.23 Azul 0.21, 0.18, 0.15, 0.07 Morado 0.0 Rojo-morado	0.44, Amarillo 0.19 Amarillo 0.29, 0.0 Amari- llo intenso
HA-1.4-1	-----	0.62 Obsc. 0.09 Obsc.	0.62, 0.46 Celeste-azul	0.62 Azul	0.62 Amarillo intenso
HA-1.4-2	0.57 Amarillo	0.62 Obsc. 0.52 Obsc.	0.62 Azul 0.47 Azul	0.62 Azul	0.62 Amarillo intenso

(1) Se usó hexano-acetato de etilo 9:1 (v:v) como fase móvil y cromatofolios Al de Sílica gel 60 F-254 (Merck) como fase estacionaria. Se punteó 160 µg de cada subfracción, para poder hacer comparación cuantitativa además de cualitativa.

Figura 15. Espectro infrarrojo de la subfracción HA-1.4-1 de *S. auriculata*. (Fase líquida, sobre celda de AgCl. Modo de barrido "Survey". Espectrómetro PERKIN-ELMER, mod. 735 B)

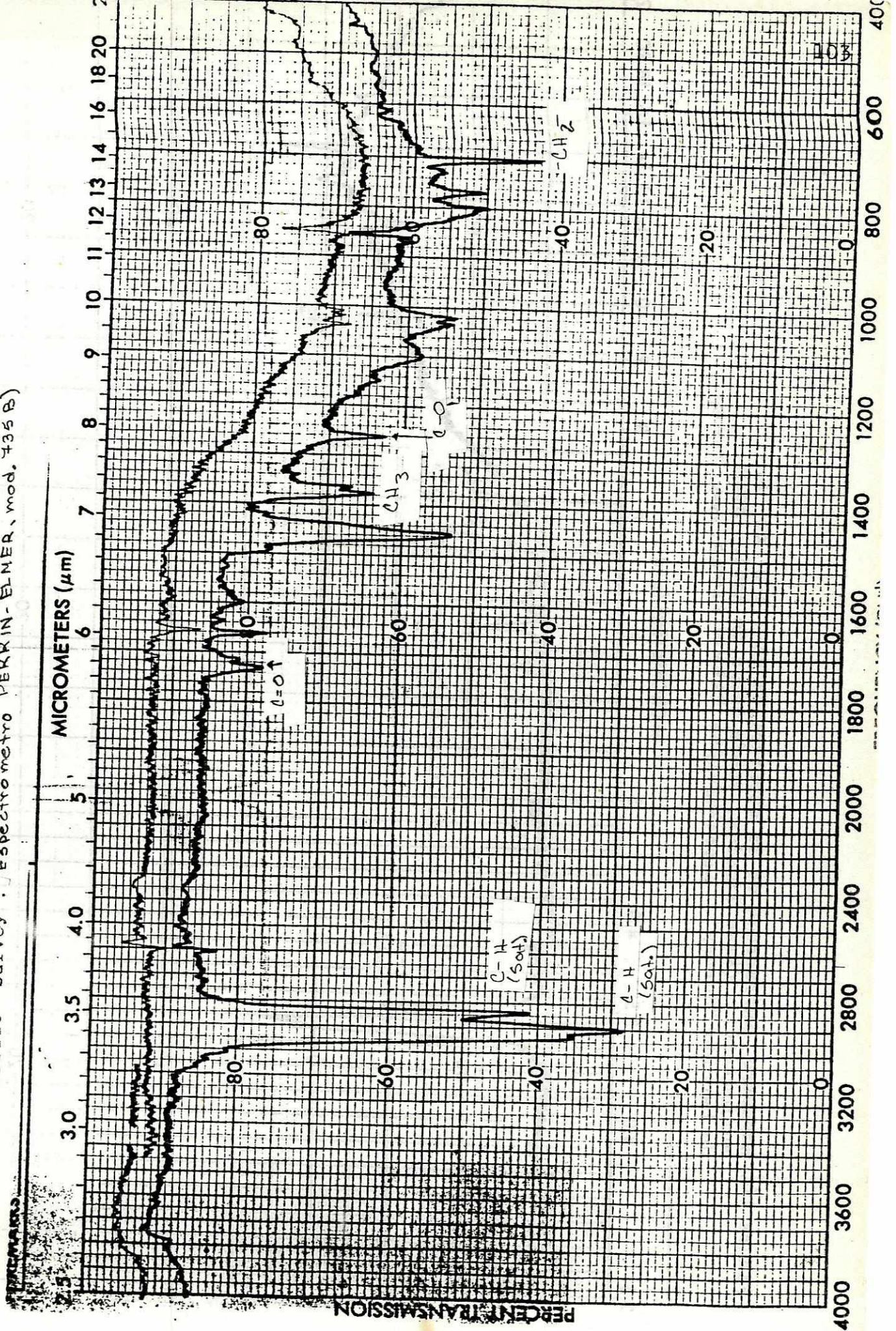
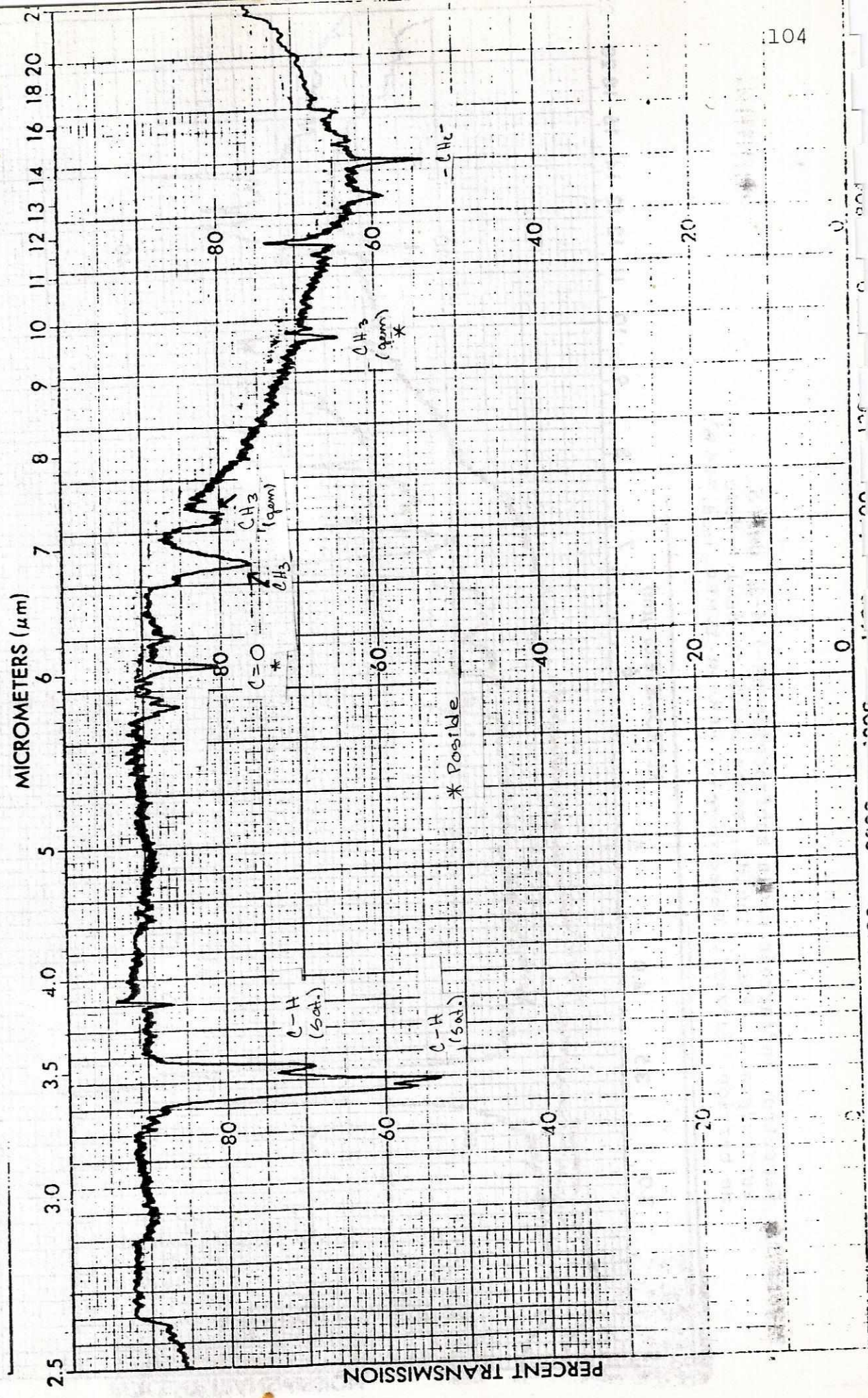


Figura 16. Espectro infrarrojo de la subfracción HA-1.4-2 de *S. auriculata*. (Fase líquida, sobre celda de AgCl. Modo de barrido "Survey". Espectrómetro PERKIN-ELMER, mod. 135B)



S. Ania

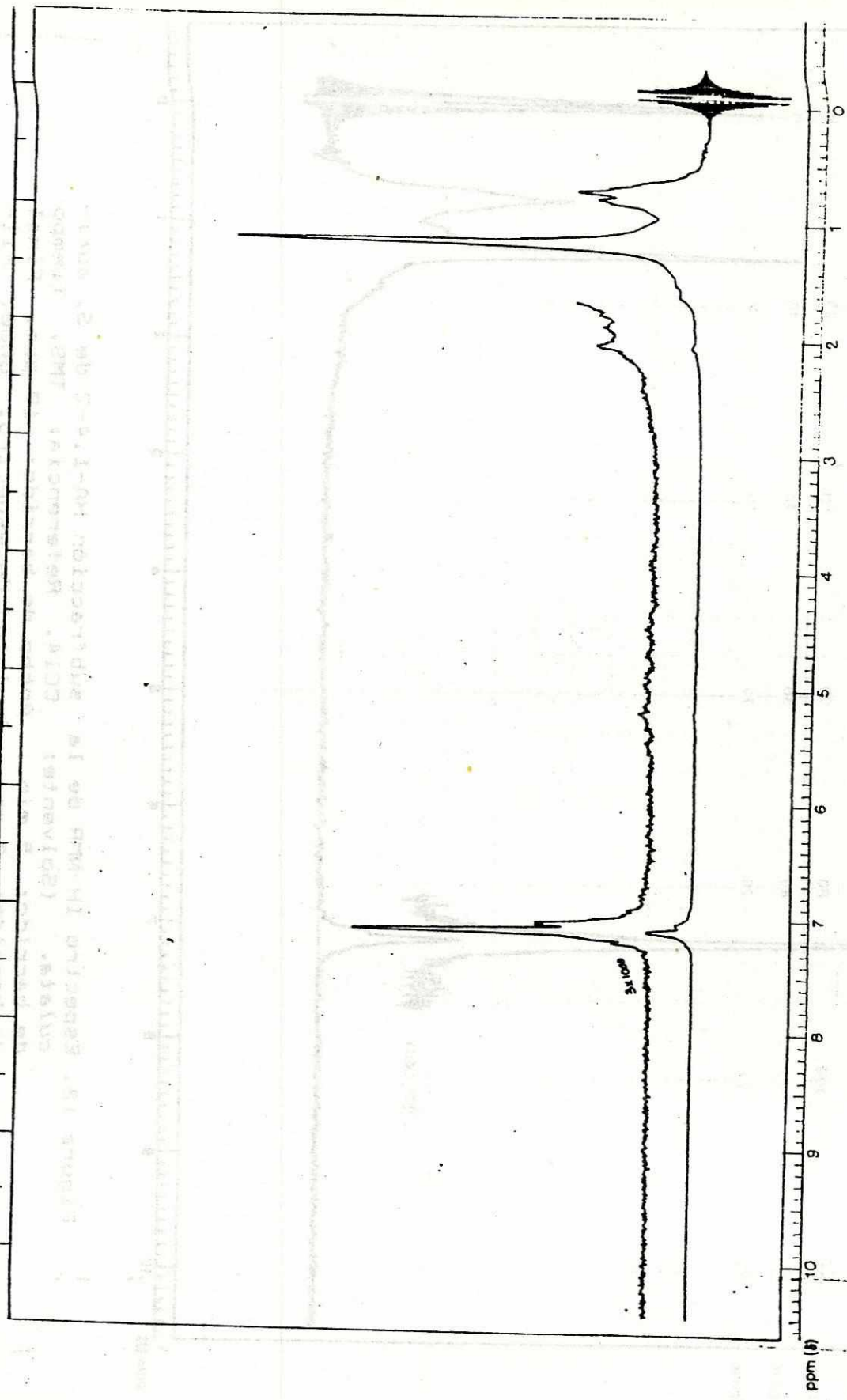


Figura 17. Espectro 1H-NMR de la subfracción HA-1.4-1 de *S. auriculata*. (Solvente: CCl₄. Referencia: TMS. Tiempo de barrido: 5 min. Ancho de barrido: 10 ppm. Final de barrido: 0 ppm. Amplitud de espectro: 300. Fil-tro: 0.05 seg. Potencia Rf: 0.05 mG. Posición de Lock: 0 ppm. Potencia de Lock: 0.01 mG. Espectrómetro VARIAN EM-360C)

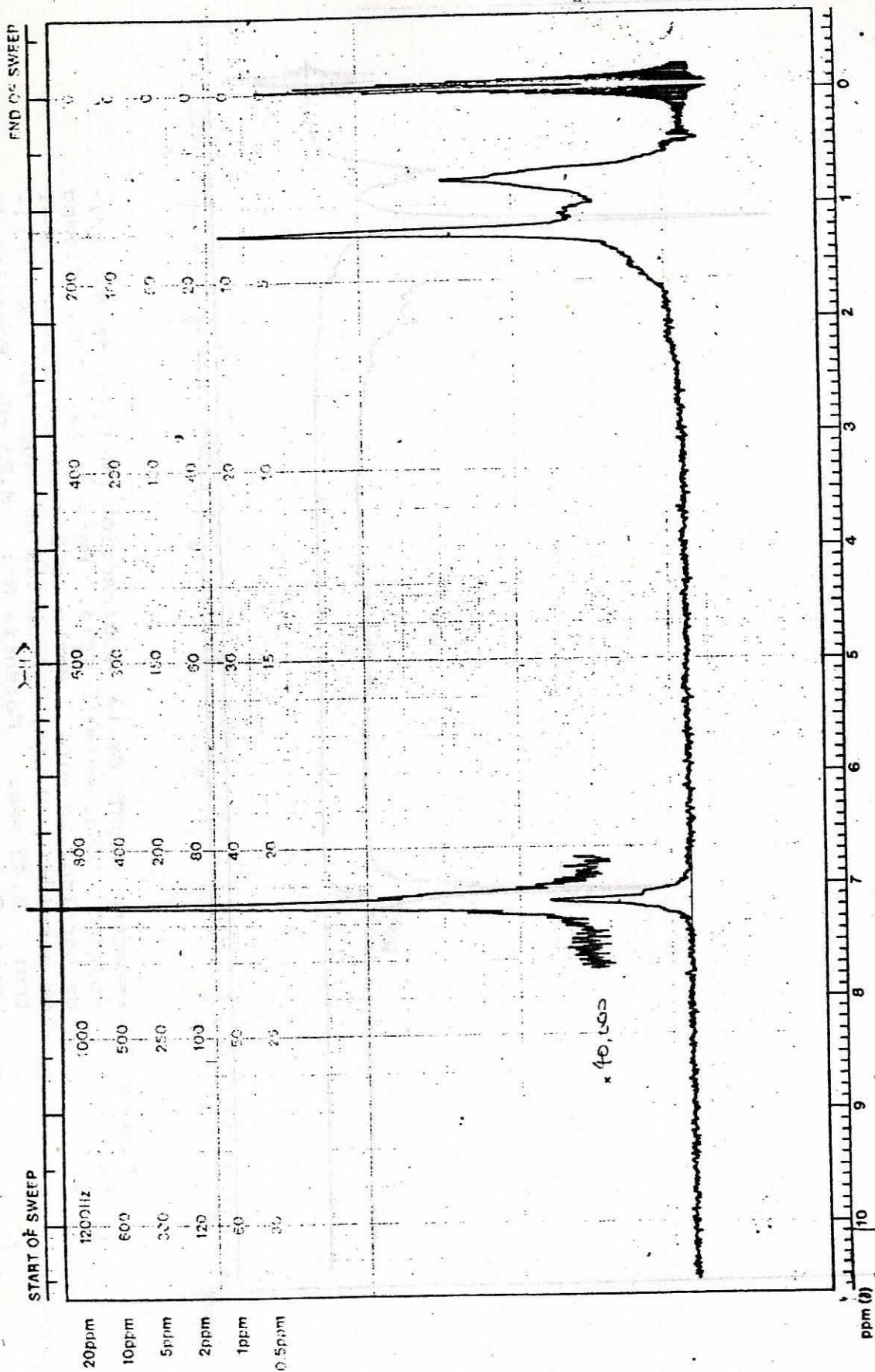


Figura 18. Espectro 1H-NMR de la subfracción HA-1.4-2 de *S. auriculata*. (Solvente: CCl₄. Referencia: TMS. Tiempo de barrido: 5 min. Ancho de barrido: 10 ppm. Final de barrido: 0 ppm. Amplitud de espectro: 8000. Filtrado: 0.05 seg. Potencia Rf: 0.04 mG. Posición de Lock: 0 ppm. Potencia de Lock: 0.01 mG. Espectrómetro

