



Universidad Nacional Autónoma De México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**“Toxicidad aguda en *Artemia franciscana*
Kellogg de aceites esenciales aislados de
cinco especias”**

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :
SÁNCHEZ BARRERA ALEJANDRA

ASESORA:

Q.F.B. BRÍGIDA DEL CARMEN CAMACHO ENRÍQUEZ

COASESOR:

Q. MARIO ARTURO MORALES DELGADO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO, 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Toxicidad aguda en *Artemia franciscana* Kellogg de aceites esenciales aislados de cinco especies

Que presenta la pasante: Alejandra Sánchez Barrera

Con número de cuenta: 303257226 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Febrero de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Enrique R. Angeles Anguiano	
VOCAL	Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enriquez	
SECRETARIO	Q.F.B. Gabriela Escalante Reynoso	
1er. SUPLENTE	Dra. Dolores Molina Jasso	
2do. SUPLENTE	L.F. Miguel Angel Trejo Rodríguez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm*

Agradecimientos

Este logro lo quiero dedicar con profundo agradecimiento a personas muy importantes en mi vida. A todos ustedes gracias porque con su ayuda, apoyo y comprensión me alentaron a lograr esta hermosa realidad.

Agradezco a Dios, por llenarme de bendiciones y amor, por el privilegio de tener una muy linda familia, y haber agregado en mi senda personas muy valiosas de las cuales he aprendido y me han motivado a continuar siempre adelante, sin él soy nada.

A mis padres, por su incansable esfuerzo y sacrificio, brindándome cada día el amor y los medios necesarios para culminar esta etapa de mi vida.

A mi madre, por darme su tiempo, sus consejos, su amor y confianza; gracias madre por saberme guiar en esta vida, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por enseñarme a luchar por mis sueños y no darme por vencida, eres la fuerza que me impulsa para estar de pie. Te amo.

A mi padre, por ser la persona que a pesar de las adversidades siempre ha estado conmigo y ha confiado en mí; gracias padre por darme tu amor, por enseñarme a ser una persona leal, honesta, comprometida, a ser como un bambú que se dobla pero no se quiebra; al igual que mi madre tu eres la fuerza para no quebrarme. Gracias te amo.

A Marcos mi querido hermano, todo lo que soy en gran medida te lo debo a ti, tú me has enseñado a no darme por vencida, a luchar con coraje para superarme; eres mi gran ejemplo a seguir. Gracias por ser esa persona dura pero a la vez muy noble conmigo y por tu apoyo en la realización de este sueño, gracias hermano te quiero mucho.

A Salvador mi querido hermano, que jamás dudo que yo llegara a esta meta, gracias por tenerme confianza, por tus palabras que me han dado aliento para poder seguir en el recorrido de esta vida que tú sabes no ha sido sencillo, pero te he tenido a mi lado para motivarme y no me has dejado caer, gracias, te quiero mucho.

A mi niño hermoso Salvador, gracias por estar en mi vida, por llenarla de alegrías y de buenos momentos, por enseñarme lo lindo que es vivir y soñar como niño; gracias, te quiero.

A mis sobrinas Erika, Anita y Mayrita, saben les quiero dar las gracias por todos los momentos de felicidad que me han regalado, por ser mis cómplices en algunas travesuras, ustedes me han dado la fuerza para culminar este proyecto y quiero que lo sientan como suyo. Las quiero mucho, nunca dejen de soñar.

A mi abue Chayo, gracias infinitas gracias en donde quiera que estés, por tus grandes enseñanzas que me forjaron a ser la persona que soy hoy, te recuerdo con gran amor siempre estarás en mis pensamientos y corazón.

A mí querida abuelita Natalia, gracias por enseñarme a sonreír a pesar de las adversidades, a trabajar día con día por mis sueños. A mi tía Ana María, gracias por sus palabras y enseñanzas, por su tiempo brindado para que yo aprendiera Química Analítica.

A Mayra, gracias por escucharme y emocionarte conmigo aunque nos regañen, sabes me hacía falta alguien con quien gritar, gracias por tus palabras de aliento; a veces hace falta escucharlas.

A Mari, gracias por aceptarme como tu hermana, por todos los momentos vividos, por estar ahí siempre dispuesta a ayudarme. Te quiero no lo olvides.

Al padre José García Solorio, gracias por sus palabras de aliento y de motivación para seguir adelante, por su confianza depositada en mí para poder guiar a los niños en su encuentro con Jesucristo. A mis niños del catecismo mil gracias por sus enseñanzas, los quiero.

A mis asesores de tesis, a la Profesora Brígida y al Profesor Mario, gracias por su esfuerzo y dedicación, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por darme la confianza en la realización de este proyecto, por transmitirme sus conocimientos; y sobre todo por su apoyo y cariño. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para la culminación de esta tesis. Ustedes han creado en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría tener una formación completa como profesional. Así como sentirme en deuda con ustedes por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado esta Tesis. Los admiro.

A mis amigos de vida, Nallely, Ángel y Carlos. Nalle muchas gracias por ser mi amiga, que a pesar de la distancia esta amistad sigue vigente; por enseñarme que los triunfos son el resultado del trabajo constante. Ángel, sabes, recuerdo nuestras largas charlas en las que soñábamos a ser QFB's; y al final no fue un sueño, ya somos QFB's, gracias por ser parte de esto. Carlos, gracias por tu amistad, siempre encuentras la manera de hacerme sonreír, aun en la distancia sabes hacerme sentir bien, eres de esas personitas que siempre llevaré en el corazón, te quiero, nunca lo olvides.

A mis amigas pinkys, gracias a las tres por compartir tan bellos momentos y permitirme ser parte de su vida. Dulce gracias por apoyarme y comprenderme en las altas y bajas que tuve durante mi carrera. Chayito mi gran amiga gracias por confiar en mí, sabes te has convertido en parte del motor que me ha impulsado a continuar y no parar, te quiero. Vane mi amiga la que siempre sabe sacarme una sonrisa con sus locuras, gracias.

Al cartel de los pinkys; Anita, Jannine, Mariana, Sandra, Lidia y Fernando, gracias por todas las locuras vividas.

A mi gran familia de Farmacognosia y Fitoquímica (Anita, Jannine, Isbo, Miguel, Lidia, Mary Carmen, Imelda, Mario, Daniel, Rebe, Beto, Sara, Sergio), por los grandes momentos que hemos vivido juntos gracias.

Gracias a mis grandes amigos. Anita tus palabras siempre las llevare en mi corazón. Jannine tus locuras siempre me sacan una sonrisa. Isbo mi gran amigo, jamás olvidare cuando me aventaste, te quiero. Miguel mi amigo gruñón al que quiero tanto, sabes eres ese hermano pequeño que la vida me debía y oh sorpresa ya lo encontré, gracias por ser parte de este sueño, te quiero no lo olvides. Lidia, ay amiga, eres pieza fundamental en mi vida y le doy gracias al Padre por ponerte en mi camino, sabes tus palabras, consejos y sobre todo tu comprensión siempre me hacen mucho bien, gracias infinitas gracias. Mario el niño lindo, eres de esas personas difíciles de encontrar, gracias por tu amistad. Daniel, el fulano te quiero mucho y mil gracias por escucharme.

Sergio eres de esas personas, que en poco tiempo he llegado a apreciar, te doy las gracias por tus palabras y enseñanzas, ah y sobre todo gracias por hacerme los días con tu hermosa sonrisa. Sarita mi amiga, mi querida amiga, sé que nuestra amistad es corta, pero sabes pareciera que te conozco de años que eres más que mi amiga y has dicho bien eres como una hermana en tiempos de angustia. Sabes creo que el Padre ya me mandó a mi hermana que tanto me hacía falta, gracias por estar en mi vida. Te quiero.

Gracias a la UNAM, en especial a la FESC Campo 1 por darme la oportunidad de tener una formación académica de calidad y por darme las bases necesarias para servir a la sociedad.

A tu amor mil gracias.

Al apoyo económico brindado por el proyecto PAPIME PE204814 “Actualización y fortalecimiento de la enseñanza experimental de Asignatura de Farmacognosia Y Fitoquímica de la licenciatura en Farmacia y Licenciatura en Bioquímica Diagnostica”.

Al técnico Académico Rodolfo Robles Gómez, quien se encargó de tomar la serie de micrografías por microscopia electrónica de barrido.

Al técnico Académico Draucin Jiménez Celi, que se encargó de la realización del material de vidrio utilizado para la experimentación.

Este trabajo fue presentado en:

XXII Congreso de educación química farmacéutica Biológica y XVIII Reunión Nacional de Estudiantes de Farmacia. Celebrado en Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx. 25, 26 y 27 de septiembre del 2013, con el título de:

Toxicidad aguda en *Artemia franciscana* Kellogg del aceite esencial aislado de la especie *Lippia graveolens* Kunth (orégano).

XXIII Congreso de educación química farmacéutica Biológica y IXX Reunión Nacional de Estudiantes de Farmacia. México, DF, del 1-3 de octubre del 2014, con el título de:

Toxicidad aguda del aceite esencial de la especie *Syzygium aromaticum* (clavo) en el bioensayo de *Artemia franciscana*.