VARIAN EM-360A

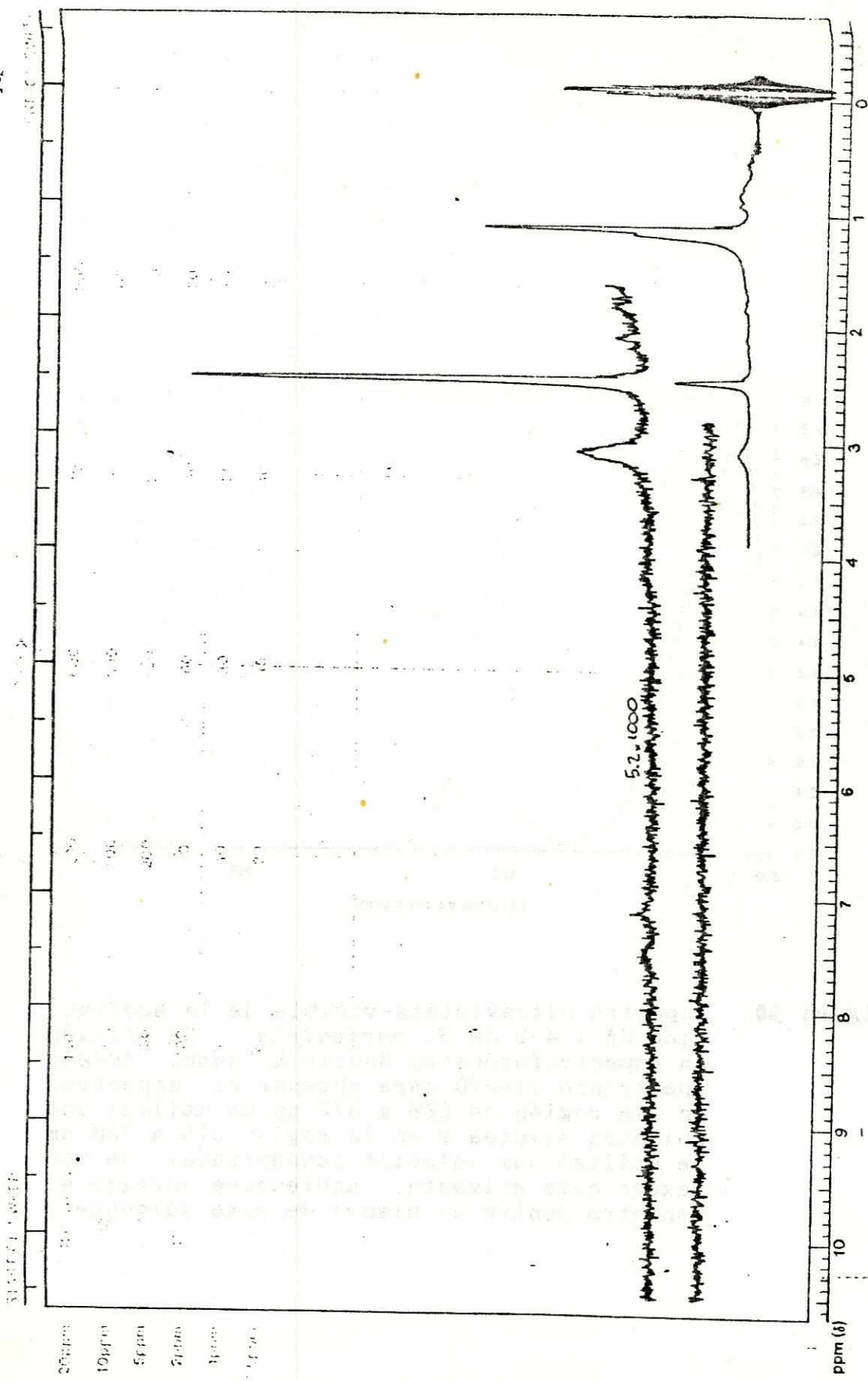


Figura 19. Espectro 1H-NMR de la subfracción HA-1.4-3 de *S. auriculata*. (Solvente: CCl₄. Referencia: TMS. Tiempo de barrido: 5 min. Ancho de barrido: 10 ppm. Final de barrido: 0 ppm. Amplitud de espectro: 520. Fil-tro: 0.05 seg. Potencia Rf: 0.045 mG. Posición de Lock: 0 ppm. Potencia de Lock: 0.01 mG. Espectrómetro VARIAN EM-360L)

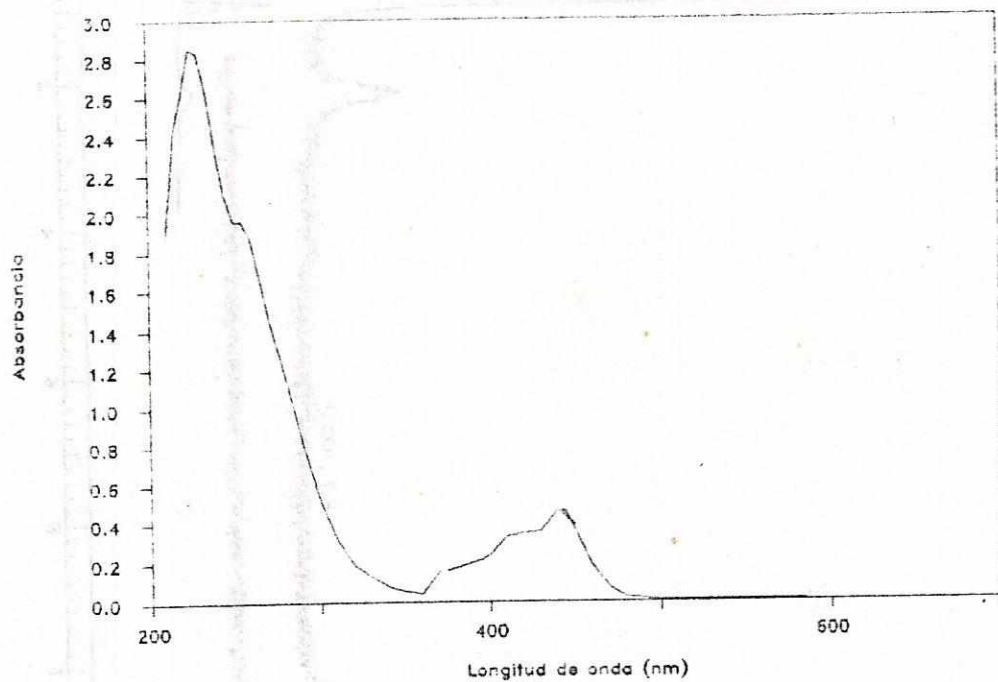


Figura 20. Espectro ultravioleta-visible de la subfracción HA-1.4-2 de *S. auriculata*. (Se utilizó un espectrofotómetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic 21-UVD para obtener el espectro. En la región de 200 a 375 nm se utilizó una solución diluida y en la región 375 a 700 nm se utilizó una solución concentrada. Se usó hexano como solvente, habiéndose corrido el espectro contra un blanco de este solvente.)

VI. DISCUSION

A. Extractos Crudos

Al bioensayar los extractos crudos de raíz y de hoja se observaron efectos antilarvarios sobre *A. albimanus* y se encontró que la proporción letal media del extracto crudo de raíz (1:5,680) es igual a la del extracto crudo de hoja (1:5,850). Estos resultados indican que el principio activo está presente en hojas y raíces en similar concentración. Sin embargo, el extracto crudo de planta entera tiene una proporción letal media menor (1:6,900). Esta disminución en la actividad puede deberse a alguna variabilidad en la concentración de los metabolitos, en la planta entera y en las partes separadas. El proceso de separación de hojas y raíces podría de alguna manera fomentar pérdidas o cambios bioquímicos en la planta que disminuyan la concentración del compuesto activo en las partes separadas, y con ello causar que los LC-50 de los extractos crudos de raíz y de hoja sean mayores que los de la planta entera.

Se utilizó el análisis probit para determinar la proporción letal media de los extractos crudos de planta entera, de raíz y de hoja. Este método se utilizó porque se consideró adecuado, ya que los puntos de probit empírico muestran una tendencia lineal (Gráficas 1, 2 y

3). Existen otros métodos como el análisis logit y el método Weibull, que ajustan los datos a curvas exponenciales asimétricas y simétricas. No se utilizaron estos modelos ya que los datos no presentan tendencias curvilíneas.

B. Fraccionamiento preliminar

Para purificar la fracción activa se hizo un fraccionamiento preliminar con una pequeña cantidad de extracto crudo (≈ 2.0 g). El propósito del fraccionamiento preliminar fue determinar en qué forma se eluye de la columna el(los) compuesto(s) activo(s) y qué características generales posee(n). En el fraccionamiento en escala grande se abrevió el procedimiento realizado en el fraccionamiento preliminar y se siguió más allá la purificación de la fracción activa encontrada.

Según las Figuras 7 y 8, en la primera etapa del fraccionamiento preliminar de los extractos crudos de raíz y de hoja la fracción activa fue la eluida con tolueno y tolueno-éter etílico, indicando ésto que el(los) principio(s) activo(s) es(son) de carácter apolar. El análisis de varianza de los datos de actividad larvicida mostró que la primera fracción, R-A' y H-A', es más activa que las demás, tanto en el caso de raíz como en el

de hoja (Tablas E.1 a E.4). La segunda fracción de raíz, R-B', causó mortandad, aunque baja (29% al cuarto día); ésto sugiere que una pequeña parte del principio activo no salió en la primera fracción R-A' sino que eluyó como parte de la segunda. En el fraccionamiento del extracto crudo de hoja no sucedió ésto, sino que la mayor parte del principio activo eluyó en la primera fracción H-A' (Tablas 3 y 5).

El hecho que dos fracciones consecutivas de la misma etapa presenten actividad antilarvaria se debe a que la cantidad de eluyente usada no fue suficiente para eluir todo el(los) compuesto(s) activo(s) como parte de una sola fracción y por lo tanto la parte remanente eluyó como parte de la siguiente. En la segunda etapa del fraccionamiento se obtuvo algo similar; las dos primeras subfracciones de las fracciones activas, tanto de raíz como de hoja, RA'-1 y RA'-2 y HA'-1 y HA'-2, fueron activas. Ambas subfracciones mostraron en los cromatogramas en capa fina una mancha en común (Tablas 8 y 10), la cual se observa, al revelar con vainillina, como una mancha morada-azul de $R_f = 0.64-0.68$. Ella debe contener el(los) principio(s) activo(s), ya que en la primera subfracción (RA'-1 y HA'-1) esta mancha fue la única presente al revelar con vainillina.

Los cromatogramas de RA'-1 y HA'-1 son similares. Ambos poseen la mancha morada-azul, con $R_f=0.68$ al revelar con vainillina. Con luz ultravioleta se observan los mismos componentes. En la región visible hay un componente amarillo en la subfracción RA'-1, pero hay dos en la HA'-1, coincidiendo una de ellas (Tablas 8 y 10). De los dos cromatogramas, se deduce que el principio activo encontrado en la raíz es el mismo que el encontrado en la hoja. No se siguió purificando estas subfracciones porque se obtuvo muy poca cantidad de ellas.

Los espectros infrarrojos (Figuras 6 y 7) de las dos subfracciones, RA'-1 y HA'-1, muestran grupos funcionales similares como metilenos, metilos, carbonilos y una absorción debido a vibraciones C-O en un grupo éster o un éter. En ambos espectros se muestra la ausencia de grupos polares como -OH, -COOH y NH_2 . Esto indica que la fracción que incluye el(los) principio(s) activo(s) contiene compuestos con cadena alifática, grupo carbonilo y un grupo éster o un éter.

C. Fraccionamiento en escala grande

Al hacer el fraccionamiento en escala grande de los extractos crudos de raíz y de hoja se quiso llegar en

forma más directa a la fracción activa encontrada en el fraccionamiento preliminar. Por ello, según las Figuras 9 y 10, al extracto crudo de cada parte se le agregó hexano-éter etílico, solvente con el que se eluyó la fracción activa en la primera etapa del fraccionamiento preliminar. Se comprobó por cromatografía en capa fina, y el eluyente correspondiente, que la mancha morada-azul con $R_f=0.64-0.68$, obtenida al revelar con vainillina, estaba presente únicamente en la parte soluble y por ello se pudo descartar la parte insoluble (Sección V.C.1). A las partes solubles se les purificó por cromatografía en columna abierta con Florisil, usando el mismo solvente como eluyente. A la primera fracción recogida se le denominó R-A o H-A (si provenía del extracto crudo de raíz o del de hoja, respectivamente), por ser el primer paso del fraccionamiento y el grado de separación es similar a las fracciones R-A' y H-A' (Tablas 4, 6, 11 y 12). No se bioensayó estas fracciones por considerar suficiente la presencia de la mancha obtenida por cromatografía en capa fina como evidencia de la actividad de las fracciones, por lo que no se bioensayaron.

Debido a que la fracción R-A disuelta en hexano se trató por cromatografía de columna abierta sobre Florisil, sin desactivar con agua, la columna retuvo los compuestos. Para evitar que el soporte adsorbiera más

material se agregó solución de acetona al 1% en hexano-tolueno 1:1 (v:v) y después acetona al 1% en tolueno, y así permitir una elución más rápida. En esta etapa de fraccionamiento (Sección V.C.2.a) se obtienen tres subfracciones, de las cuales las dos primeras (RA-1 y RA-2) mataron el 100% de las larvas al tercer día. Estas dos subfracciones poseen dos manchas en común en el cromatograma de capa fina, de valores de R_f de 0.66 y de 0.64 (Tabla 14). Estos dos valores no coinciden exactamente entre sí debido a la diferencia en concentraciones de este componente y a la presencia de otros componentes diferentes.

De la fracción HA disuelta en hexano y fraccionada por cromatografía en columna abierta sobre Florisil, usando acetona al 1% en hexano como eluyente, se obtuvo una primera subfracción HA-1 constituida por una banda amarilla; luego al lavar la columna con acetona se recogió una segunda subfracción. Al comparar estas dos subfracciones por cromatografía de capa fina se verificó que la constituida por la banda amarilla HA-1 es la fracción activa, pues contiene la mancha que se ve morada-azul con $R_f=0.65$ al desarrollar con vainillina (Tabla 15), eluyendo con cloroformo.

Ya que los cromatogramas en capa fina de las subfracciones RA-1 y RA-2 presentan la misma mancha morada-azul que aparece en el cromatograma de la subfracción HA-1, al revelarlos con vainillina (Tablas 15 y 16), se dedujo que el(los) principio(s) activo(s) es(son) el(los) mismo(s) que se encuentra(n) en la raíz. Por esta razón y porque de las subfracciones RA-1 y RA-2 se obtuvo menos de 100 mg, se decidió no continuar el fraccionamiento en la línea en lo que a raíz se refiere y que basta con continuarlo en la línea de las subfracciones del extracto crudo de hoja.

Los 1.2 g que se tenían de la subfracción HA-1 se fraccionaron utilizando placas preparativas de sílica gel; de esta forma se aislaría el componente correspondiente a la mancha morada-azul observada en la cromatografía de capa fina, la cual se considera que contiene el principio activo. La separación por corte, hecha en base al patrón observado al desarrollar las placas preparativas con luz ultravioleta, resultó no ser muy adecuada ya que las cuatro subfracciones obtenidas causaron mortandad; al comparar estas subfracciones por cromatografía de capa fina se hizo evidente la presencia de componentes comunes (Tabla 17). Sin embargo, la primera y la última subfracción, la HA-1.1 y la HA-1.4, presen-

tan actividad antilarvaria considerablemente mayor que las dos subfracciones intermedias (Tabla 16). Las dos subfracciones más activas, según la cromatografía en capa fina, aparentemente poseen sólo un componente en común: con valores de Rf de 0.51 y de 0.48 (Tabla 17). El componente morado-azul con Rf=0.66 seguido como indicación de la presencia del principio activo está presente en HA-1.4 y ausente en HA-1.1. Por lo anterior se sugiere que puede haber otro compuesto activo presente en las hojas de *Salvinia auriculata*, además del de Rf=0.66.

La posibilidad de más de un compuesto activo lo indica el hecho que en esta etapa de fraccionamiento, las subfracciones que muestran mayor actividad antilarvaria no sean consecutivas, sino que sean la primera y la última (Tabla 16). Por otra parte, se observa que entre estas dos subfracciones, es más activa la HA-1.1, la cual, según datos en la Tabla 17, contiene once componentes diferentes, en comparación con la HA-1.4 que sólo contiene tres. De esto se puede pensar que si la subfracción HA-1.1 es más activa, a pesar de tener más componentes, es porque el(los) compuesto(s) activo(s) presente(s) en la subfracción HA-1.1 es(son) más potente(s) que el(los) presente(s) en la HA-1.4.

Ya que de la subfracción HA-1.1 sólo se obtuvo 26 mg y además presentó once manchas diferentes en el cromatograma de capa fina, no se continuó su fraccionamiento. Para estudiar el compuesto activo presente en esta subfracción se debería realizar el fraccionamiento partiendo de una mayor cantidad inicial de extracto crudo; de esta manera, al llegar a esta etapa, se podría aislar el(los) compuesto(s) activo(s) presente(s) en esta subfracción. Por otra parte, dado que la subfracción HA-1.4 presentó únicamente tres manchas diferentes y que es la subfracción mayoritaria en esa etapa de fraccionamiento (se obtuvo 680 mg de ella), se continuó su fraccionamiento intentando con ello aislar el componente con valor $R_f=0.66$ que aparenta contener compuesto(s) de considerable actividad antilarvaria.

Al tratar la fracción HA-1.4 por cromatografía de columna abierta sobre Florisil se observó la formación de una banda amarilla y se recogió una primera fracción (HA-1.4-1) antes que saliera dicha banda, una segunda (HA-1.4-2) constituida por la banda amarilla y una tercera (HA-1.4-3) que resultó de recoger el lavado con acetona. De estas subfracciones (Tabla 18) la segunda, HA-1.4-2, fue la que tuvo mayor actividad antilarvaria; la tercera, HA-1.4-3, no tuvo efecto alguno sobre

110

las larvas y la primera, HA-1.4-1, mostró poca actividad. La actividad de esta primera subfracción se explica en base a lo observado en la cromatografía en capa fina, que tiene componentes en común con la segunda subfracción y esto debido a que el principio activo comenzó a eluir antes de empezar a recoger la HA-1.4-2.

Los espectros infrarrojo de estas dos subfracciones consecutivas (Figuras 15 y 16) son similares en ciertos aspectos. El de la subfracción HA-1.4-1 presenta una banda debido a un grupo carbonilo y otra por la vibración C-O en un grupo éster o un éter, que no lo presenta el de la HA-1.4-2. En ambos espectros se observan absorciones de metilos geminales y grupos metileno.

Los espectros ¹H-NMR de las dos subfracciones presentan señales debido a grupos metilo y metileno. Ambos presentan una señal en 7 ppm que puede deberse a hidrógenos de grupos aromáticos (Figuras 17 y 18).

Al hacer cromatografía de capa fina para comparar las dos subfracciones de HA-1.4 que mostraron actividad antilarvaria y la subfracción HA-1.1, utilizando 160 µg de subfracción por punto (Tabla 20), se observa que las subfracciones HA-1.4-1 y HA-1.4-2 tienen dos componentes

en común: una con Rf de 0.62 y la otra con Rf de 0.47. El componente con Rf = 0.62 es el único de los componentes de estas subfracciones que desarrolla un color azul con vainillina, el cual parece indicar que está relacionado con el componente que desarrollaba azul-morado con vainillina que se había seguido como indicador de actividad antilarvaria en los pasos anteriores del fraccionamiento.

Los espectros ¹H-NMR (Figuras 13 y 18) indican cierta similitud entre las fracciones HA-1.1 y HA-1.4-2, ambos presentan señales de hidrógenos en metilos y metilenos, y una señal en 7.1 ppm que se debe a hidrógenos aromáticos o de carbonos insaturados. La cromatografía de capa fina (Tabla 20) concuerda con los espectros pues muestra compuestos apolares (Rf mayor que 0.50) y compuestos con insaturaciones (al revelar con yodo dan color amarillo Rf=0.62, y fluorescencia al irradiarlos con luz ultravioleta de 366 nm Rf=0.66). Las insaturaciones de la subfracción HA-1.4-2 se confirman con el espectro UV-VIS, que indica la presencia de dobles enlaces entre carbonos, y de dobles enlaces conjugados.

Montúfar (1987) observó que el tamaño de las larvas es menor en las que se sumergen en medios con extractos crudos que las de los controles; esto indica que el principio activo actúa como una hormona juvenil, retar-

dando el cambio al siguiente estadio larvario.

La fracción HA-1.4-2 debería seguir fraccionándose ya que su cromatograma en capa fina muestra aún cuatro componentes diferentes (Tabla 20). No se continuó el fraccionamiento como parte de este estudio por tener sólo 150 mg, cantidad que no es suficiente para continuar con la investigación, debido a los métodos cromatográficos disponibles en esta Universidad. Sin embargo, se piensa dar esta subfracción al grupo que en "The University of Arizona" colabora con este proyecto para que por otros métodos se continúe su fraccionamiento. Se deja como recomendación iniciar el fraccionamiento con una cantidad de extracto crudo mayor que permita que al llegar a este punto aún se pueda continuar y así lograr el aislamiento del compuesto activo y su caracterización.

VII. CONCLUSIONES

Los extractos clorofórmicos de hoja y de raíz de *Salvinia auriculata* poseen actividad larvicida similar sobre *Anopheles albimanus*. El valor de la proporción letal media (g extracto: ml de medio acuoso preparado) del extracto crudo de raíz es de 1:5,680 y el de hoja es de 1:5,850.

La evidencia obtenida de los fraccionamientos y de los bioensayos indica que los compuestos activos son de naturaleza apolar; las fracciones que los contienen son altamente solubles en solventes apolares como hexano y éter etílico.

Una de las subfracciones más activas, HA-1.1, al ser bioensayada 1:10,000, causó un 100% de mortandad de larvas de *A. albimanus* al segundo día de exposición y presentó por lo menos once componentes diferentes. La subfracción activa obtenida en forma más pura fue la HA-1.4-2, que al ser bioensayada, 1:20,000, causó 100% de mortandad en larvas de *Anopheles albimanus* al cuarto día de exposición y presentó sólo cuatro componentes. Hay evidencia que en estas dos subfracciones más activas, el compuesto activo no es común y por lo tanto en *Salvinia auriculata* hay más de un compuesto activo con

efecto larvicida sobre *Anopheles albimanus*.

El espectro ¹H-NMR de la subfracción activa obtenida en forma más pura, HA-1.4-2, indica que ésta contiene compuestos que son hidrocarburos con cadena(s) alifática(s) y con un fragmento aromático. El espectro infrarrojo presenta absorciones correspondientes a metilenos y metilos geminales y un grupo carbonilo. El espectro ultravioleta-visible indica la presencia de carbonos insaturados y de dobles enlaces conjugados.

VIII. RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos se recomienda investigar los siguientes aspectos sobre la obtención y caracterización de los compuestos contenidos en hojas y raíces de *Salvinia auriculata* que muestran actividad larvicida sobre *Anopheles albimanus*.

El proceso de fraccionamiento se realizará en menor tiempo si se utiliza un extracto crudo que contenga menor número de componentes que el utilizado en el presente trabajo. Si se utiliza un solvente más apolar que el cloroformo, como éter etílico o hexano, en la extracción apolar, se obtendrá un extracto crudo con una concentración de los compuestos activos mayor que la del extracto utilizado en este trabajo.

Partir de 5.0 Kg de hojas secas (60 g de extracto crudo, aproximadamente) para obtener mayor masa de cada una de las subfracciones HA-1.1 y HA-1.4-2 y poder aislar de ellas los compuestos activos. Teniendo aislados los principios activos, determinar su estructura molecular y sus propiedades utilizando métodos espectroscópicos y otros, y determinar cuál es el efecto de cada uno de éstos sobre las larvas de *Anopheles albimanus*. Además de utilizar espectroscopías IR, UV-VIS y ¹H-NMR

como en este trabajo, será necesario utilizar también ^{13}C -NMR y espectrometría de masas para determinar las estructuras moleculares de los compuestos activos.

Hacer estudios de campo para determinar cuál es el efecto larvicida que se logra al aplicar el principio activo aislado o una de las fracciones más puras en estanques con larvas de *A. albimanus*.

Utilizar otras pruebas estadísticas como la transformación Logit y la transformación Weibull, para determinar la proporción letal media de los extractos crudos, y comparar dichos resultados con los obtenidos con la transformación Probit.

BIBLIOGRAPHIA

- Amonkar, S. V. and E. L. Reeves. MOSQUITO CONTROL WITH
 1876 ACTIVE PRINCIPLES OF GARLIC. *Allium sativum*.
 J. Econ. Ent.: 63, 1172.
- and Panerji, A. ISOLATION AND CHARACTERIZATION
 1971 OF LARVICIDAL PRINCIPLE OF GARLIC. Science:
 174, 1348.
- Attri, B.S. y Prasad, Ravi. NEEM OIL EXTRACTIVE - AN
 1980 EFFECTIVE MOSQUITO LARVICIDE. Indian J. Ent.:
 42, 371.
- Bahadir, Muefit y Korte, Friedhelm. NEW SLOW
 1987 RELEASE APPLICATION TECHNIQUES WITH HETEROCY-
 CLIC HERBICIDES IN AQUATIC WEED CONTROL. He-
 terocycles: 25(1): 333.
- Bhambie, S. & Bardewaj, K. R. STUDIES IN PTERIDOPHYTES
 1978 XVIII. USE OF *Salvinia auriculata* Aublet - AN
 OBNOXIUS WEED - IN PAPER INDUSTRY. Hidrobiol-
 ogy: 65(3), 208.
- Berg, Eugene. PHYSICAL AND CHEMICAL METHODS OF
 1963 SEPARATION. McGraw-Hill Book Company. New
 York. 366 pp.
- Chemical Rubber Company. CRC HANDBOOK SERIES IN
 1976 CHROMATOGRAPHY. Section A: General data an
 principles. Volume 11. Editors in chief:
 Genter Zweig and Joseph Sherma. Fourth print.
 Chemical Rubber Co. 343 pp.
- Clark-Gil, S. & Darsie, R. F. MOSQUITOES OF GUATEMALA.
 1963 Mosquito Systematics: 15, 151.
- Considine, Mary Lou. WEEVILS TAKE ON THE WATER WEEDS.
 1984 Eggs, Summer 84-85, 42, 16.
- Davidson, G. DEVELOPMENTS IN MALARIA VECTOR CONTROL.
 Brit. Med. Bull.: 38, 201.
- Finlayson, Max; Chick, Alan; Von Gertzen, Isabell and
 1987 Mitchell, David. TREATMENT OF PIGGERY EFFLUENT
 BY AN AQUATIC PLANT FILTER. Biol. Wastes:
 18(6): 173.

- Finney, L. PROBIT ANALYSIS. Academic Press. New York.
1971 Pp. 150
- Fisher, K. y Yates, L. STATISTICAL TABLES FOR BIOLOGICAL
1983 AND AGRICULTURAL STUDIES.
- Georghiou, George P. STUDIES ON RESISTANCE TO CARBAMATE
1972 AND ORGANOPHOSPHORUS INSECTICIDES IN *Anopheles
albimanus*. The American Journal of Tropical
Medicine and Hygiene: 21,(5): 797.
- Guillarmod, A. Jacot. WATER WEEDS IN SOUTHERN AFRICA.
1979 Aquatic Botany: 6,377.
- Hobbs, Jesse H. y Molina, Pedro. THE INFLUENCE OF
1983 THE AQUATIC FERN *Salvinia auriculata* ON THE
BREEDING OF *Anopheles albimanus* IN COASTAL
GUATEMALA. Mosquito News: 43, 456.
- Ignjatovic, L. and Marjanovic, P. A LOW COST METHOD FOR
1986 NUTRIENT REMOVAL FROM DOMESTIC WASTE WATERS.
Water Sci. Technol.: 18(9), 49.
- Jawetz, Ernest; Melnick, Joseph L. and Adelberg, Edward.
1982 REVIEW OF MEDICAL MICROBIOLOGY. 15th edition.
Lange Medical Publications. Los Altos, Cali-
fornia. Pg 510-3.
- Macfarlane, Burnet and White, David O. NATURAL HISTORY
1972 OF INFECTIOUS DISEASE. Cuarta edicion. Cam-
bridge University Press. Nueva York. Pg 232-
241.
- Madrigal, Richard; Knapp, F. R.; Sigafus, Roy and Smith
1978 Jr., Cecil. FRACTIONATION OF EXTRACTS OF *Li-
thospermum arvense* AND THEIR ACTIVITY AGAINST
MOSQUITO LARVAE. Mosquito News: 39, 536.
- Maradufu, Asafu; Lubega, Richard; Dorm, Franz. ISOLA-
1978 TION OF (5E)-OCIMENONE, A MOSQUITO LARVICIDE
FROM *Tagetes minuta*. Lloydia: 41, 181.
- Maw, M. G. y House, H. L. ON CAPRIC ACID AND POTASSIUM
1971 CAPRICATE AS MOSQUITO LARVICIDES IN LABORATORY
AND FIELD. The Canadian Entomologist: 103,
1435.

- Mian, Lal S. & Mulla, Mir S. BIOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL DYNAMICS OF INSECT GROW REGULATORS (IGRs) AS USED AGAINST DIPTERA OF PUBLIC HEALTH IMPORTANCE. In Residue Reviews. Vol. 84. Springer Verlag. New York. Pg. 27-112.
1982
- Montúfar, Milena. EFECTOS DEL HELECHO ACUATICO *Salvinia auriculata* EN ZANCUDOS *Anopheles albimanus*. Tesis. Universidad del Valle de Guatemala. Departamento de Biología.
1987
- National Academy of Sciences. PRINCIPLES OF PLANT AND ANIMAL PEST CONTROL. Vol. 3. Insect-Pest Management and Control. Tercera impresión. National Academy of Sciences. Washington. Pg. 360-63.
1971
- Navajas, Maria Jose. EL HELECHO ACUATICO *Salvinia auriculata* COMO INHIBIDOR DE LARVAS DE *Anopheles albimanus* (DIPTERA, CULICIDAE). Tesis. Departamento de Biología. Universidad del Valle de Guatemala.
1982
- Novak, V. J. A. INSECT HORMONES. Fourth ed. Chapman and Hall Ltd. London. 600 pp.
1975
- Paiz, M. Lilian. REPORTE DEL TRABAJO REALIZADO EN LA UNIVERSIDAD DE ARIZONA, TUCSON, EN RELACION CON EL PROYECTO *Salvinia auriculata* DEL 24 DE OCTUBRE AL 5 DE DICIEMBRE DE 1985. Departamento de Biología. Universidad del Valle de Guatemala.
1985
- Pan American Health Organization. Epidemiological
1986 Bulletin PAHO: 7.
- Pan American Health Organization. THE WORLD MALARIA
1981 SITUATION. Bulletin of the Pan American Health Organization: 15(3), 278.
- Pant, C. P.; N. Rishikesh, Y. H. Bang & A. Smith.
1981 PROGRES IN MALARIA VECTOR CONTROL. Bulletin of the World Health Organization: 59(3), 325.
- Roussel-Uclaf DELTAMETRIN MONOGRAFIA. Traducción del
1983 francés por F. Rodriguez y J.R. Valles. Roussel-Uclaf. Pg. 25-36.

- Russell, G. B.; Fenemore, P. G. and Singh, P. INSECT
1972 CONTROL CHEMICALS FROM PLANTS. NAGILACTONE C,
A TOXIC SUBSTANCE FROM LEAVES OF *Podocarpus*
nivalis AND *P. hallii*. Aust. J. Biol. Sci.:
25, 1025.
- Sokal, R. & Rohlf, J. BIOMETRY. W.H. Freeman and Co.
1969 San Francisco. 776 pp.
- Supavarn, Piyarat; Fred Knapp and Roy Sigafus. BIOLOGI-
1974 CALLY ACTIVE PLANT EXTRACTS FOR CONTROL OF
MOSQUITO LARVAE. Mosquito News: 34, 388.
- Thomas, K.J. THE EXTENT OF *Salvinia* INFESTATION IN
1979 KERALA (S. INDIA): ITS IMPACT AND SUGGESTED
METHODS OF CONTROL. Env. Conservation, Spring
79, 6(1), 63.
- Turner, Ralph B. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY OF INSECTS.
1977 Ralph Turner, Editor. Elsevier Scientific Pu-
blishing Company. Amsterdam, The Netherlands.
- Wernsdorfer, W.H. DRUG RESISTANT MALARIA. Endeavour
1984 New Series: 8, 166.
- Wigglesworth, V. B. INSECT HORMONES. W. H. Freeman and
1970 Company. San Francisco.
- Youmans, Guy P.; Paterson, P. and Somners, Herbert. THE
1980 BIOLOGICAL AND CLINICAL BASIS FOR INFECTIOUS
DISEASE. Segunda edicion. W.B. Sanders
Company. Philadelphia.

APENDICES

AL-EMD1083

APENDICE A

Datos crudos de los bioensayos.

En este apéndice se presentan los datos crudos de los bioensayos realizados en este trabajo. En cada caso se presenta, para cada una de las 5 o 6 réplicas trabajadas, el número de larvas sobrevivientes en el medio bioensayado. El día en que las larvas fueron colocadas dentro del medio a bioensayar se tomó como día cero. La proporción bioensayada es la proporción (g de extracto o fracción : mL de medio preparado).