Índice general

ÍNDICE DE DIAGRAMAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	IV
ÍNDICE DE GRÁFICAS	V
ÍNDICE DE MICROGRAFÍAS	V
ÍNDICE DE SERIE FOTOGRÁFICA	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	VIII
GLOSARIO	IX
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MARCO TEÓRICO	2
2.1 ACEITES ESENCIALES	2
2.1.1 <i>Reseña histórica</i>	2
2.1.2 <i>Definición</i>	2
2.1.3 <i>Composición química de los AE</i>	3
2.1.4 <i>Factores que influyen en la composición química de los AE</i>	6
2.1.5 <i>Fuentes y ubicación de los AE en la planta</i>	7
2.1.6 <i>Control de calidad de los aceites esenciales</i>	7
2.1.7 <i>Usos de los aceites esenciales</i>	7
2.1.8 <i>Métodos de extracción de los aceites esenciales</i>	8
2.1.9 <i>Otros métodos de extracción de AE</i>	9
2.1.10 <i>Toxicidad de los aceites esenciales</i>	10
2.2 ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	10
2.2.1 <i>Clasificación de los diferentes bioensayos que existen:</i>	11
2.2.2 <i>Requisitos para seleccionar la especie útil para desarrollar un bioensayo</i>	11
2.2.3 <i>Bioensayos de toxicidad aguda en Artemia franciscana</i>	11
2.3 ARTEMIA FRANCISCANA	12
2.3.1 <i>Taxonomía</i>	12
2.3.2 <i>Distribución geográfica</i>	13
2.3.3 <i>Ciclo de vida</i>	13
2.3.4 <i>Morfología</i>	14
2.3.5 <i>Alimentación</i>	16
2.3.6 <i>Reproducción</i>	16
2.3.7 <i>Parámetros para la eclosión y el mantenimiento de Artemia franciscana en el laboratorio</i>	18
2.3.8 <i>La importancia del bioensayo de Artemia en las investigaciones</i>	19
2.4 CLAVO	19
2.4.1 <i>Sinonimia popular</i>	20
2.4.2 <i>Sinónima botánica</i>	20
2.4.3 <i>Taxonomía</i>	20
2.4.4 <i>Descripción botánica</i>	20
2.4.5 <i>Distribución</i>	20
2.4.6 <i>Hábitat</i>	20
2.4.7 <i>Usos</i>	21
2.4.8 <i>Composición química del aceite esencial de clavo (AEC)</i>	21
2.4.9 <i>Usos de AEC</i>	21
2.5 EPAZOTE	22
2.5.1 <i>Sinonimia popular</i>	22
2.5.2 <i>Sinonimia botánica</i>	22

2.5.3	Taxonomía.....	22
2.5.4	Descripción botánica.....	22
2.5.5	Distribución.....	23
2.5.6	Hábitat.....	23
2.5.7	Usos.....	23
2.5.8	Características y composición química del aceite esencial de Epazote (AEE).....	23
2.6	LAUREL.....	24
2.6.1	Sinonimia popular.....	24
2.6.2	Sinonimia botánica.....	24
2.6.3	Taxonomía.....	25
2.6.4	Descripción botánica.....	25
2.6.5	Distribución.....	25
2.6.6	Hábitat.....	25
2.6.7	Usos.....	25
2.6.8	Composición química del aceite esencial de Laurel (AEL).....	26
2.7	ORÉGANO.....	26
2.7.1	Sinonimia popular.....	26
2.7.2	Sinonimia botánica.....	26
2.7.3	Taxonomía.....	27
2.7.4	Descripción botánica.....	27
2.7.5	Distribución.....	27
2.7.6	Hábitat.....	27
2.7.7	Usos.....	28
2.7.8	Actividad Farmacológica.....	28
2.7.9	Composición química del Aceite esencial de orégano (AEO).....	28
2.7.10	Usos del AEO.....	28
2.8	ROMERO.....	29
2.8.1	Sinonimia popular.....	29
2.8.2	Taxonomía.....	29
2.8.3	Descripción botánica.....	29
2.8.4	Distribución.....	30
2.8.5	Hábitat.....	30
2.8.6	Usos.....	30
2.8.7	Actividad farmacológica.....	30
2.8.8	Características y composición química del aceite esencial de romero (AER).....	31
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	OBJETIVO GENERAL:.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	METODOLOGÍA.....	33
4.1	ECLOSIÓN DE ARTEMIA.....	33
4.1.1	Control de calidad a quistes de Artemia.....	33
4.1.2	Eclosión.....	33
4.1.3	Control de Calidad de Nauplis.....	34
4.1.4	Estudio gráfico del ciclo de vida de Artemia franciscana.....	35
4.2	ACEITES ESENCIALES.....	36
4.2.1	Materia prima.....	36
4.2.2	Obtención de los aceites esenciales.....	38
4.2.3	Control de calidad.....	39
4.3	BIOENSAYO.....	42
4.3.1	Preparación de las concentraciones de los aceites esenciales a evaluar.....	42
4.3.2	Evaluación de toxicidad.....	42
4.3.3	Controles.....	43
4.3.4	Tiempo de prueba.....	44
4.3.5	Criterio para dictaminar vivas o muertas.....	44

4.3.6	<i>Calculo de CL₅₀</i>	44
4.4	ESTUDIO GRÁFICO DE EVALUACIÓN DE TOXICIDAD	44
5	RESULTADOS	47
5.1	ECLOSIÓN DE ARTEMIA.....	47
5.1.1	<i>Control de calidad</i>	47
5.1.2	<i>Estudio gráfico del ciclo de vida de la Artemia</i>	47
5.2	ACEITES ESENCIALES.....	47
5.2.1	<i>Materia prima</i>	47
5.2.2	<i>Obtención de los aceites esenciales</i>	51
5.3	BIOENSAYO	59
5.3.1	<i>Selección del coadyuvante de solubilidad</i>	59
5.3.2	<i>Evaluación de toxicidad</i>	59
5.4	ESTUDIO GRÁFICO DE EVALUACIÓN DE TOXICIDAD	65
5.4.2	<i>Fotografías (teñidas y sin teñir) y micrografías de los nauplis tratados con los AE</i>	69
6	DISCUSIÓN	79
6.1	ECLOSIÓN DE ARTEMIA	79
6.2	OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	80
6.2.1	<i>Materia prima</i>	80
6.2.2	<i>Control de calidad a los aceites esenciales</i>	82
6.3	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	87
6.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	87
6.5	CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA Y ESTUDIO GRÁFICO	87
7	CONCLUSIONES	93
8	PROSPECTIVAS	94
9	BIBLIOGRAFÍA	95
10	ANEXOS.....	101
10.1	ANEXO A.....	101
10.1.1	<i>Micrografías completas del ciclo de la Artemia en MEB</i>	101
10.2	ANEXO B.....	106
10.2.1	<i>Ecuaciones utilizadas para obtener:</i>	106
10.3	ANEXO C.....	108
10.3.1	<i>Cartas Munsell</i>	108
10.4	ANEXO D.....	111
10.4.1	<i>Cálculos de concentraciones de los AE a evaluar</i>	111
10.5	ANEXO E	118
10.5.1	<i>Control de calidad de los quistes y nauplis de 24hrs. de eclosión</i>	118
10.6	ANEXO F	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
10.6.1	<i>Series fotográficas</i>	¡Error! Marcador no definido.
10.7	ANEXO G.....	122
10.7.1	<i>Certificados y fotografías de identificación de las plantas utilizadas</i>	122
10.8	ANEXO H.....	135
10.8.1	<i>Análisis probit</i>	135

Índice de diagramas

DIAGRAMA 1. ECLOSIÓN DE ARTEMIA.	37
DIAGRAMA 2. OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIAL.....	41
DIAGRAMA 3. PREPARACIÓN DE CONCENTRACIONES.	43
DIAGRAMA 4. EVALUACIÓN DE TOXICIDAD.	45
DIAGRAMA 5. ESTUDIO GRÁFICO DE EVALUACIÓN DE TOXICIDAD.	46

Índice de figuras

FIGURA 1. CUADRO GENERAL DEL METABOLISMO SECUNDARIO.	4
FIGURA 2. MODOS REPRODUCTIVOS DE ARTEMIA.	17
FIGURA 3. FLORES DE CLAVO.	19
FIGURA 4. EUGENOL.	21
FIGURA 5. β -CARIOFILENO.	21
FIGURA 6. ACETATO DE EUGENILO.	21
FIGURA 7. ASCARIDOL.	24
FIGURA 8. 1,8-CINEOL.	26
FIGURA 9. SABINENO.	26
FIGURA 10. TIMOL.	28
FIGURA 11. CARVACROL.	28
FIGURA 12. ALCANFOR.	31
FIGURA 13. α -PINENO.	31
FIGURA 14. 1,8-CINEOL.	31
FIGURA 15. DISPOSITIVO DE HIDRODESTILACIÓN ADAPTADO CON UNA TRAMPA TIPO CLEVANGER.	38
FIGURA 16. EQUIPO DE HIDRODESTILACIÓN ADAPTADO CON UNA TRAMPA DE DEAN-STARK.	39
FIGURA 17. ESPECTRO DE IR DEL AEC.	54
FIGURA 18. ESPECTRO DE IR DEL AEE.	55
FIGURA 19. ESPECTRO DE IR DEL AEL.	56
FIGURA 20. ESPECTRO DE IR DEL AEO.	57
FIGURA 21. ESPECTRO DE IR DEL AER.	58
<i>FIGURA 22. EUGENOL.</i>	<i>83</i>
<i>FIGURA 23. B-CARIOFILENO.</i>	<i>83</i>
<i>FIGURA 24. ACETATO DE EUGENILO.</i>	<i>83</i>
FIGURA 25. CARVACROL.	84
FIGURA 26. ASCARIDOL.	84
FIGURA 27. PIPERITONA.	84
<i>FIGURA 28. 1,8-CINEOL.</i>	<i>84</i>
<i>FIGURA 29. SABINENO.</i>	<i>84</i>
<i>FIGURA 30. ALCANFOR.</i>	<i>85</i>
<i>FIGURA 31. A-PINENO.</i>	<i>85</i>
<i>FIGURA 32. 1,8-CINEOL.</i>	<i>85</i>
<i>FIGURA 33. TIMOL.</i>	<i>86</i>
<i>FIGURA 34. CARVACROL.</i>	<i>86</i>
<i>FIGURA 35. 1,8-CINEOL. MAYORITARIO (16.82%)</i>	<i>86</i>
FIGURA 36. P-CIMENO (7.46%).....	86
FIGURA 37. TERPINEOL. (7.62).....	86
FIGURA 38. CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DE LA CUTÍCULA DE LOS ARTRÓPODOS.	88