Método 1							Método 2						
Rep.	g	mL	g	mL	g	mL	Rep.	g	mL	g	mL	g	mL
1	1.0	10	1.0	10	1.0	10	1	1.0	10	1.0	10	1.0	10
2	1.0	10	1.0	10	1.0	10	2	1.0	10	1.0	10	1.0	10
3	1.0	10	1.0	10	1.0	10	3	1.0	10	1.0	10	1.0	10
4	1.0	10	1.0	10	1.0	10	4	1.0	10	1.0	10	1.0	10
5	1.0	10	1.0	10	1.0	10	5	1.0	10	1.0	10	1.0	10
6	1.0	10	1.0	10	1.0	10	6	1.0	10	1.0	10	1.0	10

Tabla A.1

Larvas sobrevivientes de *A. albimanus* expuestas al extracto crudo de raíz de *S. auriculata*

DIA	Larvas vivas						DIA	Larvas vivas					
	1:1,000							1:2,500					
0	25	25	25	25	25	25	0	25	25	25	25	25	25
1	23	22	23	18	15		1	25	25	25	24	24	24
2	0	0	0	0	0		2	9	12	8	5	7	10
3	0	0	0	0	0		3	1	3	2	4	2	1
4	0	0	0	0	0		4	1	1	0	2	0	1
	1:5,000							1:7,500					
0	25	25	25	25	25	25	0	25	25	25	25	25	25
1	24	25	25	25	24	25	1	25	25	25	25	25	25
2	19	17	17	20	20	12	2	24	22	25	25	24	24
3	11	9	15	13	11	6	3	21	21	23	18	23	24
4	9	7	9	11	8	4	4	21	21	23	14	21	20
	1:10,000												
0	25	25	25	25	25	25							
1	25	25	25	25	25	25							
2	23	25	25	25	25	24							
3	22	18	24	25	23	23							
4	22	13	21	25	23	22							

Tabla A.2

Larvas sobrevivientes de *A. albimanus* expuestas al extracto crudo de hoja de *S. auriculata*

DIA	Larvas vivas						DIA	Larvas vivas					
	1:1,000							1:2,500					
0	25	25	25	25	25	25	0	25	25	25	25	25	25
1	11	20	9	10	6		1	23	25	24	25	19	6
2	0	0	0	0	0		2	4	2	1	1	0	1
3	0	0	0	0	0		3	3	0	0	0	0	1
4	0	0	0	0	0		4	3	0	0	0	0	1
	1:5,000							1:7,500					
0	25	25	25	25	25	25	0	25	25	25	25	25	25
1	25	22	23	25	22	23	1	23	19	24	22	-	23
2	17	11	11	15	7	13	2	15	14	19	20	-	19
3	16	9	11	12	5	12	3	15	14	18	19	-	19
4	16	8	11	11	4	11	4	14	11	16	15	-	19
	1:10,000												
0	25	25	25	25	25	25							
1	24	25	25	23	25	25							
2	24	25	25	23	25	23							
3	24	25	25	23	24	22							
4	24	25	25	23	23	22							

Tabla A.3

Larvas sobrevivientes de *A. albimanus* expuestas al extracto crudo de planta entera de *S. auriculata*

DIA	Larvas vivas						DIA	Larvas vivas					
	1:1,000							1:2,500					
0	25	25	25	25	25	25	0	25	25	25	25	25	25
1	21	25	25	25	25	23	1	22	22	21	23	24	24
2	2	2	3	0	3		2	6	7	7	6	9	14
3	1	0	0	0	0		3	2	1	4	3	5	5
4	0	0	0	0	0		4	1	1	2	1	2	5
	1:5,000							1:7,500					
0	25	25	25	25	25	25	0	25	25	25	25	25	25
1	24	25	24	25	25	22	1	24	23	24	23	23	21
2	17	25	22	15	21	17	2	21	20	20	21	20	17
3	16	17	16	12	21	16	3	20	17	18	19	20	16
4	13	17	6	10	13	16	4	17	13	4	17	12	10
	1:10,000												
0	25	25	25	25	25	25							
1	20	24	25	25	25	25							
2	19	22	23	22	23	24							
3	14	21	21	20	23	22							
4	13	17	10	14	22	18							

Tabla A.4

Larvas sobrevivientes de *A. albimanus* en los controles del bioensayo de los extractos crudos de raíz, de hoja y de planta entera de *S. auriculata*

DIA	Larvas vivas						DIA	Larvas vivas					
	Acetona 2%							Agua					
0	25	25	25	25	25	25	0	25	25	25	25	25	25
1	25	25	25	25	25	25	1	25	25	25	25	25	25
2	25	25	25	25	25	25	2	25	25	25	25	25	25
3	25	25	25	25	25	25	3	25	25	25	25	25	25
4	25	25	25	25	25	25	4	25	25	25	25	25	25

Tabla A.5

Larvas sobrevivientes de *A. albimanus* expuestas a fracciones preliminares del extracto crudo de raíz de *S. auriculata* (Proporción bioensayada 1:5,000)

DIA		Larvas vivas					DIA		Larvas vivas				
R-A'							R-B'						
0	24	25	25	25	23	22	0	25	26	25	25	25	25
1	17	11	21	19	9	17	1	25	26	25	25	24	25
2	0	0	0	0	0	0	2	25	26	25	25	22	22
3	0	0	0	0	0	0	3	24	16	19	22	18	18
4	0	0	0	0	0	0	4	21	14	17	21	15	18
R-C'							R-D'						
0	25	25	25	25	25	25	0	25	25	26	25	25	25
1	23	25	25	25	25	25	1	25	25	26	25	25	25
2	23	25	25	24	25	25	2	25	25	26	25	24	25
3	21	23	25	24	25	24	3	24	25	26	25	24	25
4	21	23	24	24	24	22	4	23	25	26	25	24	25
R-E'													
0	25	25	25	25	25	25							
1	25	25	25	25	25	25							
2	25	25	25	25	25	25							
3	25	25	25	25	25	25							
4	25	25	25	25	25	25							

Tabla A.6

Larvas sobrevivientes de *A. albimanus* expuestas a fracciones preliminares del extracto crudo de hoja de *S. auriculata* (Proporción bioensayada 1:5,000)

DIA		Larvas vivas					DIA		Larvas vivas				
		H-A'							H-B'				
0	25	25	25	25	25	25	0	25	25	25	25	25	25
1	23	25	25	25	25	25	1	25	25	25	25	25	25
2	20	20	15	22	16	19	2	25	25	25	25	25	25
3	0	0	0	1	0	0	3	22	25	25	25	24	24
4	0	0	0	0	0	0	4	22	24	25	25	23	24
		H-C'							H-D'				
0	25	25	25	25	25	25	0	25	25	25	25	25	25
1	25	25	25	25	25	25	1	25	25	25	25	25	25
2	25	25	25	25	25	25	2	25	25	25	25	25	25
3	21	24	23	25	25	24	3	25	25	25	25	24	25
4	21	24	23	24	24	24	4	25	23	25	24	23	25

Tabla A.7

Larvas sobrevivientes de *A. albimanus* en los controles del bioensayo de fracciones preliminares del extracto crudo de raíz y de hoja de *S. auriculata*

DIA		Larvas vivas					DIA		Larvas vivas				
		Acetona 2%							Agua				
0	25	25	25	25	25	25	0	25	25	25	25	25	25
1	25	25	25	25	25	25	1	25	25	25	25	25	25
2	25	25	25	22	24	24	2	25	25	25	25	25	25
3	25	24	25	22	24	24	3	25	24	22	25	25	25
4	24	24	25	22	23	24	4	25	24	21	24	25	25

Tabla A.8

Larvas sobrevivientes de *A. albimanus* expuestas a subfracciones preliminares de R-A' de *S. auriculata* (Proporción bioensayada 1:10,000)

DIA		Larvas vivas					DIA		Larvas vivas				
RA'-1							RA'-2						
0	25	24	25	27	24	25	0	24	25	25	26	24	25
1	25	24	25	27	24	25	1	24	25	25	12	14	15
2	0	1	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
RA'-3,4							RA'-5,6						
0	26	25	25	25	25	25	0	25	25	25	25	25	26
1	26	25	25	25	25	25	1	24	25	25	25	25	26
2	26	20	23	24	25	25	2	24	25	25	25	25	26
3	16	15	11	11	23	21	3	24	25	24	24	24	25
4	13	9	10	5	13	14	4	24	25	24	24	20	25

Tabla A.9

Larvas sobrevivientes de *A. albimanus* expuestas a subfracciones preliminares de HA' de *S. auriculata* (Proporción bioensayada 1:10,000)

DIA		Larvas vivas					DIA		Larvas vivas				
HA'-1							HA'-2						
0	25	25	25	25	25	25	0	25	25	25	25	25	25
1	25	25	25	25	25	25	1	25	25	25	25	25	19
2	1	0	0	0	0	0	2	11	5	8	13	6	6
3	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0
4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
HA'-3							HA'-4						
0	25	25	25	25	25	25	0	25	25	25	25	25	25
1	25	25	25	25	25	24	1	25	25	25	25	25	25
2	25	20	25	25	25	23	2	25	25	25	25	25	25
3	25	16	25	17	22	18	3	25	25	25	24	25	25
4	25	13	25	13	20	16	4	24	25	25	22	25	22
HA'-5,6													
0	23	24	25	23	25	25							
1	23	24	25	23	25	25							
2	23	24	25	23	25	25							
3	23	24	25	23	25	25							
4	22	21	25	23	21	25							

Tabla A.10

Larvas sobrevivientes de *A. albimanus* en los controles del bioensayo de las subfracciones de R-A' y H-A' de *S. auriculata*

DIA	Larvas vivas						DIA	Larvas vivas					
	ACET 2%							AGUA					
0	25	25	24	25	25	25	0	25	25	24	25	26	26
1	25	25	24	25	25	25	1	24	25	24	25	26	26
2	25	24	24	25	25	23	2	24	24	24	25	25	26
3	25	24	24	25	24	23	3	23	23	24	25	24	26
4	25	24	24	25	24	21	4	23	23	24	25	24	26

Tabla A.11

Larvas sobrevivientes de *S. auriculata* expuestas a fracciones de HA-1 de *S. auriculata* y sus controles (Proporción bioensayada 1:10,000)

DIA	Larvas vivas						DIA	Larvas vivas					
	HA-1.1							HA-1.2					
0	25	27	27				0	25	25	24	23	26	26
1	16	22	15				1	25	25	25	23	24	25
2	0	0	0				2	25	24	25	23	24	25
3	0	0	0				3	25	19	22	22	23	22
4	0	0	0				4	17	15	21	20	23	21
	HA-1.3							HA-1.4					
0	23	25	24	25	27	25	0	25	25	26	25	26	
1	23	25	24	25	27	25	1	25	24	26	25	25	
2	21	23	19	22	22	20	2	25	23	25	23	24	
3	7	5	7	5	9	3	3	1	0	0	0	3	
4	5	5	6	5	8	2	4	0	0	0	0	3	
	ACETONA 1%							AGUA					
0	25	25					0	25	25				
1	25	25					1	25	25				
2	25	25					2	25	25				
3	25	24					3	25	25				
4	24	24					4	25	25				

Tabla A.12

Larvas sobrevivientes de *A. albimanus* expuestas a la subfracción HA-1.4-1 de *S. auriculata* y sus controles (Proporción bioensayada 1:20,000)

DIA		Larvas vivas						DIA		Larvas vivas					
		HA-1.4-1								AGUA					
0	25	26	24	25	25	25	25	0	25	25	27	25	26	25	
1	25	26	25	25	25	24	24	1	25	25	27	25	26	25	
2	24	26	25	25	25	24	24	2	25	25	27	25	26	25	
3	11	20	23	20	25	23	23	3	25	25	27	25	26	25	
4	8	19	18	16	24	22	22	4	25	25	26	23	26	24	
		ACETONA 0.5%													
0	26	25	26	25	25	25	25								
1	26	25	26	25	25	25	25								
2	26	25	26	25	25	25	25								
3	24	24	26	25	25	25	25								
4	24	23	26	21	21	24	24								

Tabla A.13

Larvas sobrevivientes de *A. albimanus* expuestas a fracciones HA-1.4-2 y HA-1.4-3 de *S. auriculata* y sus controles (Proporción bioensayada 1:20,000)

DIA	Larvas vivas			DIA	Larvas vivas		
	HA-1.4-2				HA-1.4-3		
0	25	25	5	0	25	25	5
1	25	25	5	1	25	25	5
2	14	12	3	2	24	25	5
3	13	10	1	3	23	24	5
4	3	2	0	4	23	22	5
	ACETONA 1%				AGUA		
0	25	25		0	25	25	
1	25	25		1	25	25	
2	25	25		2	25	25	
3	25	24		3	25	25	
4	24	24		4	25	25	

APENDICE B

Transformación probit (Finney, 1971)

En un experimento de "dosis-respuesta" se consideran dos elementos: el estímulo y el sujeto. El estímulo se aplica al sujeto a una dosis dada, una intensidad especificada en unidades de concentración, peso, volumen, tiempo, etc. Como resultado, el sujeto manifiesta una respuesta (crecimiento, cambio de color, etc.). Diferentes estímulos pueden compararse en términos de la magnitud de las respuestas que producen o en términos de las intensidades requeridas para producir iguales respuestas.

Si la respuesta es cuantificable, la ocurrencia o no ocurrencia dependerá de la intensidad del estímulo. Para cualquier sujeto habrá cierto nivel de intensidad abajo del cual no habrá respuesta y arriba del cual siempre habrá respuesta. Este valor es llamado "tolerancia".

Si la dosis o intensidad del estímulo se mide por "Z", la distribución de tolerancias puede expresarse por:

$$dP = F(Z) dZ \quad (B.1)$$

que da la proporción de sujetos cuyas tolerancias caen en el rango Z y Z+dZ, al tiempo de prueba.

Si se administró una dosis Z_0 a toda la población, la proporción P de individuos cuya tolerancia es menor que Z_0 , responderá, siendo ésta:

$$P = \int_0^{Z_0} F(Z) dZ \quad (B.2)$$

Con ello se asume que la dosis puede variar desde cero hasta infinito, y que para dosis muy altas:

$$\int_0^{\infty} F(Z) dZ = 1 \quad (B.3)$$

La distribución de frecuencias de tolerancias medida en una escala natural es ensanchada, pero una transformación de escala la convierte en una distribución normal.

En pruebas con insecticidas la distribución de concentración de tolerancia del agente tóxico es raramente simétrico, debido a que algunos insectos proveen de una "cola" en la distribución, con sus tolerancias extremadamente altas. Esta distribución se puede normalizar usando el logaritmo de la concentración, en vez de la concentración misma.

Una escala metamétrica es una escala de dosis transformada, en la que las tolerancias están distribui-

das normalmente. La medida de la dosis es la dosis metamétrica. En toxicología se utiliza el logaritmo común de la concentración.

La gráfica del porcentaje de respuesta versus la dosis dará una curva que se va levantando suavemente. Cuando el estímulo se mide en unidades metamétricas se obtiene una forma sigmoide normal (Fig. B.1). Esta curva se aproxima a cero o a cien por ciento de respuesta a valores de x infinitamente pequeños e infinitamente grandes, respectivamente.

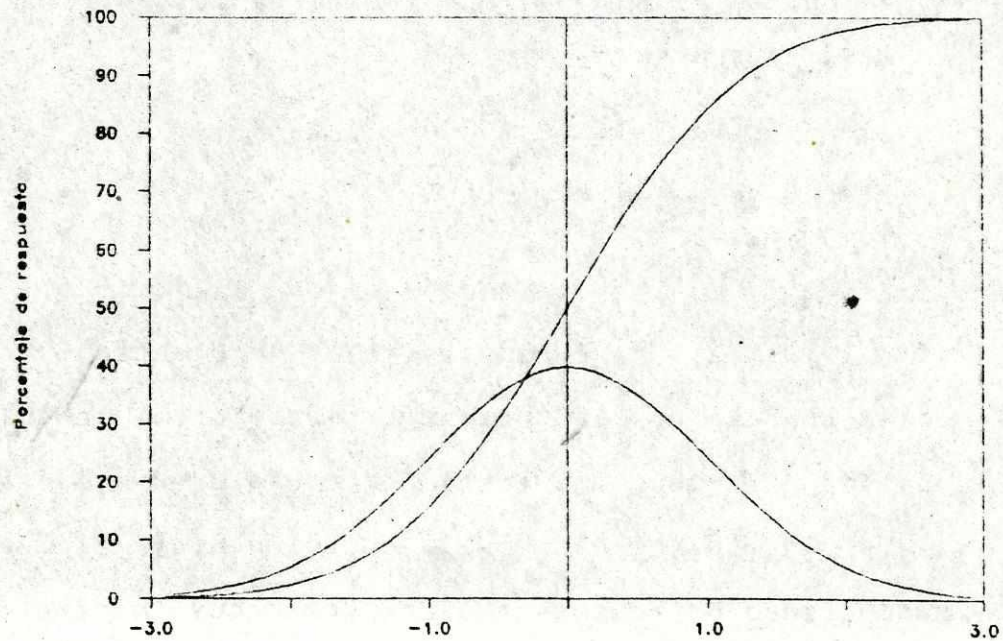


Figura B.1 Distribución normal y distribución normal acumulada (en desviaciones estándar a partir de la media $(x-\mu)/\sigma$)

La distribución normal de frecuencia del logaritmo de la tolerancia (correspondiente a la ecuación B.1) escrita en unidades metamétricas es:

$$dP = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right] dx \quad (\text{B.4})$$

para todos los valores de x en el rango $(-\infty, +\infty)$. Las cantidades μ y σ son la media y la desviación estándar de la población.

La probabilidad de respuesta, P , puede medirse en una escala transformada, en desviaciones normales equivalentes (D.N.E.). La respuesta metamétrica es Y , definida por:

$$P = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^Y \exp\left(-\frac{U^2}{2}\right) dU \quad (\text{B.5})$$

Así, la D.N.E. de cualquier valor de P entre 0 y 1 se define como la abscisa correspondiente a la probabilidad P en una distribución normal con media 0 y varianza 1.

De la integración de la ecuación B.4, si P es la probabilidad de respuesta a una dosis cuyo metámetro es un valor particular x :

$$P = \int_{-\infty}^x \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right) dx \quad (\text{B.6})$$

que escribiendo,

$$x = \mu + U\sigma \quad (\text{B.7})$$

se convierte en:

$$P = \int_{-\infty}^{\frac{x-\mu}{\sigma}} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{U^2}{2}\right) du \quad (\text{B.8})$$

y comparando con la ecuación B.5, se muestra que

$$Y = \frac{x - \mu}{\sigma} \quad (\text{B.9})$$

Así, la relación entre el metámetro de dosis y la D.N.E. de la probabilidad de respuesta a esa dosis es una línea recta.

Se define el "probit" de P ("probit" = unidad de probabilidad) como Y, en donde:

$$P = \int_{-\infty}^{Y-5} \exp\left(-\frac{U^2}{2}\right) du \quad (\text{B.10})$$

Para cualquier P, el probit es simplemente la D.N.E. incrementada en 5, y la ecuación B.9 se escribe como:

$$Y = 5 + \frac{1}{\sigma} (x - \mu) \quad (\text{B.11})$$

que en forma general se escribe como :

$$Y = \alpha + \beta x \quad (\text{B.12})$$

siendo α y β los parámetros a determinar.