Índice de fotografías

FOTOGRAFÍA 1. ARTEMIA HEMBRA.	14
FOTOGRAFÍA 2. ARTEMIA MACHO.....	15
FOTOGRAFÍA 3. PLANTA DE EPAZOTE.	22
FOTOGRAFÍA 4. PARTE DE UN ÁRBOL DE LAUREL.	24
FOTOGRAFÍA 5. ORÉGANO MEXICANO. LIPPIA GRAVEOLENS.	26
FOTOGRAFÍA 6. ARBUSTO DE ROMERO.	29
FOTOGRAFÍA 7. EQUIPO DE ECLOSIÓN.	35

FOTOGRAFÍA 8. HOJA DE EPAZOTE.....	50
FOTOGRAFÍA 9. BOTONES FLORALES DEL CLAVO.....	50
FOTOGRAFÍA 10. FLOR Y HOJAS DE ORÉGANO.....	51
FOTOGRAFÍA 11. HOJA DE LAUREL.....	51
FOTOGRAFÍA 12. FLORES Y HOJAS DE ROMERO.....	51
FOTOGRAFÍA 13. NAUPLI DE A. FRANCISCANA CONTROL NEGATIVO, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN.....	66
FOTOGRAFÍA 14. NAUPLI DE A. FRANCISCANA CONTROL NEGATIVO, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN, TEÑIDO CON SAFRANINA O.....	66
FOTOGRAFÍA 15. NAUPLI DE A. FRANCISCANA CONTROL POSITIVO, (K ₂ CrO ₇ 500 PPM), DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN.....	67
FOTOGRAFÍA 16. NAUPLI DE A. FRANCISCANA CONTROL POSITIVO (K ₂ CrO ₇ 500 PPM), DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN, TEÑIDO CON SAFRANINA O.....	68
FOTOGRAFÍA 17. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 100 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN.....	69
FOTOGRAFÍA 18. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 100 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN, TEÑIDO CON SAFRANINA O.....	69
FOTOGRAFÍA 19. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 100 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN.....	70
FOTOGRAFÍA 20. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 100 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN.....	71
FOTOGRAFÍA 21. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 100 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN, TEÑIDO CON SAFRANINA O.....	71
FOTOGRAFÍA 22. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 100 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN.....	72
FOTOGRAFÍA 23. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 640 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN.....	73
FOTOGRAFÍA 24. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 640 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN, TEÑIDO CON SAFRANINA O.....	73
FOTOGRAFÍA 25. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 640 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN.....	74
FOTOGRAFÍA 26. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 100 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN.....	75
FOTOGRAFÍA 27. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 100 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN, TEÑIDO CON SAFRANINA O.....	75
FOTOGRAFÍA 28. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 100 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN.....	76
FOTOGRAFÍA 29. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 260 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN.....	77
FOTOGRAFÍA 30. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 260 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN, TEÑIDO CON SAFRANINA O.....	77
FOTOGRAFÍA 31. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 260 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN.....	78
FOTOGRAFÍA 32. QUISTES HIDRATADOS DE ARTEMIA.....	79
FOTOGRAFÍA 33. SYZYGIIUM AROMATICUM.....	125
FOTOGRAFÍA 34. TELOXYS AMBROSIOIDES.....	127
FOTOGRAFÍA 35. LITSEA GLAUCESCENS.....	129
FOTOGRAFÍA 36. LIPPIA GRAVEOLENS.....	131
FOTOGRAFÍA 37. ROSMARINUS OFFICINALIS.....	133

Índice de gráficas

GRÁFICA 1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS PROBIT PARA AEC.....	62
GRÁFICA 2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS PROBIT PARA AEE.....	63
GRÁFICA 3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS PROBIT PARA AEL.....	63
GRÁFICA 4. RESULTADOS DEL ANÁLISIS PROBIT PARA AEO.....	64
GRÁFICA 5. RESULTADOS DEL ANÁLISIS PROBIT PARA AER.....	64

Índice de micrografías

MICROGRAFÍA 1. POR MEB (150x) DEL NAUPLIO DE A. FRANCISCANA CONTROL NEGATIVO, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN. .	65
MICROGRAFÍA 2. POR MEB (150x) DEL NAUPLIO DE A. FRANCISCANA CONTROL POSITIVO, (K ₂ Cr ₂ O ₇ 500 PM) DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN.....	67

MICROGRAFÍA 3. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 100 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN A 100x.	70
MICROGRAFÍA 4. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 100 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN A 100x.	72
MICROGRAFÍA 5. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 640 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN A 100x.	74
MICROGRAFÍA 6. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 100 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN A 100x.	76
MICROGRAFÍA 7. NAUPLI DE A. FRANCISCANA A LA CONCENTRACIÓN DE 260 PPM, DESPUÉS DE 24 H DE EXPOSICIÓN A 100x.	78
MICROGRAFÍA 8. QUISTE DE ARTEMIA A 150x.....	101
MICROGRAFÍA 9. ECLOSIÓN DE ARTEMIA A 100x.....	101
MICROGRAFÍA 10. NAUPLI DE ARTEMIA RECIÉN ECLOSIONADO A 100x.....	102
MICROGRAFÍA 11. NAUPLI DE ARTEMIA DE 24HRS. DE ECLOSIÓN A 150x.....	102
MICROGRAFÍA 12. METANAUPLI DE ARTEMIA 400x.....	103
MICROGRAFÍA 13. METANAUPLI DE ARTEMIA 400x.....	103
MICROGRAFÍA 14. EJEMPLAR JUVENIL DE ARTEMIA 400x.....	104
MICROGRAFÍA 15. PARTE DE LAS TENAZAS DE UNA ARTEMIA MACHO 400x.....	104
MICROGRAFÍA 16. PARTE DE UN TORACÓPODO 400x.....	105

Índice de serie fotográfica

SERIE FOTOGRAFICA 1. CICLO DE VIDA DE LA ARTEMIA FRANCISCANA ⁵	48
SERIE FOTOGRAFICA 2. CICLO DE VIDA DE LA ARTEMIA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).....	49

Índice de tablas

TABLA 1. MONOTERPENOS MÁS FRECUENTES DE LOS AE.....	5
TABLA 2. SESQUITERPENOS MÁS FRECUENTES DE LOS AE.....	6
TABLA 3. OTROS COMPONENTES AROMÁTICOS PRESENTES EN LOS AE.....	6
TABLA 4. CRITERIOS UTILIZADOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	7
TABLA 5. APLICACIONES DE LOS ACEITES ESENCIALES A NIVEL INDUSTRIAL.....	8
TABLA 6. PRINCIPALES CATEGORÍAS TAXONÓMICAS DE ARTEMIA.....	12
TABLA 7. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL CLAVO.....	20
TABLA 8. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL EPAZOTE.....	22
TABLA 9. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAUREL.....	25
TABLA 10. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL ORÉGANO.....	27
TABLA 11. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL ROMERO.....	29
TABLA 12. RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD DE LOS QUISTES DE ARTEMIA.....	47
TABLA 13. RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD DE LOS NAUPLIS DE ARTEMIA DE 24 H DE ECLOSIÓN.....	47
TABLA 14. RESULTADOS DEL CERTIFICADO DE IDENTIDAD DE LAS PLANTAS UTILIZADAS.....	50
TABLA 15. TIPO DE MATERIA EXTRAÑA ENCONTRADA EN EL MATERIAL VEGETAL UTILIZADO.....	50
TABLA 16. PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN.....	51
TABLA 17. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS.....	52
TABLA 18. RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD DE CADA ACEITE ESENCIAL.....	52
TABLA 19. DETERMINACIONES FISICOQUÍMICAS DE LOS AE.....	53
TABLA 20. CANTIDAD DE TWEEN 80 UTILIZADA.....	59
TABLA 21. RESULTADOS DEL BIOENSAYO DE LETALIDAD DE ARTEMIA, UTILIZANDO AEC.....	59
TABLA 22. RESULTADOS DEL BIOENSAYO DE LETALIDAD DE ARTEMIA, UTILIZANDO AEE.....	60
TABLA 23. RESULTADOS DEL BIOENSAYO DE LETALIDAD DE ARTEMIA, UTILIZANDO AEL.....	60
TABLA 24. RESULTADOS DEL BIOENSAYO DE LETALIDAD DE ARTEMIA, UTILIZANDO AEO.....	61
TABLA 25. RESULTADOS DEL BIOENSAYO DE LETALIDAD DE ARTEMIA, UTILIZANDO AER.....	61
TABLA 26. DETERMINACIÓN DE CL ₅₀	62
TABLA 27. CRITERIOS DE LETALIDAD.....	62
TABLA 28. FRECUENCIAS IDENTIFICADAS EN ESPECTROFOTOMETRÍA IR DEL AEC.....	83
TABLA 29. FRECUENCIAS IDENTIFICADAS EN ESPECTROFOTOMETRÍA IR DEL AEE.....	84

TABLA 30. FRECUENCIAS IDENTIFICADAS EN ESPECTROFOTOMETRÍA IR DEL AEL.....	85
TABLA 31. FRECUENCIAS IDENTIFICADAS EN ESPECTROFOTOMETRÍA IR DEL AER.....	85
TABLA 32. FRECUENCIAS IDENTIFICADAS EN ESPECTROFOTOMETRÍA IR DEL AEO	86
TABLA 33. TAMAÑO PROMEDIO DE LOS QUISTES	118
TABLA 34. TAMAÑO PROMEDIO DE LOS NAUPLIS	119
TABLA 35. ESTIMACIONES DE LOS PARÁMETROS (AEC).....	135
TABLA 36. COVARIANZAS Y CORRELACIONES DE ESTIMACIONES DE LOS PARÁMETROS (AEC).	135
TABLA 37. CONTRASTES DE CHI-CUADRADO (AEC).	135
TABLA 38. RESIDUOS Y FRECUENCIAS DE CASILLAS (AEC).	135
TABLA 39. LÍMITES DE CONFIANZA (AEC).	136
TABLA 40. ESTIMACIONES DE LOS PARÁMETROS (AEE).....	137
TABLA 41. COVARIANZAS Y CORRELACIONES DE ESTIMACIONES DE LOS PARÁMETROS (AEE).	137
TABLA 42. CONTRASTES DE CHI-CUADRADO (AEE).	137
TABLA 43. RESIDUOS Y FRECUENCIAS DE CASILLAS (AEE).	137
TABLA 44. LÍMITES DE CONFIANZA (AEE).....	138
TABLA 45. ESTIMACIONES DE LOS PARÁMETROS (AEL).	139
TABLA 46. COVARIANZAS Y CORRELACIONES DE ESTIMACIONES DE LOS PARÁMETROS (AEL).....	139
TABLA 47. CONTRASTES DE CHI-CUADRADO (AEL).	139
TABLA 48. RESIDUOS Y FRECUENCIAS DE CASILLAS (AEL).....	139
TABLA 49. LÍMITES DE CONFIANZA (AEL).	140
TABLA 50. ESTIMACIONES DE LOS PARÁMETROS (AEO).	141
TABLA 51. COVARIANZAS Y CORRELACIONES DE ESTIMACIONES DE LOS PARÁMETROS (AEO).....	141
TABLA 52. CONTRASTES DE CHI-CUADRADO (AEO).	141
TABLA 53. RESIDUOS Y FRECUENCIAS DE CASILLAS (AEO).....	141
TABLA 54. LÍMITES DE CONFIANZA (AEO).	142
TABLA 55. ESTIMACIONES DE LOS PARÁMETROS (AER).	143
TABLA 56. COVARIANZAS Y CORRELACIONES DE ESTIMACIONES DE LOS PARÁMETROS (AER).	143
TABLA 57. CONTRASTES DE CHI-CUADRADO (AER).	143
TABLA 58. RESIDUOS Y FRECUENCIAS DE CASILLAS (AER).	143
TABLA 59. LÍMITES DE CONFIANZA (AER).	144

Abreviaturas y acrónimos

AE	Aceites esenciales
AEC	Aceite esencial de clavo
AEE	Aceite esencial de epazote
AEL	Aceite esencial de laurel
AEO	Aceite esencial de orégano
AER	Aceite esencial de romero
Da	Dalton
DMAPP	Dimetilalil Pirofosfato
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FPP	Farnesil Pirofosfato
GGPP	Geranilgeranil Pirofosfato
HD	Hidrodestilación
IPP	Isopentenil Pirofosfato
MEP	Metileritritol Fosfato
MVA	Ácido Mevalónico
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SNC	Sistema Nervioso Central

Glosario

Amíctico: Que no puede ser fertilizado, aplicado a huevos partenogénéticos que dan lugar a hembras.

Crustáceo: Clase de artrópodos de respiración branquial, con dos pares de antenas, el cuerpo cubierto por un caparazón duro, la cabeza y el tórax soldados formando cefalotórax, y las patas dispuestas unas para la prensión y otras para la locomoción.

Diapausa: Periodo de desarrollo interrumpido en el ciclo vital de embriones, larvas, pupas, insectos en el que el nivel de actividad fisiológica es muy bajo pudiendo resistir condiciones externas muy desfavorables.

Dimorfismo sexual: Es la diferencia de formas y/o tamaños entre machos y hembras de una misma especie. Se presenta en la mayoría de las especies, en mayor o menor grado.

Dosis letal 50: Es la dosis única que, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte del 50% de los animales a los que se haya administrado.

Endopodito: Rama interna del protopodito del apéndice de un crustáceo.

Estadio: Etapa o fase de un proceso, desarrollo o transformación.

Exopodito: La rama exterior del protopodito del apéndice de un crustáceo.

Foliáceo: Relativo o parecido a las hojas de las plantas.

Larva: Animal en estado de desarrollo, cuando ha abandonado las cubiertas del huevo y es capaz de nutrirse por sí mismo, pero aún no ha adquirido la forma y la organización propia de los adultos de su especie.

Maxilas: Pieza bucal de los crustáceos.

Metanaupli: Estado larvario más largo del ciclo de vida de la Artemia.

Nauplio: Como se le conoce a la Artemia recién eclosionada.

Ovíparo: Es un animal cuya modalidad de reproducción incluye el depósito de huevos en el medio externo donde completan su desarrollo antes de la eclosión.

Ovoviviparidad: es un tipo de desarrollo embrionario en el que el animal pone huevos, pero estos permanecen dentro del cuerpo de la hembra hasta que el embrión está completamente desarrollado. La eclosión puede producirse inmediatamente antes del parto o inmediatamente después de la puesta.

Partenogénesis: Modo de reproducción de algunos animales y plantas, que consiste en la formación de un nuevo ser por división reiterada de células sexuales femeninas que no se han unido previamente con gametos masculinos.

Protopodito: Parte basal del apéndice de un crustáceo.

Somita: Cada uno de los segmentos en que se divide el mesodermo del tronco del embrión.

Telopodito: Apéndice locomotor de los crustáceos.

Telson: Segmento terminal de un artrópodo, especialmente el impar de los crustáceos.

Toracópodos: Segmentos que forman parte de la estructura del tórax de los crustáceos.

Vitelo: Conjunto de sustancias de reserva contenidas en el huevo o cigoto de las que se alimenta el embrión en las primeras fases de su desarrollo.

1 Introducción

Durante toda su historia los humanos han tenido una estrecha relación con las plantas aromáticas, pues desde niños nos hemos familiarizado con sabores y olores particulares, que siempre han formado parte de nuestras vidas. Historia que comienza recordándonos las múltiples aplicaciones de aquellas sustancias con su aroma característico.

El uso de las plantas aromáticas data desde tiempos inmemoriales, que van desde la cultura Mesopotámica, donde se encontraron piezas de equipos de destilación de esencias, el uso del tomillo por parte de los Egipcios para la elaboración de cerveza, o hasta la época de aquellos expedicionarios como Marco Polo y Colón, quienes cada vez que pisaban tierras nuevas descubrían especias raras con olores y fragancias riquísimas.

En la actualidad, el mercado mundial de los aceites esenciales ha experimentado un aumento, como consecuencia del cambio de patrones en el consumo debido a la tendencia de la utilización de productos naturales. Por consecuencia es que el estudio de los aceites esenciales ha llamado la atención de la ciencia, convirtiéndose así en un área amplia de investigación y desarrollo, debido a la gran acogida que tienen dentro de la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos, entre otras.

En México el uso de aceites esenciales al igual que en el Mundo ha ido creciendo; debido a la utilización de alternativas naturales contra padecimientos que en la actualidad nos aquejan; como lo son cáncer (el aceite esencial de *Melisa officinalis* L. mostró su actividad en cultivos celulares Hep-2 de cáncer de laringe), estrés entre otras, es por esto, que su uso es cada día más frecuente, lo que lleva a estudiar su toxicidad, para así evitar efectos no deseados (Can & Buchbauer, 2010).

De acuerdo a lo anteriormente referido, es imprescindible establecer los efectos tóxicos de las drogas y sus principios activos, para ello se realizan estudios de toxicidad aguda, subaguda y crónica sobre animales de experimentación (Kuklinski, 2003).

Por lo anteriormente referido es que surge el interés de determinar la toxicidad aguda de los aceites esenciales de cinco especias; las cuales son ampliamente utilizadas en la cocina mexicana y además presentan una gran variedad de actividades farmacológicas, como: antibacterial, antiviral, larvicida, moluscida, fungicida, antiséptico, espasmolítico y un anestésico local entre otros (Arcila & Loarca, 2004), para poder inferir su probable actividad citotóxica.

Dicha investigación se llevó a cabo en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en el laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica (L-324) en Campo 1.

2 Marco teórico

2.1 Aceites esenciales

2.1.1 Reseña histórica

La aparición de las primeras civilizaciones y su preocupación por la imagen y apariencia ante los demás puede considerarse como detonante indirecto para la búsqueda, el estudio y el conocimiento de los aceites esenciales (AE). Los primeros testimonios escritos sobre AE proceden de Egipto, China, India, Arabia, Persia y Grecia, en los que se demostraban los sofisticados conocimientos y tradiciones que imperaban en el cultivo y los usos de hierbas y especias (Loewenfeld & Back, 1980).

Una visión más “esotérica” de los aceites esenciales los define como la fuerza vital de la planta, equivalente al espíritu o alma de los humanos.

La utilización de los aceites esenciales y el conocimiento de sus propiedades curativas se remontan a las civilizaciones China y Egipcia y están considerados como, una de las tantas formas más antiguas de medicina y cosmética. A partir de la extracción de los aceites esenciales de plantas aromáticas, los egipcios hacían pomadas verdaderamente milagrosas, también los utilizaban para embalsamar los muertos, para fines espirituales, medicinales y cosméticos.

Los griegos también comprendían los efectos milagrosos del aroma de ciertas flores y plantas. Adquirieron la mayor parte de sus conocimientos a través de los egipcios, que eran excelentes conocedores de sus propiedades. El médico Hipócrates, considerado padre de la medicina, recomendaba muchas veces masajes con aceites esenciales y en sus escritos hace referencia a un vasto número de plantas medicinales.

Los romanos y más tarde los árabes, perfeccionarían los conocimientos adquiridos a través de las civilizaciones que los precedieron. En la civilización árabe destaca la contribución del famoso médico alquimista Avicena, pionero en el método de la destilación de plantas medicinales con alambiques. A pesar de haber surgido otros métodos más sofisticados, éste sigue siendo más utilizado y aconsejable para la obtención de esencias.