El problema es cómo estimar lo mejor posible α y β ,

si ambos son parámetros desconocidos. El principio de estimación más usado es el que maximiza la "semejanza" de los resultados observados.

Supongamos que la probabilidad de respuesta a una dosis particular Z_0 está dada por la ecuación B.2, implícitamente en términos de parámetros desconocidos. Si un batch de n sujetos recibe esta dosis, cada uno reaccionando independientemente, la probabilidad que r respondan es la función binomial. Un experimento en que se probaron K dosis, puede resumirse por las cantidades Z_i , n_i , r_i , para $i=1, 2, 3, \dots, K$. La probabilidad "unida" de estos resultados es proporcional a $\exp(L)$, donde

$$L = \sum_i r_i \log(P_i) + \sum_i (n_i - r_i) \log(Q_i) \quad (\text{B.13})$$

y P y Q se evalúan para cada Z_i . La "semejanza" de las observaciones se define como una cantidad proporcional a $\exp(L)$ pero que tiene un valor máximo unitario con respecto a las variaciones de los parámetros.

La "semejanza" alcanza un valor máximo cuando L es un máximo, si θ es cualquier parámetro de la distribución de tolerancias individuales, el estimado de "semejanza" de θ debe satisfacer:

$$\begin{aligned} 0 = \frac{\partial L}{\partial \theta} &= \sum_i \frac{r_i}{P} \frac{\partial P}{\partial \theta} + \sum_i \frac{n_i - r_i}{Q} \frac{\partial Q}{\partial \theta} \\ &= \sum_i \frac{n_i (P - P)}{PQ} \frac{\partial P}{\partial \theta} \end{aligned} \quad (\text{B.14})$$

en donde $p = \frac{x}{n}$ es un estimado empírico del valor de P a una dosis particular. Si la distribución de tolerancias posee más de un parámetro desconocido, un conjunto de ecuaciones como B.14 debe satisfacerse simultáneamente. Una solución para tales ecuaciones es poco posible, pero los métodos iterativos dan aproximaciones sucesivas que convergen a las soluciones.

Se ejemplifica para dos parámetros θ y ϕ . Supongamos que θ_1 y ϕ_1 son cualquier aproximación a las soluciones de la ecuación B.14. Se obtiene una segunda aproximación, $\theta_1 + \delta\theta$, $\phi_1 + \delta\phi$, donde $\delta\theta$ y $\delta\phi$ se obtienen de

$$\frac{\partial L}{\partial \theta_1} + \delta\theta \frac{\partial^2 L}{\partial \theta_1^2} + \delta\phi \frac{\partial^2 L}{\partial \theta_1 \partial \phi_1} = 0 \quad (\text{B.15})$$

$$\frac{\partial L}{\partial \phi_1} + \delta\theta \frac{\partial^2 L}{\partial \theta_1 \partial \phi_1} + \delta\phi \frac{\partial^2 L}{\partial \phi_1^2} = 0$$

(En Finney (1971) se presenta cómo se obtienen estas ecuaciones) que se convierten en:

$$\delta\theta \sum_i \frac{n}{P_1 Q_1} \frac{\partial P_1}{\partial \theta_1} + \delta\phi \sum_i \frac{n}{P_1 Q_1} \left(\frac{\partial P_1}{\partial \theta_1} \frac{\partial P_1}{\partial \phi_1} \right) = \sum_i \frac{n(p - P_1)}{P_1 Q_1} \frac{\partial P_1}{\partial \theta_1} \quad (\text{B.16})$$

$$\delta\theta \sum_i \frac{n}{P_1 Q_1} \left(\frac{\partial P_1}{\partial \theta_1} \frac{\partial P_1}{\partial \phi_1} \right) + \delta\phi \sum_i \frac{n}{P_1 Q_1} \left(\frac{\partial P_1}{\partial \theta_1} \right)^2 = \sum_i \frac{n(p - P_1)}{P_1 Q_1} \frac{\partial P_1}{\partial \theta_1}$$

que son dos ecuaciones lineales que se resuelven para $\delta\theta$ y $\delta\phi$. Este proceso se repite con

$$\begin{aligned}\theta_2 &= \theta_1 + \delta\theta \\ \phi_2 &= \phi_1 + \delta\phi\end{aligned}\tag{B.17}$$

en vez de θ_1 y ϕ_1 .

Las ecuaciones de arriba se aplican cualquiera que sea la forma de P. La forma de estimación de parámetros más importante es aquella donde la distribución de tolerancia está dada por la ecuación B.4. Usando la ecuación general B.12, los parámetros α y β se relacionan a μ y σ por

$$\begin{aligned}\mu &= -\alpha/\beta \\ \sigma &= 1/\beta\end{aligned}\tag{B.18}$$

y Y se define como B.5. Si Y es un probit se usa B.10 en vez de B.5 y $(\alpha-5)$ se substituye por α en B.18.

De B.5

$$\frac{\partial P}{\partial Y} = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{Y^2}{2}\right) = Z\tag{B.19}$$

entonces

$$\frac{\partial P}{\partial \alpha} = Z \quad ; \quad \frac{\partial P}{\partial \beta} = Zx\tag{B.20}$$

y las ecuaciones B.16 se construyen en términos de α y β . Si

$$Y_1 = a_1 + b_1 x\tag{B.21}$$

es una primera aproximación, B.16 se convierte en:

$$\delta a \sum nw + \delta b \sum nwx = \sum nw \frac{(p - P)}{Z} \quad (B.22)$$

$$\delta a \sum nwx + \delta b \sum nwx^2 = \sum nwx \frac{(p - P)}{Z}$$

en donde el coeficiente de peso es $w = \frac{Z^2}{PQ}$ (B.23)

Aunque las ecuaciones B.22 están arregladas como una regresión lineal de $\frac{(p-P)}{Z}$ en x con peso nw , el procedimiento clásico introduce el "probit de trabajo" para cada dosis:

$$y = Y_1 + \frac{(p - P)}{Z} \quad (B.24)$$

Si se agrega $\sum nwY_1$ a la primera ecuación B.22 y $\sum nwxY_1$ a la segunda, obtenemos:

$$(a_1 + \delta a) \sum nw + (b_1 + \delta b) \sum nwx = \sum nwy \quad (B.25)$$

$$(a_1 + \delta a) \sum nwx + (b_1 + \delta b) \sum nwx^2 = \sum nwx y$$

Escribiendo a_2 , b_2 para los estimados ajustados y definiendo las medias:

$$\bar{X} = \frac{\sum nwx}{\sum nw} \quad ; \quad \bar{Y} = \frac{\sum nwy}{\sum nw} \quad (B.26)$$

obtenemos

$$b_2 = \frac{\sum nw (x - \bar{X}) (y - \bar{Y})}{\sum nw (x - \bar{X})^2} \quad (B.27)$$

$$a_2 = \bar{Y} - b_2 \bar{X} \quad (B.28)$$

Generalmente sucede que en el grupo control ocurre cierta mortandad natural, para tomar ésto en cuenta,

usamos la formula de Abbott:

$$P = \frac{P^* - K_c}{100 - K_c} * 100 \quad (\text{B.29})$$

siendo P^* el % de mortandad observada en la solución probada
 K_c el % de mortandad natural del grupo control
 P el % de mortandad corregida o real

Las diferencias son pocas con el caso anterior. El coeficiente de peso es:

$$w' = \frac{Z^2}{Q \left(P + \frac{K_c}{1-K_c} \right)} \quad (\text{B.30})$$

o bien

$$w' = w \frac{P}{P + \frac{K_c}{1-K_c}} \quad (\text{B.30a})$$

Las ecuaciones correspondientes a B.20, B.14 son las siguientes:

$$\frac{\partial P^*}{\partial a} = \frac{\partial P^*}{\partial P} \cdot \frac{\partial P}{\partial a} = (1-C) Z \quad (\text{B.31})$$

$$\frac{\partial P^*}{\partial \beta} = (1-C) Z x$$

$$\frac{\partial P^*}{\partial C} = Q$$

$$\frac{\partial L}{\partial a} = \sum \frac{n Z^2 (1-K_c)}{Q [K_c + P(1-K_c)]} \frac{(p - P)}{Z} = 0$$

$$\frac{\partial L}{\partial \beta} = \sum \frac{n Z^2 x (1-K_c)}{Q [K_c + P(1-K_c)]} \frac{(p - P)}{Z} = 0 \quad (\text{B.32})$$

$$\frac{\partial L}{\partial K_c} = \frac{N_c (C - K_c)}{K_c(1-K_c)} + \sum \frac{n (p - P)}{K_c + P(1-K_c)} = 0$$

en donde C mortalidad observada en el control
 N_c numero de individuos en el control

Con la introducción de una variable auxiliar:

$$x' = Q/Z \quad (B.33)$$

se hace una segunda derivación y se introduce un probit de trabajo similar a B.24, con lo que se obtiene:

$$b S_{xx} + \frac{\delta}{1-K_c} S_{xx'} = S_{xy} \quad (B.34)$$

$$b S_{xx} + \frac{\delta}{1-K_c} \left[\frac{N_c(1-K_c)}{K_c} + S_{xx'} \right] = \frac{N_c(C-K_c)}{K_c} + S_{x'y} \quad (B.35)$$

$$a = \bar{Y} - b \bar{X} - \frac{\delta}{1-K_c} \bar{X}' \quad (B.36)$$

en donde, por ejemplo:

$$\begin{aligned} S_{xx'} &= \sum nw (x-X) \cdot (x'-X') \\ &= \sum nwx x' - \frac{\sum nwx \sum nwx'}{\sum nw} \end{aligned} \quad (B.37)$$

De esta forma se obtiene la mejor estimación de

$$Y = a + bx \quad (B.38)$$

y δ se agrega a K_c , para tener una mejor estimación.

El logaritmo base diez de la concentración letal media viene dada por:

$$\log(LC_{50}) = X_{50} = \bar{X} + \frac{1}{b} (5 - \bar{Y} + \frac{\delta}{1-K_c} \bar{X}') \quad (B.39)$$

y la varianza por:

$$\begin{aligned} S^2 &= \frac{1}{b^2} \left[\frac{1}{\sum w} + V_{11} (X_{50} - \bar{X})^2 \right. \\ &\quad \left. - 2V_{12} \bar{X}' (X_{50} - \bar{X}) - V_{22} \bar{X}'^2 \right] \end{aligned} \quad (B.40)$$

en donde V_{ij} es el componente (i,j) de la matriz inversa de la matriz de coeficientes de las ecuaciones B.34 y B.35.

APENDICE C

Programa de computadora que hace el análisis probit

1. Algoritmo

Se calcula la mortandad observada, como fracción:

$$P^* = \frac{\text{No. afectados}}{\text{No. expuestos}} \quad (\text{C.1})$$

Se calcula la mortandad corregida:

$$P = \frac{P^* - K_0}{1 - K_0} \quad (\text{C.2})$$

en donde K_0 es la mortandad observada en el grupo control, expresada como fracción = $\frac{\text{No. afectados}}{\text{No. expuestos}}$

De la Tabla IX de Fisher y Yates (1983) se obtienen los probits empíricos. No se toman en cuenta las dosis con 1 de mortandad o 1 de sobrevivencia.

Se hace una regresión lineal de los probits con el logaritmo de la concentración. Se determinan los valores probit estimados de acuerdo a la recta de regresión encontrada para cada dosis (llamados probits provisionales esperados, Y). Con el valor del probit esperado se determina el probit de trabajo (y), usando la Tabla IX2 (Fisher y Yates, 1983), de acuerdo

$$a: \quad y = \text{Max. Work probit} - \text{rango} * p \quad (\text{C.3})$$

$$o \quad y = \text{Min. Work probit} + \text{rango} * p \quad (\text{C.4})$$

El coeficiente de peso (w) y la variable auxiliar x' se obtienen de la Tabla IX3 (Fisher y Yates, 1983), de

acuerdo al valor del probit esperado y a la mortandad en los controles (K_0).

Se calculan los promedios pesados de y , x' y x .

Se calculan las siguientes cantidades:

$$A = \text{Sum} (wx^2) \quad (\text{C.5})$$

$$A' = \text{Sum} (wxx') \quad (\text{C.6})$$

$$A'' = \text{Sum} (wx'^2 + \frac{Nc (1 - K_0)}{K_0}) \quad (\text{C.7})$$

$$B = \text{Sum} (wxy) \quad (\text{C.8})$$

$$B' = \text{Sum} (wx'y + \frac{Nc (Kc - K_0)}{K_0}) \quad (\text{C.9})$$

$$C = \text{Sum} (wy^2 + \frac{Nc (Kc - K_0)}{K_0 (1 - K_0)}) \quad (\text{C.10})$$

Se resuelve el siguiente sistema de ecuaciones para b y $\delta/(1-K_0)$:

$$A b + A' \frac{\delta}{(1-K_0)} = B \quad (\text{C.11})$$

$$A' b + A'' \frac{\delta}{(1-K_0)} = B' \quad (\text{C.12})$$

$$\text{Se calcula } a = \bar{y} - \bar{x} * \frac{\delta}{(1-K_0)} \quad (\text{C.13})$$

$$\text{y se obtiene la ecuación } Y = a + b (x - \bar{x}) \quad (\text{C.14})$$

Se calcula el valor de Chi cuadrado:

$$\text{Chi}^2 = C - B b - B' \frac{\delta}{(1-K_0)} \quad (\text{C.15})$$

para determinar si los datos se ajustan al modelo.

La concentración letal media es:

$$X_{50} = \bar{x} + \frac{5-a}{b} \quad (\text{C.16})$$

Se calcula la matriz inversa (V) de:

$$\begin{bmatrix} A & A' \\ A' & A'' \end{bmatrix}$$

La varianza de b es:

$$S^2b = \frac{1}{b^2} \left[\frac{1}{\sum w} + V11 (X50 - \bar{x})^2 - 2 V12 x' (X50 - \bar{x}) + V22 \bar{x}'^2 \right] \quad (C.17)$$

La varianza de δ es:

$$S^2\delta = V22 (1 - K_0)^2 \quad (C.18)$$

2. Listado del programa de computadora

```
(*****
(*)
(*) Programa para calcular el Probit
(*)
(*) Autor: Jose Gordillo
(*) Lenguaje: Turbo-Pascal
(*) Fecha: marzo 1987
(*)
(*****)
```

```
PROGRAM PROBIT;
```

```
CONST      {Numero maximo de pruebas para aplicarle el Probit}
  MAX_PRUEBAS = 30;
```

```
{ Definición de variables:
```

- TablaIX3, TablaIX2, TablaIX: Son archivos declarados tipo texto que almacenan las tablas de las transformaciones angulares y los coeficientes de pesos y valores del probit a ser usados para los ajustes finales
- StatusFile: es un archivo declarado tipo Texto al que se le asigna el STATUS.PRU que almacena un valor que corresponde a la siguiente prueba a realizarse con el probit. Es decir, si llevamos 20 pruebas hechas, el archivo STATUS.PRU almacenará "21"
- Arch2: Es declarado tipo texto, se le asigna el nombre de "PROBIT" + No. de prueba + ".DAT", es el archivo donde se graban las tablas de resultados
- Archdatos: es declarado tipo texto, se le asigna el nombre de "PROBIT" + No. de prueba + ".PRN", es el archivo en donde se graban el probit resultante que corresponde a cada concentración y el valor del LC-50
- Tabla: Es una tabla que puede tener hasta 30 distintas concentraciones (Maxpruebas). Cada subíndice del arreglo es de tipo REG_TABLA, el cual es un RECORD con los siguientes campos:
 - Concentración: tipo real, contiene el valor de la concentración a la que se va a trabajar
 - Expuestos: tipo entero, es el número de individuos expuestos a tal concentración

- Afectados: tipo entero, es el numero de individuos afectados a tal concentracion
 - Fi: tipo real, contiene la mortandad total observada
 - P: tipo real, contiene la mortandad corregida (tomando en cuenta el control, Ko)
 - Probit_Emp: es el dato encontrado en las tablas de probit para un valor de p% dado, estas tablas van de 0 a 99%
 - Y: tipo real, contiene el valor de probit esperado, es decir, la recta de regresion que mas se acerque a los puntos de concentracion vrs. probit empirico
 - Xi: contiene los mismos valores de la concentracion que corresponden al eje X de la grafica
 - Yi: es el valor resultante del probit a cada iteracion
 - y: es el probit de trabajo que se encuentra buscando en las tablas
 - w: es el coeficiente de peso y se encuentra en las tablas
 - dif: es la diferencia que existe entre el probit resultante (Yi) y el probit de trabajo(y)
- SumW, SumWX, SumWX1, SumWYi, SumWYic cuadrado, SumWXX1, SumWXic cuadrado, SumWXY1, SumWXYi: son declarados tipo reales y contienen respectivamente las sumatorias de:
- W
 - W*concentracion
 - W*Xi
 - W*Yi
 - W*(Yi)^2
 - W*(Conc.)^2
 - W*Concentracion*Xi
 - W*(Xi)^2
 - W*concentracion*Yi
 - W*Xi*Yi
- N: contiene el numero de pruebas a calcular
 - SX, SY, SX2, SY2, SKY: contienen las sumatorias de las concentraciones, del probit empirico, de los cuadrados

de cada uno y del producto de ambos

- m_1 : Es la pendiente de la recta de regresion
- nn : Es el numero de pruebas a calcular que no tengan un probit empirico igual a cero (100% o 0% de mortandad)
- Int_1 : Es tipo real, contiene el valor del promedio de Y menos la pendiente por el promedio de X
- MWP : Minimum Working Probit, es un valor encontrado en la tabla del probito y utilizado en el calculo de Y_1
- $Rango$: Este dato se obtiene de las tablas y se utiliza en el calculo de Y_1
- X_{media} , X_{imedia} , Y_{imedia} : es la media de las concentraciones, las concentraciones por los pesos y Y_1 por el peso
- $Factor_1$, $Factor_2$, $Factor_3$: Son los faactores de correccion usados para clacular la ecuacion de la recta de regresion de los pesos y son:

$$Factor_1 = Nc * (1 - K_0)/K_0$$

$$Factor_2 = Nc * (K_c - K_0)/K_0$$

$$Factor_3 = Nc * (K_c - K_0)^2/K_0(1 - K_0)$$

- A , A_1 , A_{11} , B , B_{11} : son coeficientes calculados a partir de las sumatorias y medias que ya se tienen. Son usados como coeficientes de la matriz:

$$A * b \quad A_1 \quad \delta \quad B \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad 1 - K_0$$

$$A_1 * b \quad A_{11} \quad \delta \quad B_1 \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad 1 - K_0$$

a partir de la cual se encuentra δ y K_0

- C : Es usada para calcular el Chi-cuadrado de los resultados
- aa , bb : son los coeficientes de la recta de regresion
- S_2 : Es la varianza en el punto $X=50$
- S : es la raiz cuadrada de S_2
- $LC50$, $Y50$: Son el valor de x y Y correspondientes al

punto donde muere la mitad de la poblacion

- Inversa: contiene los valores de la matriz inversa del sistema de ecuaciones A, A1, A1, A11
- Coefpeso: es encontrado en las tablas del probit y se usa para calcular el peso de cada concentracion
- Nc: Es el numero de individuos en el grupo de control
- T1: Es un arreglo de reales que contiene una linea de TablaIX
- T2: Es un arreglo de reales que contiene una linea de TablaIX2
- T3: Es un arreglo de reales que contiene una linea de TablaIX3