Muchos siglos después, el conocimiento de los poderes curativos de las plantas empezó a perderse, pero su creencia se mantuvo dentro de los monasterios, entre los monjes que preparaban, entre otras, soluciones antibacterianas que pretendían combatir las pestes que en la época diezaban las poblaciones (Díaz, 2007).

2.1.2 Definición

Los términos aceite esencial (AE) o esencia son utilizados para referirse a las sustancias líquidas, aromáticas y volátiles, de características lipofílicas. Estas sustancias son sintetizadas por las plantas como metabolitos secundarios y pueden ser extraídas mediante métodos físicos como la destilación a vapor y la hidrodestilación, y que llevan en sí misma

la huella, olor y sabor, del material vegetal del que proceden; tienen un papel muy importante en la protección de las plantas actuando como agentes antibacterianos, antivirales, antifúngicos e insecticidas (Bauer, Garbe, & Surburg, 2001).

Los AE poseen una composición química compleja, aunque generalmente consisten en una mezcla de un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, etc., de peso molecular menor de 400 Da y presión de vapor suficientemente alta para volatilizarse a temperatura ambiente; son derivadas del metabolismo secundario (figura 1) de las plantas y asociadas o no a otros componentes (Vargas & Bottia, 2008).

Los metabolitos secundarios volátiles tienen una distribución restringida en la naturaleza, la cual se limita a ciertas plantas llamadas “aromáticas”, en algunos casos, a solo algunas especies o subespecies, por lo que son consideradas como una manifestación individual del organismo que las contiene y se les atribuye una gran variedad de funciones específicas, por lo que éstos deben tener algún significado biológico, ya que son biosintetizados y biodegradados.

En la actualidad se conocen alrededor de 3000 AE, 300 de los cuales son comercialmente importantes para la industria farmacéutica, sanitaria, cosmética y alimentaria. Los AE y/o muchos de sus componentes son ampliamente usados en perfumería, cosmética, en industria farmacéutica, odontología, agricultura, como aditivos en la industria alimentaria y como remedios naturales. Por ejemplo, d- limoneno, acetato de geranilo o d-carvona, se utilizan en perfumes, cremas, jabones, como aroma en productos químicos de limpieza y como aditivos en alimentación. Además, el uso de mezclas de AE está siendo ampliado en la actualidad con fines terapéuticos y en aromaterapia (Hernández, 2011).

2.1.3 Composición química de los AE

Los AE son mezclas complejas que pueden contener más 200 compuestos de diferentes estructuras químicas en concentraciones muy diferentes. Normalmente, sus propiedades son atribuidas a dos o tres componentes mayoritarios (20-70%), que son los que determinan la actividad biológica de los mismos.

La Figura 1 muestra de manera general las principales rutas biosintéticas que conforman el metabolismo secundario. Entre los componentes principales de los aceites esenciales se encuentran los terpenos formados por la ruta del mevalonato y del metileritritol fosfato y los fenilpropanoides, a partir del ácido shikímico, a continuación se presentan una reseña de éstos.

2.1.3.1 Terpenos

Los terpenos están formados por dos o más unidades isoprenoides. Pueden ser moléculas lineales o cíclicas, y algunos de ellos contienen estructuras de ambos tipos. Son sustancias sintetizadas por las plantas a partir de metabolitos primarios a través de dos rutas: la ruta del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico (MVA), que reacciona hasta formar isopentenil pirofosfato

(IPP); o bien la ruta del meileritritiol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y también genera IPP.

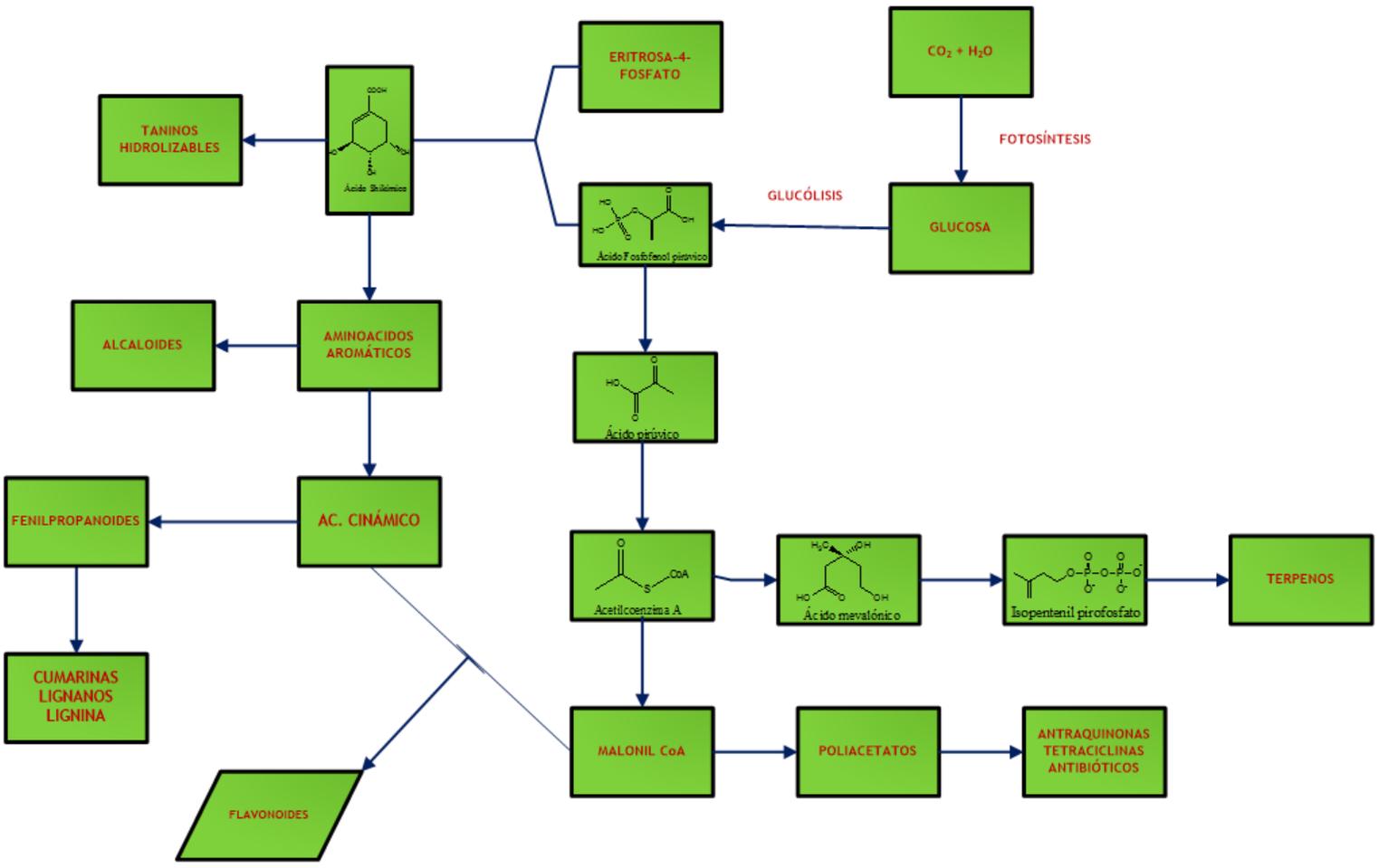


Figura 1. Cuadro general del metabolismo secundario.

El IPP y su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) son los precursores biosintéticos de los terpenos, dando lugar mediante reacciones de condensación a: (E)-geranil pirofosfato, precursor de monoterpenos, farnesil pirofosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos, y geranilgeranil pirofosfato (GGPP), que es precursor de diterpenos. La hidrólisis de todos éstos ésteres, junto con sucesivas isomerizaciones y reacciones intramoleculares, originan toda la gama de estructuras terpénicas.

Dentro del grupo de los compuestos que contienen terpenos destacan: fitohormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos) y AE, proporcionando el aroma y el sabor característico de las plantas. Otros compuestos como las citoquininas y las clorofilas no son terpenos, pero contienen en su estructura una cadena lateral que es un terpeno.

A la vista de esta variedad de compuestos, es evidente que muchos terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial. Los AE están formados en su mayoría por monoterpenos (C₁₀), constituyendo hasta un 90% de los AE. Los monoterpenos (C₁₀) son frecuentes en familias de angiospermas como Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Myristaceae, Myrtaceae, Poaceae y Rubiaceae. En la Tabla 1 se encuentran las moléculas más representativas de este grupo.

Tabla 1. Monoterpenos más frecuentes de los AE.

Hidrocarburos	Acíclicos: mirceno, ocimeno. Monocíclicos: terpinenos, ρ -cimeno, felandreno. Bicíclicos: pinenos, 3-careno, canfeno, sabineno.
Alcoholes	Acíclicos: geraniol, linalool, citronelol, lavandulol, nerol. Monocíclicos: α -terpineol, carveol. Bicíclicos: borneol, fenchol, crisantenol.
Cetonas	Acíclicos: tegetona. Monocíclicos: Mentonas, carvona, pulegona, piperitona. Bicíclico: alcanfor, fenchona, tujona, ombelulona, pinocamfona, pinocarvona
Ésteres	Acíclicos: acetato de linalilo, acetato de citronelilo. Monocíclicos: Acetato de mentilo y α -terpinilo.
Éteres	Acíclicos: 1,8- cineol, mentofurano.
Fenoles	Timol, carvacrol.

Fuente: (Bruneton, 2001)

Los sesquiterpenos (C₁₅) están formados por la unión de tres unidades de isopreno. La extensión de la cadena aumenta el número de ciclaciones permitiendo una gran variedad de estructuras. Su estructura y función es muy similar a la de los monoterpenos. Por regla general, la mayoría de ellos presenta una unión regular “cabeza-cola”. Al contar con una unidad de isopreno más que los monoterpenos, presentan una mayor plasticidad en su construcción que se traduce en una mayor variabilidad estructural y funcional. Los compuestos más importantes se detallan en la Tabla 2.

Entre las plantas que contienen estos compuestos se encuentran: bergamota, alcaravea, apio, eucalipto, lavanda, menta, naranja, mandarina, pimienta, pino, romero, lavanda, limón y tomillo.

Tabla 2. Sesquiterpenos más frecuentes de los AE.

Hidrocarburos	α -azuleno, β -bisaboleno, β -cariofileno, longifoleno, curcumenos, β -farneseno, zingibireno.
Cetonas	β -cuparenona, aristolona.

Fuente: (Bruneton, 2001)

Los diterpenos (C₂₀) son compuestos con 4 unidades de isopreno. Presentan mayor peso molecular y menor volatilidad que monoterpenos y sesquiterpenos, generalmente, son los compuestos residuales después de una destilación por arrastre de vapor.

2.1.3.1.1 Otros componentes aromáticos

Los fenilpropanoides son compuestos derivados de la ruta del ácido shikímico, vía ácido cinámico y se encuentran en menor proporción que los monoterpenos. Entre ellos destacan los compuestos contenidos en la Tabla 3.

Tabla 3. Otros componentes aromáticos presentes en los AE.

Aldehídos	Cinamaldehido.
Alcoholes	Alcohol cinámico.
Fenoles	Chavicol, eugenol.
Metoxiderivados	Anetol, elemicina, estragol, metileugenol.

Fuente: (Bruneton, 2001)

Entre las principales fuentes naturales de estos compuestos se encuentran las siguientes plantas: anís, canela, clavo, apio, nuez moscada, perejil, anís estrella, estragón y algunas familias botánicas como: *Apiaceae*, *Laminaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*. También pertenecen a este grupo componentes nitrogenados o sulfurados como glucosinolatos o derivados de isotiocianatos que son característicos del metabolismo secundario de distintas especies de la familia *Brassicaceae* o crucíferas a ésta pertenecen el brócoli, coles de Bruselas, coliflor, col morada, col rizada, colinabo, hojas de mostaza, nabo, berro y aceites de mostaza (Hernández, 2011).

2.1.4 Factores que influyen en la composición química de los AE

Respecto a la formación y evolución de los aceites esenciales en las plantas es necesario tener en cuenta algunos factores que pueden afectar la composición química de las esencias de manera cualitativa y cuantitativa, entre ellos, se pueden destacar los siguientes (Bruneton, 2001):

- El origen botánico (la especie y la raza química de las que proceden).
- Condiciones geobotánicas: clima, altitud, tipo de suelo, pluviosidad.
- El ciclo del vegetal y estado de desarrollo fenológico de la planta (la composición y proporción varía según la fase del ciclo vegetativo).
- Labores de cultivo: uso de fertilizantes, abonos y pesticidas.
- Época de recolección.

- f) Modo de almacenamiento y manejo del material vegetal: fresco, seco, fermentado, tratamiento poscosecha.
- g) Método de obtención del aceite: destilación, expresión o enfleurage.

2.1.5 Fuentes y ubicación de los AE en la planta

Los aceites esenciales se acumulan en estructuras secretoras especializadas ubicadas en diferentes partes de la anatomía de las plantas, ejemplo: hojas, flores, tallos, raíces, corteza, frutos y semillas (Bruneton, 2001).

2.1.6 Control de calidad de los aceites esenciales

Dentro de todos los niveles de la cadena productiva de aceites esenciales, el primer control que se realiza, es el de los parámetros organolépticos. Esta prueba se realiza para saber si el aceite esencial presenta adulteración, como la dilución.

En la tabla 4, se observan los principales criterios utilizados en el control de calidad de los aceites esenciales.

Tabla 4. Criterios utilizados para el control de calidad de los aceites esenciales.

Características organolépticas	<ul style="list-style-type: none"> • Olor • Color
Determinaciones físicas	<ul style="list-style-type: none"> • Densidad • Miscibilidad en etanol • Índice de refracción • Poder rotatorio
Índices químicos	<ul style="list-style-type: none"> • Índice de acidez • Índice de fenoles • Índice de éster • Determinación de aldehídos y cetonas
Características cromatográficas	<ul style="list-style-type: none"> • Cuantificación de los componentes principales • Análisis por cromatografía de gases (GC-MS,GC)
Características espectroscópicas	<ul style="list-style-type: none"> • Ultravioleta • Infrarrojo • RMN

Fuente: (Bruneton, 2001)

2.1.7 Usos de los aceites esenciales

El tipo de aceites esenciales y su calidad, determinan en qué producto final será incorporado. Los aceites esenciales son ampliamente utilizados como materia prima en diferentes tipos de industria, por ejemplo: cosmética, alimenticia, bebidas, textil, etc., mientras que otras industrias pueden usar productos aislados de esencias, como es el caso de la industria farmacéutica.

La tabla 5 proporciona una visión general del uso de aceites esenciales en las diferentes ramas de consumo.

Tabla 5. Aplicaciones de los aceites esenciales a nivel industrial.

Industrias	Aplicaciones
Alimenticia	Salsas Condimentos Bebidas refrescantes Alimentos procesados y enlatados
Licorera	Aperitivos Saborizantes
Cosmética	Perfumes Dentífricos Cremas, lociones
Farmacéutica	Veterinaria Antisépticos Analgésicos Aromaterapia Homeopatía
Uso domestico	Desodorantes Desinfectantes de ambiente Jabones
Agroquímica	Insecticidas Aleloquímicos
Textil	Elaboración de enmascaradores de olores Tratamiento con mordientes después de teñir
Petroquímica y minería	Utiliza esencias o terpenos derivados de ellas como vehículos flotantes y lubricantes
Pinturas	Enmascaradores de olores Disolvente biodegradable
Química fina	Precursores químicos, ejemplos: citral, safrol, trementina

Fuente: (Díaz, 2007)

2.1.8 Métodos de extracción de los aceites esenciales

Los AE constituyen la fracción volátil de los principios activos contenidos en una planta, y se obtienen mediante diferentes técnicas de extracción: prensado, destilación por arrastre de vapor, extracción con disolventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos (Rodríguez, Alcaráz, & Real, 2012).

Dentro de las prácticas existen tres métodos que son los más utilizados tanto a nivel industrial, como en el laboratorio y dependen del grado de contacto entre el material vegetal y el agua, estos son: la hidrodestilación, destilación con agua/vapor y destilación por arrastre con vapor (Díaz, 2007).

2.1.8.1 Hidrodestilación (HD)

El material vegetal se sumerge en el agua. La HD consiste en llevar a estado de ebullición el agua, que penetra los tejidos de la planta y libera una parte del aceite esencial presente en las estructuras contenedoras; esta disolución acuosa, se difunde a través de las membranas de las células y el aceite se vaporiza inmediatamente desde la superficie. Este proceso continúa hasta que se remueve todo el aceite contenido en las glándulas de la planta, de tal manera, que los vapores generados puedan ser condensados y colectados (Rodríguez, Alcaráz, & Real, 2012).

2.1.8.2 Destilación con agua/vapor

Es un método mejorado, donde la carga (el material vegetal) se coloca sobre una malla que sirve como un fondo falso y no permite el contacto directo con el agua. Una vez iniciado el proceso, el agua dentro del alambique se lleva hasta ebullición y el vapor generado *in situ* pasa a través del material vegetal. Consecuentemente, se evita que el material vegetal se quemé ya que la cámara de agua lo protege del calentamiento directo. Es importante que el vapor de agua generado pase a través de la carga uniformemente para garantizar la extracción total de la esencia.

2.1.8.3 Destilación por arrastre con vapor

Es el método más usado a nivel industrial, permite obtener aceites esenciales con buenos rendimientos y además, se pueden procesar grandes cantidades de material vegetal. Este método es una destilación que se define como la separación de componentes de una mezcla de 2 o más líquidos por medio de la diferencia de su presión de vapor (Vargas & Bottia, 2008).

2.1.9 Otros métodos de extracción de AE

2.1.9.1 Prensado

El material vegetal es exprimido mecánicamente para liberar el aceite y éste es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para la extracción de esencias cítricas.

2.1.9.2 Extracción con disolventes volátiles

La muestra seca y molida se pone en contacto con disolventes como alcohol o cloroformo. Estos compuestos solubilizan el aceite esencial, pero también extraen otras sustancias como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio, pues a nivel industrial resulta costoso por el alto valor comercial de los disolventes y porque se obtienen esencias mezcladas con otras sustancias.

2.1.9.3 Enflorado o enfleurage

El material vegetal (generalmente flores) se pone en contacto con una grasa. La esencia es solubilizada en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla (el concreto) de aceite esencial y grasa la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. En general, se recurre al agregado de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa (insoluble) y el extracto aromático (absoluto). Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa.

2.1.9.4 Con fluidos supercríticos

Esta técnica es de desarrollo reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico (por ejemplo CO₂). Las esencias son así solubilizadas y arrastradas mientras que el fluido supercrítico, que actúa como disolvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente. Finalmente, se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. Este procedimiento presenta varias ventajas: alto rendimiento, fácil eliminación del disolvente (que además se puede reciclar), no se alteran las propiedades químicas de la esencia por las bajas temperaturas utilizadas para su extracción. Sin embargo el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones (Rodríguez, Alcaráz, & Real, 2012).