TYPE

```
REG_TABLA = RECORD
    CONCENTRACION : REAL;
    EXPUESTOS,
    AFECTADOS      : INTEGER;
    P1,
    P,
    PROBIT_EMP,
    Y,
    Y1,
    X1,
    W,dif          : REAL;
END;
```

VAR

```
TablaIX3, TablaIX2, TablaIX : TEXT;
StatusFile, ArchDatos, Arch2 : TEXT;
TABLA : ARRAY[1..MAX_PRUEBAS] OF REG_TABLA;
K0,Kc,Kreal,GZ : REAL;
SumWX, SumW, SumWX1,SumWY1,
SumWY1Cuadrado, SumWXcuadrado,
SumWXX1, SumWXX1cuadrado,
SumWXY1, SumWXY1Y1 : REAL;
R, Temp, Temp1 : REAL;
N,i : INTEGER;
SX,SY,SX2,SY2,SXY : REAL;
m1,int1,MWP,rango : REAL;
Xmedia, X1media, Y1media : REAL;
Factor1, Factor2, Factor3 : REAL;
```

```

A,A1,A11,B,B1,C,delta      : REAL;
aa, bb, S2, Chi2, S         : REAL;
LC50, Y50                   : REAL;
Inversa                      : ARRAY [1..2,1..2] OF REAL;
fraccion,CoefPeso           : REAL;
Nc,NN,cont                  : INTEGER;
t1                           : array[1..10,0..10] of real;
t2                           : array[1..80,1..3] of real;
t3                           : array[1..80,1..15] of real;
seguir,otravez              : boolean;
ans                          : char;
list_tablas                  : boolean;
Archivo2                     : string[12];
signo                        : string[1];
iterar                       : char;

```

```

PROCEDURE LV; BEGIN LowVideo END;
PROCEDURE Nv; BEGIN NormVideo END;

```

(Obtiene del archivo STATUS.PRU el numero de la siguiente prueba, y lo almacena en Cont)

```

PROCEDURE GET_STATUS;
BEGIN
  Assign(StatusFile,'Status.pru');
  Reset(StatusFile);
  ReadLn(StatusFile,cont);
  Close(StatusFile);
END;

```

(Coloca en el archivo STATUS.PRU el numero de la siguiente prueba)

```

PROCEDURE PutStatus;
BEGIN
  Rewrite(StatusFile);
  WriteLn(StatusFile,cont);
  Close(StatusFile);
END;

```

(Este procedimiento lee desde la pantalla los valores de Ko, Kc, No. de pruebas, No. de expuestos al control y le da opcion al usuario de guardar en un archivo las tablas de los resultados. Si Ko=0, se le asigna Ko=0.00001)

```

PROCEDURE LEER_DATOS_INICIALES;
VAR
  ans : char;
  i   : integer;

```

```

BEGIN
  ClrScr;
  FOR i:= 23 to 58
  do begin
    gotoxy(i,5); write(chr(205));
    GotoXY(i,9); Write(chr(205));
    GotoXY(i,12); Write(chr(205));
    GotoXY(i,20); Write(chr(205));
  end;
  for i:= 6 to 8
  do begin
    gotoxy(22,i);
    Write(chr(186));
    Gotoxy(59,i);
    Write(chr(186));
  end;
  For i:= 13 to 19
  do begin
    GotoXY(22,i);
    Write(chr(179));
    GotoXY(59,i);
    Write(chr(179));
  end;
  GotoXY(22,5); Write(chr(201));
  GotoXY(59,5); Write(chr(187));
  GotoXY(22,9); Write(chr(200));
  GotoXY(59,9); Write(chr(188));
  GotoXY(22,12); Write(chr(213));
  GotoXY(59,12); Write(chr(184));
  GotoXY(22,20); Write(chr(212));
  GotoXY(59,20); Write(chr(190));

  GotoXY(30,7);
  LV; WriteLn('P . R . O . B . I . T');
  GotoXY(24,14);
  NV; Write('K0 -> ');
  LV; Readln(K0);
  IF K0=0 THEN K0:=0.00001;
  GotoXY(44,14);
  NV; Write('Kc -> ');
  LV; Readln(Kc);
  GotoXY(24,16);
  NV; Write('No. pruebas -> ');
  LV; Readln(N);
  GotoXY(24,17);
  NV; Write('No. Expuestos en el control ');
  LV; Readln(Nc);
  REPEAT
    GotoXY(24,19);
    NV; Write('Desea imprimir las tablas [s/n] ');

```

```

    Readln(ans);
    UNTIL ans in ['S','s','N','n'];
    IF ans in ['s','S'] THEN list_tablas:=true;
END;

```

(Hace una pantalla para pedir los datos de entrada de cada prueba)

```

PROCEDURE Pantalla_Pruebas;

```

```

var
  x : real;
  na,xx : integer;
BEGIN
  FOR xx := 10 to 25
  DO BEGIN
    GotoXY (1,xx);
    ClrEol
  END;
  FOR i := 23 to 58
  DO BEGIN
    GotoXY(i,12); Write(chr(205));
    GotoXY(i,14); Write(chr(196));
    GotoXY(i,20); Write(chr(205));
  END;
  FOR i:= 13 to 19
  DO BEGIN
    GotoXY(22,i); Write(chr(179));
    GotoXY(59,i); Write(chr(179));
  END;
  GotoXY(22,12); Write(chr(213));
  GotoXY(59,12); Write(chr(184));
  GotoXY(22,20); Write(chr(212));
  GotoXY(59,20); Write(chr(190));
  GotoXY(22,14); Write(chr(195));
  GotoXY(59,14); Write(chr(180));
  GotoXY(24,13);
  NV;
  Write('Prueba ');
  GotoXY(26,16);
  Write('Concentracion -> ');
  GotoXY(26,17);
  Write('No. Expuestos -> ');
  GotoXY(26,18);
  Write('No. Afectados -> ');
END;

```

(Calcula la concentracion como el logaritmo comun de la concentracion y lee los valores de No. de individuos expuestos y afectados)

```

PROCEDURE GetPruebas;

```

```

var

```

```

x : real;
na,xx : integer;
BEGIN
With Tabla[i]
DO BEGIN
  LV;
  GotoXY(33,13); Write(' ');
  GotoXY(50,16); Write(' ');
  GotoXY(50,17); Write(' ');
  GotoXY(50,18); Write(' ');
  GotoXY(33,13); Write(i);
  GotoXY(50,16); Readln(x);
  IF x = 0
  THEN tabla[i].concentracion := 0
  ELSE tabla[i].concentracion := ln(x) / ln(10);
  GotoXY(50,17); Readln(expuestos);
  GotoXY(50,18); Readln(afectados);
  IF expuestos <> 0
  THEN p1 := afectados/expuestos
  ELSE p1 := 1;
END;
END;

PROCEDURE ProbitEmpirico;
var
  exito : boolean;
  enteros,decimos,centesimos : real;
  op,fi : integer;
  {Los valores para P=1 no existen, por lo tanto cuando
  esto ocurre Probit_Emp=0 y no se busca en la tabla}
BEGIN
  IF tabla[i].P = 1
  THEN tabla[i].Probit_Emp := 0
  ELSE BEGIN
    enteros := trunc(tabla[i].p*100);
    decimos := trunc(tabla[i].p * 1000 - enteros*10);
    centesimos := round(tabla[i].p * 10000 - enteros*100 - decimos*10);
    IF enteros >= 98
    THEN BEGIN
      enteros := enteros + decimos/10;
      op := trunc(centesimos)
    END
    ELSE op := trunc(decimos);
    exito := false;
    fi:=1;
    while not exito and (fi < 119) DO
      IF enteros = t1[fi][10]
      THEN BEGIN
        tabla[i].Probit_Emp := t1[fi][op];
        exito:=true;
      END
    END
  END

```

```

        END
        ELSE fi := fi + 1;
    END;
END;

```

```

PROCEDURE Regresion1;
var a,b : real;
BEGIN
    a := (nn * SXY - SX * SY);
    b := (nn * SX2 - SX * SX);
    ( writeln (' a ', a:10:10);
      writeln (' b ', b:10:10);
      writeln (a/b:10:10);
      readln; )
    m1 := a/b;
    ( m1 := (nn * SXY - SX * SY) / (nn * SX2 - SX * SX);
      int1 := (SY - m1 * SX) / nn; )
END;

```

```

PROCEDURE Calculo_Y;
VAR i : INTEGER;
BEGIN
    FOR i:= 1 TO N
    DO tabla[i].Y := tabla[i].concentracion * m1 + int1;
    END;

```

```

PROCEDURE ShowTabla;
VAR

```

```

    FileName : string[12];
    stnum    : string[2];
    un, de   : integer;

```

```

BEGIN

```

```

    ClrScr;
    GotoXY(1,2);

```

```

    WRITELN(' ');

```

```

    WRITELN('   log   |   No.   |   No.   |   P%   |   P   |   Probit   |   Y   ');

```

```

    WRITELN('   Conc.  | Expuestos | Afectados |      |      | Empirico   |      ');

```

```

    WRITELN(' ');

```

```

    WRITELN(' ');

```

```

    for i := 1 to n do

```

```

    begin

```

```

        with tabla[i] DO BEGIN

```

```

            gotoxy(1,i + 6);

```

```

            writeln(' |           |           |           |           |           |           | ');

```

```

            gotoxy(3, i + 6); write(concentracion:6:3);

```

```

            gotoxy(17, i + 6); write(expuestos);

```

```

            gotoxy(29, i + 6); write(afectados);

```

```

            gotoxy(38, i + 6); write(P1:2:3);

```

```

            gotoxy(49, i + 6); write(P:2:3);

```

```

            gotoxy(60, i + 6); write(Probit_Emp:2:3);

```

```

        gotoxy(71, i + 6); write(Y:2:2);
    END;
end;
writeln;
writeln('_____');
IF list_tablas
THEN BEGIN
    Archivo2 := 'PROBIT';
    IF cont < 10
    THEN STNUM := chr(cont+48)
    ELSE BEGIN
        de := cont DIV 10;
        un := cont-de*10;
        stnum := chr(de+48);
        stnum := stnum + chr(un+48);
    END;
    Archivo2 := Archivo2 + stnum + '.DAT';
    Assign(Arch2, Archivo2);
    Rewrite(Arch2);
    writeln(arch2, '_____');
    writeln(arch2, 'log      No.      No.      P*      P      Probit      ');
    writeln(arch2, 'Conc.   Expuestos  Afectados  P*      P      Empirico   Y      ');
    writeln(arch2, '_____');
    FOR i := 1 TO n
    DO
        With tabla[i] DO BEGIN
            Write(arch2, '| ', concentracion:6:3, '| ':3, expuestos:7, '| ':5, afectados:7, '| ':6);
            writeln(arch2, P1:2:3, '| ':5, P:2:3, '| ':4, Probit_Emp:2:3, '| ':6, Y:2:2, '| ');
        END;
        writeln(arch2, '_____');
    END;
END;

PROCEDURE ShowTabla2;
BEGIN
    ClrScr;
    GotoXY(1, 2);
    writeln('_____');
    writeln('X      |      P      |      Y      |      y      |      dif      ');
    writeln('_____');
    FOR i := 1 TO n
    DO With tabla[i]
    DO BEGIN
        gotoxy(1, i + 5);
        writeln('|      |      |      |      |      ');
        dif := abs(Y - y1);
        GotoXY(4, i + 5); Write(concentracion:6:3);
        GotoXY(18, i + 5); Write(P:2:3);
    END;
END;

```

```

GotoXY(32, i + 5); Write(Y:3:2);
GotoXY(45, i + 5); Write(y1:2:2);
GotoXY(56, i + 5); Write(dif:3:3);
END;
Writeln;
WRITELN('_____');
R:=Summ * Summxy1 - SummX * Summy1;
temp1:= Summ * Summxcuadrado - SummX * SummX ;
temp:= Summ * Summylcuadrado - Summy1 * Summy1;
temp:= Sqrt(temp1 * temp);
R:=R/temp;
Gotoxy(10,i+10);
write('Coeficiente de Correlacion      ',R:8:6);
IF list_tablas
THEN BEGIN
  writeln(arch2);writeln(arch2);writeln(arch2);
  WRITELN(arch2,'_____');
  WRITELN(arch2,' X | P | Y | y | dif ');
  WRITELN(arch2,'_____');
  WRITELN(arch2,'_____');
  FOR i := 1 TO n
  DO With tabla[i]
  DO BEGIN
    dif := abs(Y - y1);
    WriteLn(arch2,'| ',concentracion:6:3,'| ',P:3:3,'| ',Y:3:2,'| ',10,y1:2:2,'| ',6,dif:2:3,'| ',6);
  END;
  WRITELN(arch2,'_____');
  writeln(ARCH2);
  writeLN(ARCH2,'Coeficiente de Correlacion      ',R:8:6);
END;
END;

FUNCTION INTERPOLAR (ValIni,ValFin,KcIni,KcFin,Kc: REAL): REAL;
VAR
  IncCoef,IncKc : real;
  ValKc,ValCoef : real;
BEGIN
  IncKc := abs(KcIni-KcFin)/5;
  IncCoef := (ValIni-ValFin)/5;
  ValKc := KcIni - IncKc;
  ValCoef := ValIni;
  Repeat
    ValKc := ValKc + IncKc;
    ValCoef := ValCoef - IncCoef;
  Until ValKc >= Kc;
  Interpolar := ValCoef;
END;

PROCEDURE Calculo_X1;

```

```

VAR
  exito : boolean;
  yy : real;
  fi : integer;
BEGIN
  Yf := round (tabla[1], 1) * 10;
  Yf := Yf / 10;
  CoefPaso := 0;
  exito := false;
  fi := 1;
  while not exito AND (fi < E1)
  DO BEGIN
    IF t3[fi][1] = Yf
    THEN BEGIN
      tabla[3], x1 := t3[fi][2];
      exito := true;
      (0.00) IF kc = 0 then CoefPaso := t3[fi][3];
      (0.01) IF (kc > 0) AND (kc < 0.02) THEN CoefPaso := t3[fi][4];
      (0.02) IF (kc >= 0.02) AND (kc < 0.04)
      THEN CoefPaso := Interpolar(t3[fi][5], t3[fi][6], 0.02, 0.04, kc);
      (0.04) IF (kc >= 0.04) AND (kc < 0.06)
      THEN CoefPaso := Interpolar(t3[fi][6], t3[fi][7], 0.04, 0.06, kc);
      (0.06) IF (kc >= 0.06) AND (kc < 0.08)
      THEN CoefPaso := Interpolar(t3[fi][7], t3[fi][8], 0.06, 0.08, kc);
      (0.08) IF (kc >= 0.08) AND (kc < 0.10)
      THEN CoefPaso := Interpolar(t3[fi][8], t3[fi][9], 0.08, 0.1, kc);
      (0.10) IF (kc >= 0.10) AND (kc < 0.15)
      THEN CoefPaso := Interpolar(t3[fi][9], t3[fi][10], 0.1, 0.15, kc);
      (0.15) IF (kc >= 0.15) AND (kc < 0.20)
      THEN CoefPaso := Interpolar(t3[fi][10], t3[fi][11], 0.15, 0.2, kc);
      (0.20) IF (kc >= 0.20) AND (kc < 0.25)
      THEN CoefPaso := Interpolar(t3[fi][11], t3[fi][12], 0.2, 0.25, kc);
      (0.25) IF (kc >= 0.25) AND (kc < 0.30)
      THEN CoefPaso := Interpolar(t3[fi][12], t3[fi][13], 0.25, 0.3, kc);
      (0.30) IF (kc >= 0.30) AND (kc < 0.35)
      THEN CoefPaso := Interpolar(t3[fi][13], t3[fi][14], 0.3, 0.35, kc);
      (0.35) IF (kc >= 0.35) AND (kc < 0.40)
      THEN CoefPaso := Interpolar(t3[fi][14], t3[fi][15], 0.35, 0.4, kc);
      (0.40) IF (kc >= 0.40) THEN CoefPaso := t3[fi][15];
    END;
    fi := fi + 1;
  END;
END;