2.1.10 Toxicidad de los aceites esenciales

Si bien su aplicación alimentaria y terapéutica es cada vez más amplia, no hay que omitir que existen aceites esenciales cuyo uso inadecuado puede resultar tóxico para el organismo. Al igual que sucede con la actividad antimicrobiana, la toxicidad de los aceites esenciales puede variar en función de su quimiotipo. Ingeridos por vía oral en dosis muy altas los aceites esenciales de eucalipto, clavo, canela y nuez moscada pueden ocasionar cuadros de depresión generalizada en el SNC. Se han descrito así mismo, efectos narcóticos y estupefacientes para el comino, cilantro, eucalipto, nuez moscada y tomillo.

2.2 Ensayos de actividad biológica

Los bioensayos son por definición, pruebas en las que se usan organismos vivos para detectar o medir la presencia y efectos de una o más sustancias tóxicas, así como, determinar el límite de tolerancia de dichas sustancias con respecto a los organismos.

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas (Ortuño, Sosa, & Giles, 2009).

2.2.1 Clasificación de los diferentes bioensayos que existen:

Tipos de bioensayos por el tiempo de duración

- ✓ Bioensayos de corta duración
- ✓ Bioensayos de duración intermedia
- ✓ Bioensayos de larga duración

Tipos de bioensayos por sus efectos

- ✓ Bioensayos de toxicidad aguda
- ✓ Bioensayos de toxicidad crónica

Tipos de bioensayos por la aplicación de sus tratamientos

- ✓ Bioensayos estáticos
- ✓ Bioensayos con renovación periódica

2.2.2 Requisitos para seleccionar la especie útil para desarrollar un bioensayo

Para la realización de los bioensayos es importante determinar la especie o grupo de especies útiles para desarrollar estas pruebas; para cumplir con este requisito se indaga sobre algunos aspectos de la biología básica de los organismos (nutrición, ciclo de vida, condiciones óptimas de cultivo y manejo). Puesto que, es esencial reunir información acerca de los diferentes aspectos de la fisiología de las especies potencialmente aptas para tal fin, los bioensayos deben ser simples, rápidos, reproducibles y económicos (Castro Piedrahita & Alzate Zuluaga, 2008).

Los tipos de especies para realizar un bioensayo, pueden ser clasificados en 5 grandes grupos:

1. Organismos bajos en la escala evolutiva.
2. Sistemas subcelulares aislados: enzimas, receptores, organelos.
3. Cultivo de células de origen animal o humano.
4. Órganos aislados de vertebrados.
5. Animales enteros.

2.2.3 Bioensayos de toxicidad aguda en *Artemia franciscana*

La realización del bioensayo de toxicidad aguda, tiene por objeto clasificar las sustancias de acuerdo con su grado de toxicidad. En este sentido, pese al avance en los conocimientos toxicológicos y la mayor frecuencia de intoxicaciones crónicas, es considerada la CL₅₀, como un indicativo clave en ciertas legislaciones, para determinar la capacidad tóxica de muchas sustancias razón por la cual, es necesario garantizar la reproducibilidad y confiabilidad de dichos estudios, por lo tanto, la elección del organismo indicador es de mucha importancia, razón por la cual, para este ensayo fue empleada la especie *Artemia franciscana*, que gracias a sus condiciones fisiológicas y de desarrollo, favorece su uso en estudios de toxicidad aguda.

Aunque inicialmente la *Artemia franciscana* era utilizada en ensayos de toxicidad que involucraban compuestos bioactivos de extractos de plantas, hoy en día podemos ver

extendido su uso a otros ensayos que buscan detectar la toxicidad de: nuevos productos naturales, metabolitos tóxicos producidos por hongos, complejos metálicos, pesticidas, hidrocarburos e incluso, sobre algunos materiales de restauración dental (Pacheco, 2011).

2.3 *Artemia franciscana*

La *Artemia* pertenece a un grupo de crustáceos que ha habitado la Tierra por 300 millones de años y ha sido un importante eslabón en la cadena alimenticia desde entonces. El “camarón de salmuera” tal cual como lo indica su nombre, no es un habitante directo del mar sino de salinas. Este pequeño camarón es utilizado comercialmente como alimento en la cría de peces y crustáceos, también ha sido usado durante años como modelo para realizar investigaciones en disciplinas básicas y/o aplicadas, en el análisis de residuos de pesticidas y micotoxinas, entre otras, (Castro & Alzate, 2008).

2.3.1 Taxonomía

Las principales categorías taxonómicas del crustáceo *Artemia* se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Principales categorías taxonómicas de *Artemia*.

Categoría Taxonómica	Nombre
Phylum	Arthropoda
Clase	Crustacea
Subclase	Branchiopoda
Super Orden	Anostraca
Familia	Artemiidae
Género	<i>Artemia</i>

Fuente: (Vinatea, 1997)

Las especies que existen en la actualidad son:

- Artemia franciscana* Kellogg, 1906 (América)
- A. Tunisiana* Bowen-Sterling, 1978 (Europa, África)
- A. urmania* Gunther, 1900 (Irán)
- A. monica* Verril, 1869 (Mono Lake, USA)
- A. persimillis* Piccinelli-Prosdocimi, 1968 (Argentina)
- A. parthenogenetica* Bowen-Sterling, 1978 (Eurasia, Africa y Oceanía)
- A. sinensis* (China)

Es preciso destacar, que existen dudas en cuanto a la clasificación sistemática de esta última especie. Muchos autores prefieren no considerarla como tal, ya que otras especies de *Artemia* (sobre todo las poliploides) presentan reproducción partenogenética. Por otro lado, se recomienda que el binomio *Artemia salina*, (Linnaeus, 1758) no sea más usado, pues esta especie parece que se extinguió, en Inglaterra en el siglo pasado, (Vinatea, 1997).

2.3.2 Distribución geográfica

Hasta el momento se han identificado más de 350 biotipos naturales de *Artemia*, los cuales se encuentran dispersos en los cinco continentes. El viento y las aves acuáticas son considerados los vectores más importantes de dispersión. Sin embargo, hasta hace poco tiempo, el hombre ha sido responsable de inoculaciones en diversos lugares, con la finalidad de mejorar la calidad y la cantidad de la producción de sal, así como para fines de acuicultura.

La distribución de *Artemia* se limita a biotipos donde la salinidad es lo suficientemente alta (generalmente superior a 100‰ = 100 g.L⁻¹) para mantener el medio exento de predadores, principalmente peces eurihalinos. La biogeografía de *Artemia* está íntimamente relacionada con los diferentes tipos de clima.

2.3.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Artemia* es relativamente corto. Sus individuos pueden vivir durante 2-4 meses, según la especie y pueden alcanzar la madurez sexual en apenas dos semanas cuando la temperatura ambiental supera los 25 °C; o de 1-2 meses, cuando las temperaturas son bajas. Inician su ciclo vital a partir del estadio de nauplio o primera fase larvaria, que puede obtenerse de un quiste, cuando el modo reproductivo de la hembra es ovíparo, o directamente de la hembra, cuando el modo reproductivo es ovovivíparo (Figura 3).

A lo largo del ciclo de vida de la *Artemia* se pueden distinguir claramente cuatro etapas morfológicas de desarrollo:

- Nauplio
- Metanauplio
- Pre-adulto
- Adulto

La fase de nauplio corresponde a la larva recién nacida; esta larva se caracteriza por presentar gran cantidad de reservas (lípidos, carbohidratos y pigmentos) en el cuerpo. Existen dos sub-etapas en esta fase: nauplio 1 y nauplio 2. El nauplio 1 es la larva recién nacida que ya presenta actividad natatoria. Tiene una coloración naranja característica del vitelo. La boca y el ano no son funcionales todavía, por lo que no existe ingesta de alimentación exógena. En la base interna de la mandíbula (que en este estadio tiene función natatoria) se encuentra una estructura llamada seda gnatobasal (gnathobasensetae), que se presenta pequeña y sin ramificaciones. Este sub-etapa dura aproximadamente 8 horas. El nauplio 2 se caracteriza por el inicio de la actividad alimenticia exógena debido a que el tracto digestivo ya es funcional. La seda gnatobasal se torna un poco más larga y se rodea de pequeñas sedas periféricas. Esta fase dura de 15 a 20 horas (Castro & Gallardo, 1993).

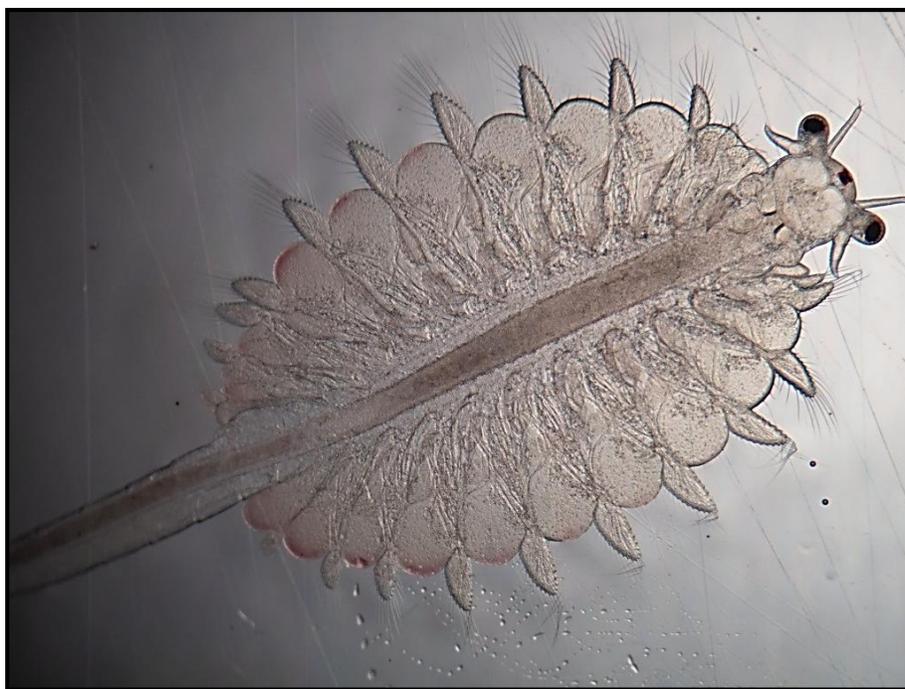
Las etapas metanaupliares forman el periodo más largo de desarrollo larvario de este crustáceo. En este periodo se realiza la segmentación corporal, el desarrollo de los 11 pares de toracópodos, y la diferenciación de las estructuras orgánicas en general.