```

PROCEDURE Calculo;

```

VAR
  Yf : real;
  exito : boolean;
  fi : integer;

```

```

BEGIN
  exito:=false;
  yy:=trunc(tabla[i].y*10);
  vy := yy/10;
  i:=1;
  while NOT exito AND (fi < 80)
  I BEGIN
    IF yy = t2[fi][1]
    THEN BEGIN
      exito:=true;
      MWP := t2[fi][2];
      rango := t2[fi][3];
    END;
    fi:=fi+1;
  END;
  tabla[i].Y1 := rango * tabla[i].P + MWP;
END;

PROCEDURE FactoresCorreccion;
BEGIN
  Factor1 := (Nc * (1-ko)) / ko;
  Factor2 := (Nc * (Kc-Ko)) / ko;
  Factor3 := (Nc * ((Kc-Ko)*(Kc-Ko))) / (ko * (1-Ko));
END;

PROCEDURE Matriz;
BEGIN
  A := SumWycuadrado - Xmedia * SumWY;
  A1 := SumWX1 - (SumWX * SumW1) / SumW;
  A11 := SumWX1cuadrado - X1media * SumWX1 + Factor1;
  B := SumWXY1 - Xmedia * SumWY1;
  B1 := SumWX1Y1 - X1media * SumWY1 + Factor2;
  C := SumWYcuadrado - Y1media * SumWY1 + Factor3;
END;

PROCEDURE REGRESION2;
BEGIN
  bb := (B1*A1 - A11*B) / (A1*A1 - A*A11);
  delta := ((1-Ko) * (B - A*bb)) / A1;
  aa := Y1media - X1media * (delta/(1-ko));
  Writeln;
  Writeln('Recta de regresion      Y = ',aa:4:2,' + ',bb:4:2
        , ' ( X = ',X1media:6:2,' )';2);
  Writeln;
  Writeln(' Oprime cualquier tecla para continuar ');
  Repeat Until KeyPressed;
END;

PROCEDURE CalculoInversa;
VAR j : REAL;

```

```

BEGIN
  j := (1 / (bb*bb));
  Inversa[1,1] := A11 / (A*A11 - A1*A1);
  Inversa[1,2] := A1 / (A1*A1 - A*A11);
  Inversa[2,1] := Inversa[1,2];
  Inversa[2,2] := -A / (A1*A1 - A*A11);
  S2 := j * (1/SumW + Inversa[1,1] * (LC50 - Xmedia) * (LC50 - Xmedia) -
            2 * Inversa[1,2] * Xlmedia * (LC50 - Xmedia) +
            Inversa[2,2] * Xlmedia * Xlmedia);
  S := SQRT(S2);
  Chi2 := C - B * bb - B1 * delta / (1 - Ko);
END;

```

```

PROCEDURE Get_tablaIX;
Var fi : integer;
    pp,cero,uno,dos,tres,cuatro,cinco,seis,siete,ocho,nueve : real;
BEGIN
  fi:=1;
  Reset(tablaIX);
  While not eof(tablaIX)
  DO BEGIN
    readln(tablaIX,pp,cero,uno,dos,tres,cuatro,cinco,seis,siete,
            ocho,nueve);

    t1[fi][0] := cero;
    t1[fi][1] := uno;
    t1[fi][2] := dos;
    t1[fi][3] := tres;
    t1[fi][4] := cuatro;
    t1[fi][5] := cinco;
    t1[fi][6] := seis;
    t1[fi][7] := siete;
    t1[fi][8] := ocho;
    t1[fi][9] := nueve;
    t1[fi][10] := pp;
    fi:=fi+1;
  END;
END;

```

```

PROCEDURE Get_tablaIX2;
Var fi : integer;
BEGIN
  Reset(TablaIX2);
  fi:=1;
  While Not Eof(TablaIX2)
  DO BEGIN
    Readln(TablaIX2,t2[fi][1],t2[fi][2],t2[fi][3]);
    fi:=fi+1;
  END;
END;

```

```

PROCEDURE Get_tablaIX3;
Var fi : integer;
BEGIN
  fi:=1;
  Reset(tablaIX3);
  While Not Eof(tablaIX3) and (fi < 81)
  DO BEGIN
    readln(tablaIX3,t3[fi][1],t3[fi][2],t3[fi][3],t3[fi][4],t3[fi][5],
           t3[fi][6],t3[fi][7],t3[fi][8],t3[fi][9],t3[fi][10],
           t3[fi][11],t3[fi][12],t3[fi][13],t3[fi][14],t3[fi][15]);
    fi:=fi+1;
  END;
END;

```

```

PROCEDURE FillFile;
VAR
  FileName : string[12];
  stnum    : string[2];
  un, de   : integer;
BEGIN
  FileName := 'PROBIT';
  IF cont < 10
  THEN STNUM := chr(cont+48)
  ELSE BEGIN
    de := cont DIV 10;
    un := cont-de*10;
    stnum := chr(de+48);
    stnum := stnum + chr(un+48);
  END;
  FileName := FileName + stnum + '.PRN';
  Assign(ArchDatos,FileName);
  Rewrite(ArchDatos);
  FOR i := 1 to N
  DO WriteLn(ArchDatos,tabla[i].concentracion:10:5,' ',
            tabla[i].Y:10:5);
  WriteLn(ArchDatos,LC50:10:5,' ',Y50:10:5,' ',Y50:10:5);
  Close(ArchDatos);
  cont:=cont+1;
end;

```

```

PROCEDURE PrintResultados;
Begin
  ClrScr;
  GotoXY(30,3);
  Write('R E S U L T A D O S');
  GotoXY(25,6); Write('X-50',LC50:10:5);
  GotoXY(25,8); Write('Desviacion Standard',S:10:5);
  GotoXY(25,9); Write('Varianza',S2:10:5);
  GotoXY(25,10); Write('Chi cuadrado',Chi2:10:5);
  Gotoxy(25,11); write('Ko',Ko:10:6);

```

```

Gotoxy(25,12); Write('Delta',delta:10:6);
Gotoxy(10,16); Write(' ',A:8:3,A1:8:3,' ');
Gotoxy(10,17); Write(' ',A1:8:3,A11:8:3,' ');
Gotoxy(40,15); Write('Inversa ');
Gotoxy(40,16); Write(' ',Inversa[1,1]:10:8,' ',Inversa[1,2]:10:8
                    ', ');
Gotoxy(40,17); Write(' ',Inversa[2,1]:10:8,' ',Inversa[2,2]:10:8
                    ', ');
Gotoxy(3,22); Write('Oprima una tecla para continuar');
Repeat Until KeyPressed;
End;

```

(PROGRAMA PRINCIPAL)

```

BEGIN
  ClrScr;
  Gotoxy(28,11); Write('*** P R O B I T ***');
  Gotoxy(3,24); Write('espere por favor');
  ASSIGN(TablaIX3,'probit3.tab');
  ASSIGN(TablaIX2,'probit2.tab');
  ASSIGN(TablaIX,'probitIX.tab');
  Get_tablaIX;
  Get_tablaIX2;
  Get_tablaIX3;
  Get_status;
  ans := 's';
  iterar := 'N';
  list_tablas:=false;
  REPEAT
    LEER_DATOS_INICIALES;
    Pantalla_Pruebas;
    SX:=0; SY:=0; SX2:=0; SY2:=0; SKY:=0; NN:=0;
    FOR i:= 1 TO n
      DO BEGIN
        GetPruebas;
        fraccion:=0;
        tabla[i].p:=(tabla[i].p1 - Ko) / (1 - Ko);
        tabla[i].p:=(tabla[i].p * 10000.0 - frac(tabla[i].p * 10000.0))/10000;
        ProbitEmpirico;
        IF tabla[i].Probit_Emp <> 0
          THEN BEGIN
            SX := SX + tabla[i].concentracion;
            SY := SY + tabla[i].Probit_Emp;
            SX2 := SX2 + tabla[i].concentracion * tabla[i].concentracion;
            SY2 := SY2 + tabla[i].Probit_Emp * tabla[i].Probit_Emp;
            SKY := SKY + tabla[i].concentracion * tabla[i].Probit_Emp;
            nn:=nn+1;
          END;
      END;
    Close(tablaIX);
  END;

```

```

Regresion1;
Calculo_Y;
ShowTabla;
Repeat
  SumW := 0;
  SumWX := 0;
  SumWX1 := 0;
  SumWY1 := 0;
  SumWYic cuadrado := 0;
  SumWXcuadrado := 0;
  SumWXX1 := 0;
  SumWXic cuadrado := 0;
  SumWXY1 := 0;
  SumWX1Y1 := 0;
  FOR i := 1 TO n
  DO WITH tabla[i]
  DO BEGIN
    Calculo_X1;
    Calculo_Y1;
    W := CoefPeso * expuestos;
    SumW := SumW + W;
    SumWX := SumWX + W * concentracion;
    SumWX1 := SumWX1 + W * X1;
    SumWY1 := SumWY1 + W * Y1;
    WRITE; WRITE; WRITE; write; write;
    SumWYic cuadrado := SumWYic cuadrado + W * (y1 * y1);
    SumWXcuadrado := SumWXcuadrado + W * concentracion *
                                                    concentracion;
    SumWXX1 := SumWXX1 + W * concentracion * x1;
    write;
    SumWXic cuadrado := SumWXic cuadrado + W * (x1 * x1);
    SumWXY1 := SumWXY1 + W * concentracion * Y1;
    SumWX1Y1 := SumWX1Y1 + W * x1 * y1;
  END;
  Xmedia := SumWX/SumW;
  X1media := SumWX1/SumW;
  Y1media := SumWY1/SumW;
  FactoresCorreccion;
  Matriz;
  Regresion2;
  (* Calculo la nueva Y *)
  For i:= 1 to N DO tabla[i].Y := aa + bb *
                                (tabla[i].concentracion - Xmedia);
ShowTabla2;
Repeat
  GotoXY(15,17);
  Write('Otra iteracion [S/N] ');
  Readln(tr, iterar);
  Until Uppcase(iterar) In ['S', 'N'];
  If Uppcase(iterar) = 'S'

```

```

Then Begin
  Ko := Ko + delta;
  For i:= 1 to N DO tabla[i].Y := Tabla[i].y1;
End;
Until UpCase(iterar) = 'N';
LC50 := Xmedia + (5-aa)/bb;
Y50 := aa + bb * (LC50 - Xmedia);
FillFile;
CalculoInversa;
If list_tablas
THEN BEGIN
  Writeln(arch2);Writeln(arch2);
  If bb < 0
  then signo:='-';
  else signo:='+';
  Writeln(arch2,'      Recta de regresion      Y = ',aa:4:2,' ',signo
    ,', ',bb:4:2,' ( X -',Xmedia:6:2,' )':2);
  Writeln(arch2,'      Desviacion Standard ',S:10:5);
  Writeln(arch2,'      Chi cuadrado      ',chi2:10:5);
  Writeln(arch2,'      LC50      ',LC50:10:5);
  Writeln(arch2,'      Ko      ',Ko:10:6);
  Writeln(arch2,'      Delta      ',delta:10:8);
  Writeln(arch2); Writeln(arch2,'      Matriz Inversa');
  Writeln(arch2);
  Writeln(arch2,'      | ',Inversa[1,1]:10:8,' ',
    Inversa[1,2]:10:8,' |');
  Writeln(arch2,'      | ',Inversa[2,1]:10:8,' ',
    Inversa[2,2]:10:8,' |');
  Close(arch2);
END;
PrintResultados;
Writeln;Writeln;
Write(' Desea correr el programa de nuevo [S/N] ');
READLN(ans);
UNTIL ans in ['n','N'];
PutStatus;
END.          END.

```


APENDICE D

Variación de los parámetros estimados
en el análisis probit

En las tablas siguientes K_0 es la mortandad en los controles (expresada como fracción); a , b y \bar{X} son los parámetros en la ecuación C.14; Chi^2 es una estimación de que el modelo se ajuste a los datos experimentales; LC-50 es el valor de la concentración letal media, expresada en mg/L; y R es el coeficiente de correlación de la regresión lineal de los datos.

Tabla D.1

Parámetros para el análisis probit de la actividad anti-larvaria del extracto crudo de raíz de *S. auriculata* sobre *A. albimanus*

Iteración	K_0	a	b	\bar{X}	Chi^2	LC - 50 (mg/L)	R
0	0.0010	4.87	5.09	2.21	10.425	171 ± 5	0.9761
1	1.52 E-4	4.85	5.06	2.20	10.104	171 ± 5	0.9770
2	-9.42 E-6	4.86	5.04	2.21	10.152	171 ± 5	0.9778
3	7.10 E-7	4.85	5.06	2.20	10.110	171 ± 5	0.9774
4	1.00 E-7	4.85	5.06	2.20	10.106	171 ± 5	0.9770

Tabla D.2

Parámetros para el análisis probit de la actividad anti-larvaria del extracto crudo de hoja de *S. auriculata* sobre *A. albimanus*

Iteración	Ko	a	b	\bar{X}	Chi ²	LC - 50 (mg/L)	R
0	0.0010	4.87	5.35	2.22	11.777	175 ± 5	0.9702
1	-2.27 E-4	4.90	5.33	2.23	9.963	176 ± 5	0.9731
2	1.12 E-4	4.90	5.33	2.23	9.644	176 ± 5	0.9737
3	-5.20 E-5	4.90	5.33	2.23	9.672	176 ± 5	0.9737
4	2.40 E-5	4.90	5.33	2.23	9.659	176 ± 5	0.9737

Tabla D.3

Parámetros para el análisis probit de la actividad anti-larvaria del extracto crudo de planta entera de *S. auriculata* sobre *A. albimanus*

Iteración	Ko	a	b	\bar{X}	Chi ²	LC - 50 (mg/L)	R
0	0.0010	5.24	2.76	2.24	20.319	144 ± 7	0.9412
1	6.21 E-5	5.14	2.70	2.22	19.764	146 ± 7	0.9183
2	-3.46 E-6	5.14	2.65	2.21	20.923	145 ± 7	0.9097
3	-7.20 E-7	5.12	2.57	2.21	20.018	145 ± 7	0.9025
4	-8.40 E-7	5.12	2.53	2.21	19.351	145 ± 8	0.8991

APENDICE E

Análisis de varianza y comparaciones *a posteriori* de la actividad larvicida de los extractos crudos y las fracciones de *S. auriculata* sobre *A. albimanus*

Tabla E.1

Análisis de varianza de la actividad de las fracciones R-A', R-B', R-C', R-D' Y R-E' de *S. auriculata* sobre *A. albimanus* (1)

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Media Cuadrada	Razón F	Probab. F
Entre Fracciones	5	73.9423	14.7885	208.04	< 000
Error	30	2.1325	0711		
Total	35	76.0748			

(1) Análisis del % de mortandad corregida, al cuarto día.

Tabla E.2

Prueba '*a posteriori*' para comparación de medias (test de Student-Newman-Keuls) de la actividad de las fracciones R-A', R-B', R-C', R-D' Y R-E' de *S. auriculata* sobre *A. albimanus* (1)

Media	Grupo	R-E'	R-D'	R-C'	R-B'	R-A'
0.0	R-E'					
0.0267	R-D'					
0.1933	R-C'					
1.0133	R-B'	*	*	*		
4.0000	R-A'	*	*	*	*	

* Diferencia significativa entre dos medias al 95% de confianza

(1) Análisis de las medias de % de mortandad corregida al cuarto día.

Tabla E.3

Análisis de varianza de la actividad de las fracciones H-A', H-B', H-C' Y H-D' de *S. auriculata* sobre *A. albimanus* (1)

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Media Cuadrada	Razón F	Probab. F
Entre Fracciones	4	71.6693	17.9173	535.4638	< .0000
Error	25	0.8365	0.0335		
Total	29	72.5059			

(1) Análisis del % de mortandad corregida, al cuarto día.

Tabla E.4

Prueba 'a posteriori' para comparación de medias (test de Student-Newman-Keuls) de la actividad de las fracciones H-A', H-B', H-C' Y H-D' de *S. auriculata* sobre *A. albimanus* (1)

Media	Grupo	H-C'	H-D'	H-B'	H-A'
0.0267	H-C'				
0.2867	H-D'				
0.1467	H-B'				
4.0000	H-A'	*	*	*	

* Diferencia significativa entre dos medias al 95% de confianza

(1) Análisis de las medias de % de mortandad corregida al cuarto día.

Tabla E.5

Análisis de varianza de la actividad de las fracciones RA'-1, RA'-2, RA'-3,4 Y RA'-5,6 de *S. auriculata* sobre *A. albimanus* (1)

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Media Cuadrada	Razón F	Probab. F
Entre Fracciones	3	3.5888	1.1963	211.48	< 10 ⁻⁴
Error	20	0.1131	0.0057		
Total	23	3.7020			

(1) Análisis del % de mortandad corregida, al cuarto día.

Tabla E.6

Prueba 'a posteriori' de comparación de medias (test de Student-Newman-Keuls) de la actividad de las fracciones RA'-1, RA'-2, RA'-3,4 Y RA'-5,6 de *S. auriculata* sobre *A. albimanus* (1)

Media	Grupo	RA'-5,6	RA'-3,4	RA'-1	RA'-2
0.0600	RA'-5,6				
0.5767	RA'-3,4	*			
1.0000	RA'-1	*	*		
1.0000	RA'-2	*	*	*	

* Diferencia significativa entre dos medias al 95% de confianza

(1) Análisis de las medias de % de mortandad corregida al cuarto día.

Tabla E.7

Análisis de varianza de la actividad de las fracciones HA'-1, HA'-2, HA'-3, HA'-4 y HA'-5,6 de *S. auriculata* sobre *A. albimanus* (1)

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Media Cuadrada	Razón F	Probab. F
Entre Fracciones	4	5.6293	1.4073	120.93	< 10 ⁻⁴
Error	25	0.2909	0.0116		
Total	29	5.9203			

(1) Análisis del % de mortandad corregida, al cuarto día.

Tabla E.8

Prueba 'a posteriori' de comparación de medias (test de Student-Newman-Keuls) de la actividad de las fracciones HA'-1, HA'-2, HA'-3, HA'-4 y HA'-5,6 de *S. auriculata* sobre *A. albimanus* (1)

Media	Grupo	HA'-4	HA'-5,6	HA'-3	HA'-1	HA'-2
0.0467	HA'-4					
0.0733	HA'-5,6					
0.2533	HA'-3	*	*			
0.9933	HA'-1	*	*	*		
1.0000	HA'-2	*	*	*	*	

* Diferencia significativa entre dos medias al 95% de confianza

(1) Análisis de las medias de % de mortandad corregida al cuarto día.

Tabla E.9

Análisis de varianza de la actividad de las fracciones RA-1, RA-2 y RA-3,4 de *Salvinia auriculata* sobre *A. albimanus* (1)

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Media Cuadrada	Razón F	Probab. F
Entre Fracciones	2	1.3499	0.6750	1446.3	< 10 ⁻⁴
Error	4	0.0190	0.0005		
Total	6	1.3518			

(1) Análisis del % de mortandad corregida, al cuarto día.

Tabla E.10

Prueba 'a posteriori' de comparación de medias (test de Student-Newman-Keuls) de la actividad de las fracciones RA-1, RA-2 y RA-3,4 de *S. auriculata* sobre *A. albimanus* (1)

Media	Grupo	RA-3,4	RA-1	RA-2
0.0200	RA-3,4			
0.9867	RA-1	*		
1.0000	RA-2	*		

* Diferencia significativa entre dos medias al 95% de confianza

(1) Análisis de las medias de % de mortandad corregida al cuarto día.

Tabla E.11

Análisis de varianza de la actividad de las fracciones HA-1.1, HA-1.2, HA-1.3 y HA-1.4 de *S. auriculata* sobre *A. albimanus* (1)

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Media Cuadrada	Razón F	Probab. F
Entre Fracciones	3	2.1461	0.7154	137.77	< 10 ⁻⁴
Error	17	0.0883	0.0052		
Total	20	2.2343			

(1) Análisis del % de mortandad corregida, al cuarto día.

Tabla E.12

Prueba 'a posteriori' de comparación de medias (test de Student-Newman-Keuls) de la actividad de las fracciones HA-1.1, HA-1.2, HA-1.3 y HA-1.4 de *S. auriculata* sobre *A. albimanus* (1)

Media	Grupo	HA-1.2	HA-1.3	HA-1.4	HA-1.1
0.2267	HA-1.2				
0.8067	HA-1.3	*			
0.9800	HA-1.4	*	*		
1.0000	HA-1.1	*	*	*	

* Diferencia significativa entre dos medias al 95% de confianza

(1) Análisis de las medias de % de mortandad corregida al cuarto día.

Tabla E.13

Análisis de varianza de la actividad de las fracciones HA-A.4-1, HA-1.4-2 y HA-1.4-3 de *S. auriculata* sobre *A. albimanus* (1)

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Media Cuadrada	Razón F	Probab. F
Entre Fracciones	2	1.3454	0.6727	20.555	0.0004
Error	9	0.2945	0.0327		
Total	11	1.6399			

(1) Análisis del % de mortandad corregida, al cuarto día.

Tabla E.14

Prueba 'a posteriori' de comparación de medias (test de Student-Newman-Keuls) de la actividad de las fracciones HA-A.4-1, HA-1.4-2 y HA-1.4-3. (1)

Media	Grupo	HA-1.4-3	HA-1.4-1	HA-1.4-2
0.0667	HA-1.4-3			
0.2300	HA-1.4-1			
0.9333	HA-1.4-2	*	*	

* Diferencia significativa entre dos medias al 95% de confianza

(1) Análisis de las medias de % de mortandad corregida al cuarto día.

Tabla E.15

Análisis de varianza de las actividades de los extractos crudos de raíz, de hoja y de planta entera de *S. auriculata* sobre *A. albimanus*.

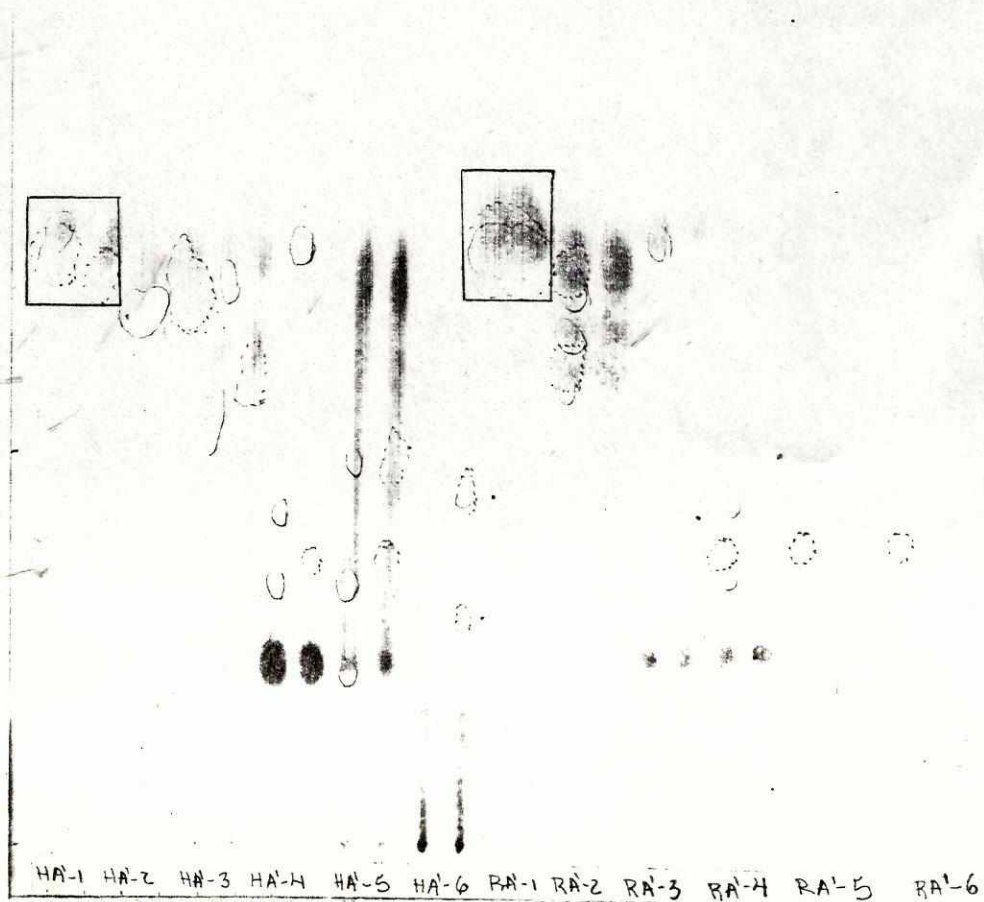
Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Media Cuadrada	razón F	Probab. F
Entre fracciones	2	0.0972	0.0486	2.4204	0.1227
Error	15	0.3013	0.0201		
Total	17	0.3986			

APENDICE F

Placas de cromatografía en capa fina

Se presentan fotocopias de los cromatogramas de capa fina, revelados con el reactivo de vainillina. Se usó cromatofolios Al de sílica gel 60 F-254 (Merck), en capas de 0.2 mm de espesor, y en cada caso se especifica el solvente utilizado. Se utilizó un tubo capilar (0.4 mm i.d.) para puntear la solución a analizar.

Figura F.1 Placa de cromatografía en capa fina de las subfracciones preliminares HA'-1 a HA'-6 de *S. auriculata*; y de las subfracciones preliminares RA'-1 a RA'-6 de *S. auriculata*. Se usó cloroformo como eluyente (se punteó dos veces, una a la par de la otra).



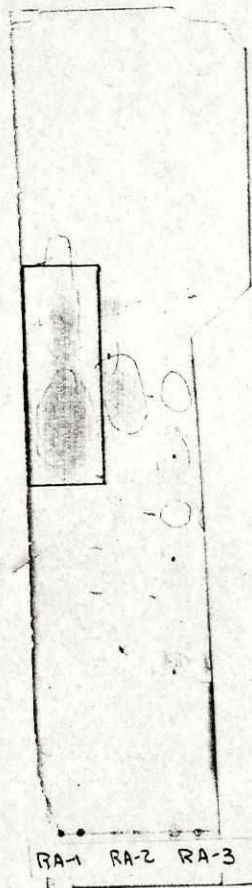


Figura F.2 Placa de cromatografía en capa fina de las subfracciones RA-1 a RA-3 de *S. auriculata*. Se usó hexano-acetato de etilo 8:2 (v:v) como eluyente (se punteó dos veces, una a la par de la otra).

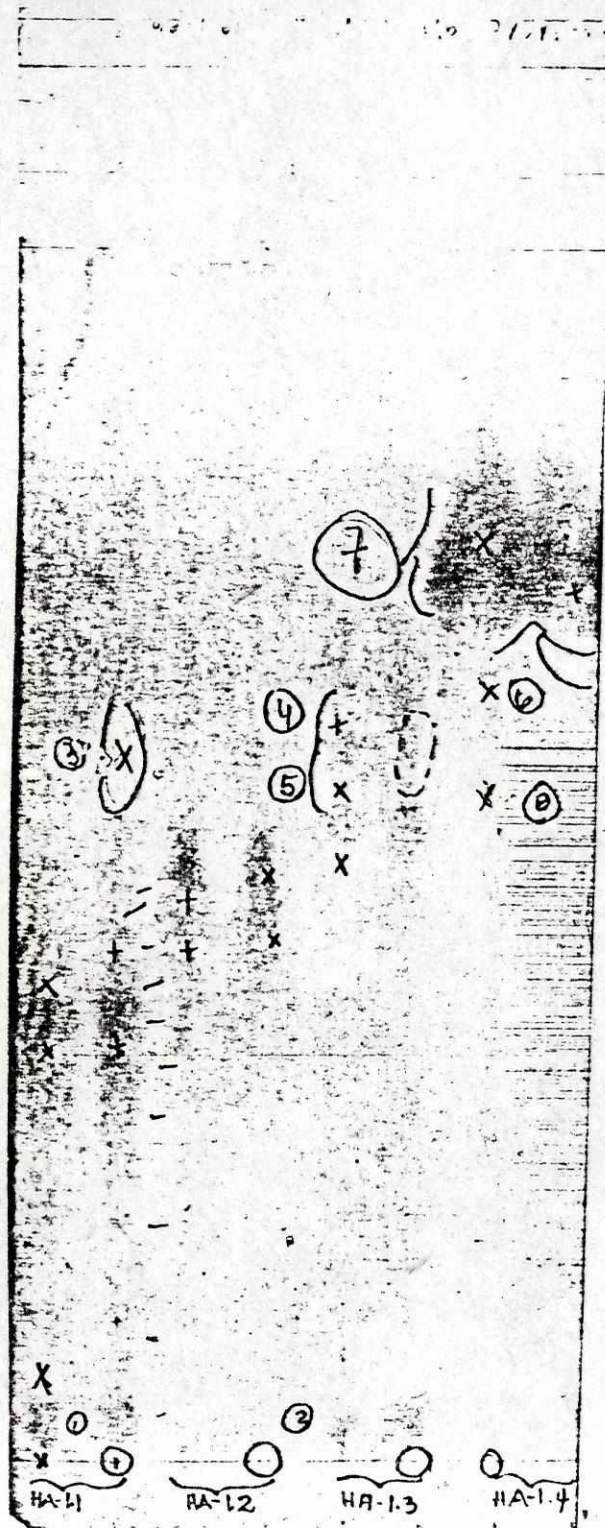


Figura F.3 Placa de cromatografía en capa fina de las subfracciones HA-1.1 a HA-1.4 de *S. auriculata*. Se usó hexano-acetato de etilo 9:1 (v:v) como eluyente (se punteó dos veces, una a la par de la otra).

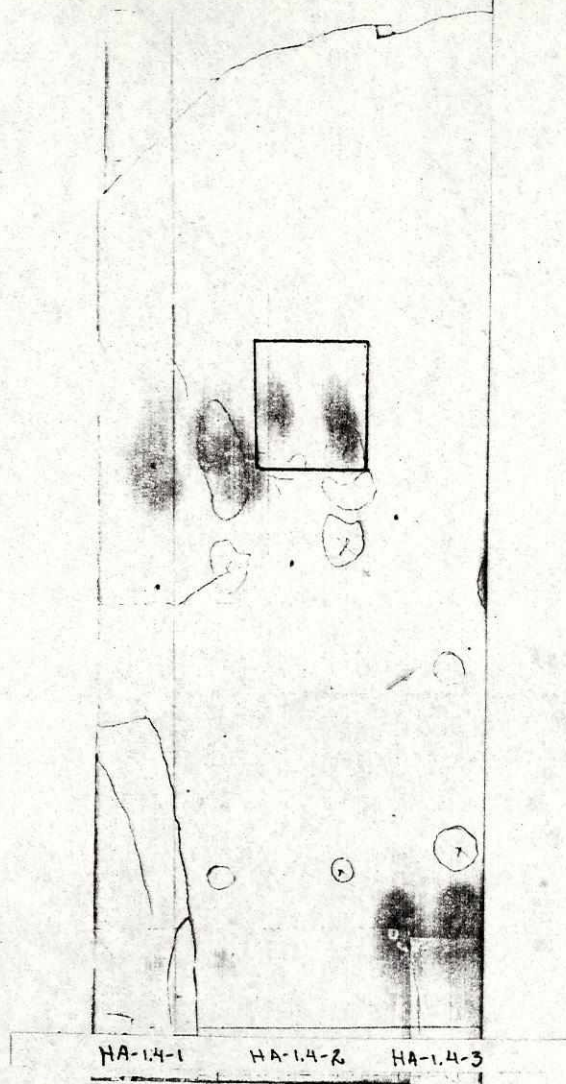


Figura F.4 Placa de cromatografía en capa fina de las subfracciones HA-1.4-1 a HA-1.4-3 de *S. auriculata*. Se usó hexano-acetato de etilo 9:1 (v:v) como eluyente (se punteó dos veces, una a la par de la otra).

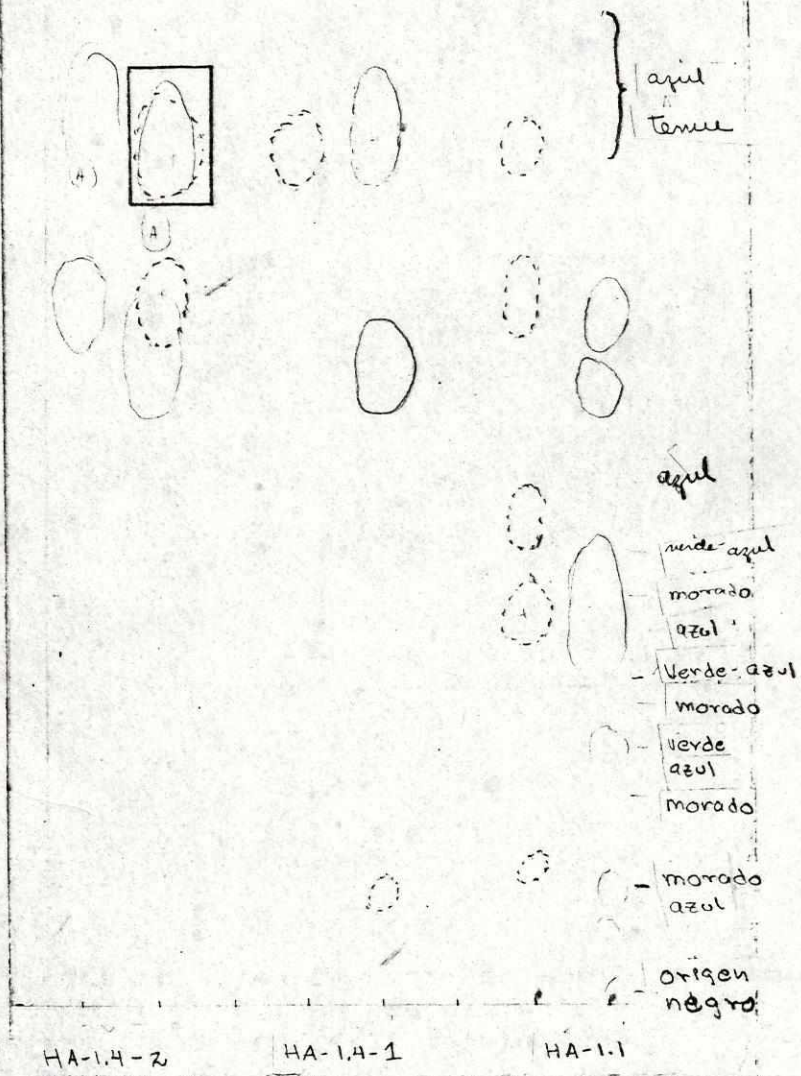


Figura F.5 Placa de cromatografía en capa fina de las subfracciones HA-1.1, HA-1.4-1 y HA-1.4-2 de *S. auriculata*. Se usó hexano-acetato de etilo 9:1 (v:v) como eluyente (se punteó dos veces, una a la par de la otra).