En la fase pre-adulto, se comienza a manifestar un dimorfismo sexual, específicamente por la forma y función que adoptan las antenas. Poco después de que se completa el desarrollo de los once pares de toracópodos, la *Artemia* modifica la forma de sus antenas. En los machos éstas se hipertrofian en forma de tenazas, que servirán para asirse a la hembra durante la realización del acto pre-copulativo. En las hembras las antenas conservan forma y tamaño reducido con función sensorial. En esta fase, el desarrollo de antenas es el único carácter macroscópico que evidencia la aparición del dimorfismo sexual.

En la etapa adulta se manifiesta un evidente dimorfismo sexual, debido a que alcanzan la madurez sexual, hecho que puede ser advertido por la adopción del comportamiento pre-copulativo, cuando el macho agarra fuertemente al ovisaco de la hembra y ambos individuos nadan siempre juntos. Una hembra adulta es capaz de producir más de 200 óvulos cada cinco días durante un mes. La desova de nauplios o quistes dependerá del modo reproductivo adoptado por la hembra, de acuerdo con las condiciones favorables o desfavorables del medio (Vinatea, 1997).

2.3.4 Morfología

Los adultos de *Artemia* poseen un cuerpo alargado, claramente segmentado, plano y de formato oval. Los individuos desarrollados llegan a medir un promedio de 10 mm y pesar 1 mg (peso vivo) aproximadamente. Presentan dimorfismo sexual marcado (cepas bisexuales): las hembras siempre son de mayor tamaño que los machos (fotografía 1). Su cuerpo está dividido en tres partes bien caracterizadas: cabeza, tórax y abdomen.

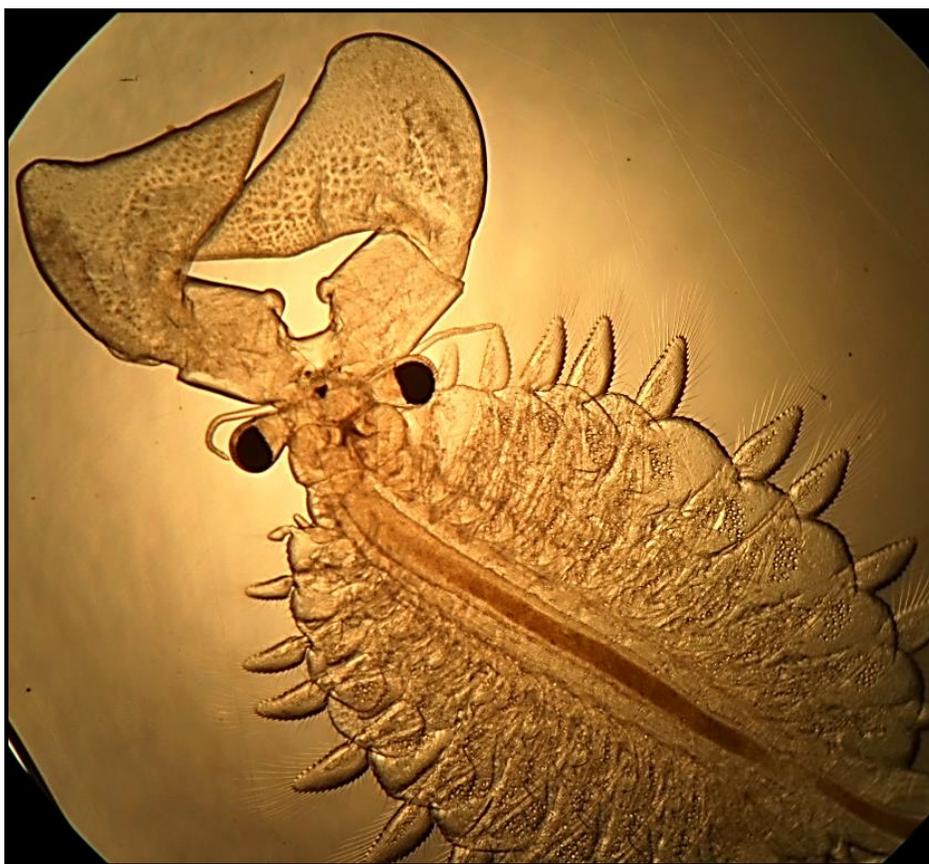


Fotografía 1. Artemia hembra.

Fotografía tomada en el laboratorio Farmacognosia y Fitoquímica de la FES-Cuautitlán L-324 Campo 1; por Alejandra Sánchez (2013).

Fotografía ganadora del primer concurso de fotografía científica en la FESC.

La cabeza está formada por cinco segmentos fusionados. En los dos anteriores se encuentran los ojos compuestos pedunculados laterales, el ocelo medio, las anténulas y las antenas. Las anténulas son filiformes y se localizan en la región dorsal. Las antenas de los machos son grandes y presentan una compleja estructura muscular y nerviosa (fotografía 2). Los tres segmentos fusionados restantes, contienen: la boca, las mandíbulas, dos pares de maxilas y un labrum o labio superior de la boca.



Fotografía 2. Artemia macho.

Fotografía tomada en el laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica de la FES Cuautitlán L-324 Campo 1; por Alejandra Sánchez (2013).

La región torácica (tronco) está formada por 11 segmentos, cada uno con un par de apéndices foliáceos (filópodos o toracópodos) idénticos pero de diferente tamaño en función de su inserción al tórax. Cada una de las extremidades posee varios procesos: a lo largo del margen extremo superior de cada apéndice hay tres exopoditos provistos de un integumento muy delgado, sacciformes y están provistos de una abundante irrigación vascular, dado que cumplen el papel de branquias. El margen interno de los toracópodos, está compuesto de cinco endopoditos, con gran superficie, para cumplir con la función natatoria. El lóbulo más interno del toracópodo corresponde al telopodito, que se encuentra revestido por largas sedas, a fin de poder filtrar las partículas alimenticias. En la región del tórax se encuentra el surco torácico, que tiene como finalidad canalizar hacia la boca la corriente de agua cargada de partículas alimenticias. Creada por el movimiento sincronizado de los toracópodos.

El abdomen no presenta extremidades y consiste en ocho segmentos. Los dos primeros se fusionan para formar el segmento genital o somita sexual donde irán a implantarse el ovisaco de las hembras y los hemipenes de los machos. El abdomen presenta un telson que termina en una furca caudal con sedas esparcidas. En la mitad de las dos ramas o cercopoditos de la furca, se abre el ano.

2.3.5 Alimentación

Artemia es un crustáceo filtrador pasivo que basa su alimentación en la captura de bacterias, algas unicelulares, pequeños protozoos y detritos del medio en que vive, lo que lleva a cabo mediante el batido rítmico de sus apéndices, ya que los telopoditos de los toracópodos actúan como aparato filtrador. Estos movimientos crean dos corrientes en direcciones opuestas: anal y oral; la segunda de las cuales conduce al alimento hasta la boca del animal. Este mecanismo es evidente en las formas adultas de *Artemia*. Las formas naupliares se nutren de las reservas vitelinas acumuladas en el llamado “órgano nuczal”, hasta el estadio II, a partir de entonces el alimento es capturado por filtración mediante las segundas antenas. A medida que los telopoditos de los filópodos se van desarrollando paulatinamente, se incorporan a estas funciones (Ruiz Pérez, 2008).

2.3.6 Reproducción

El género *Artemia* presenta dos tipos de reproducción: sexual y partenogenica, que son totalmente excluyentes. La madurez gonadal coincide generalmente con la aparición del comportamiento precopulativo. La fecundación de los huevos se realiza cuando el macho *Artemia*, en pocos segundos, curva su abdomen en dirección ventral a fin de introducir uno de sus hemipenes en la abertura uterina de la hembra. Los espermatozoides ingresantes fecundan los óvulos maduros que se encuentran alojados en el interior del ovisaco. En las especies con reproducción partenogenética, la fertilización no se lleva a cabo debido a la ausencia de especímenes machos. Se trata de una reproducción amíctica. Tanto en la reproducción partenogenica, como en la sexual, pueden existir dos modos reproductivos diferentes: el ovíparo y el ovovivíparo (figura 2).

El modo reproductivo ovíparo se caracteriza por la formación de quistes, mal llamados “huevos”, ya que en realidad se trata de embriones en desarrollo suspendido, en estado latente (diapausa). La oviparidad se manifiesta cuando las condiciones ambientales no son favorables para los animales, lo cual suele darse, cuando las concentraciones de oxígeno disuelto son muy bajas, situación característica de los ambientes de elevada salinidad o con gran cantidad de materia orgánica en suspensión. Al darse esta situación, el embrión se desarrolla solamente hasta la fase de gástrula, momento en el que se rodea de una delgada cáscara de naturaleza lipoproteica (hematina) denominada corion, producida por las secreciones de la glándula de la cáscara que se encuentra en la base del ovisaco de las hembras.

La oviparidad está relacionada con la síntesis de hemoglobina, cuya concentración aumenta frente a situaciones de baja concentración de oxígeno disuelto. Por otro lado, si el animal consume un alimento rico en hierro (microalgas por ejemplo) la hematina, un compuesto

derivado de la hemoglobina, será rápidamente producida por la referida glándula. La hematina es responsable del característico color marrón oscuro de los quistes y, entre otros objetivos, este compuesto tiene la finalidad de proteger al embrión enquistado de las radiaciones ultravioleta.

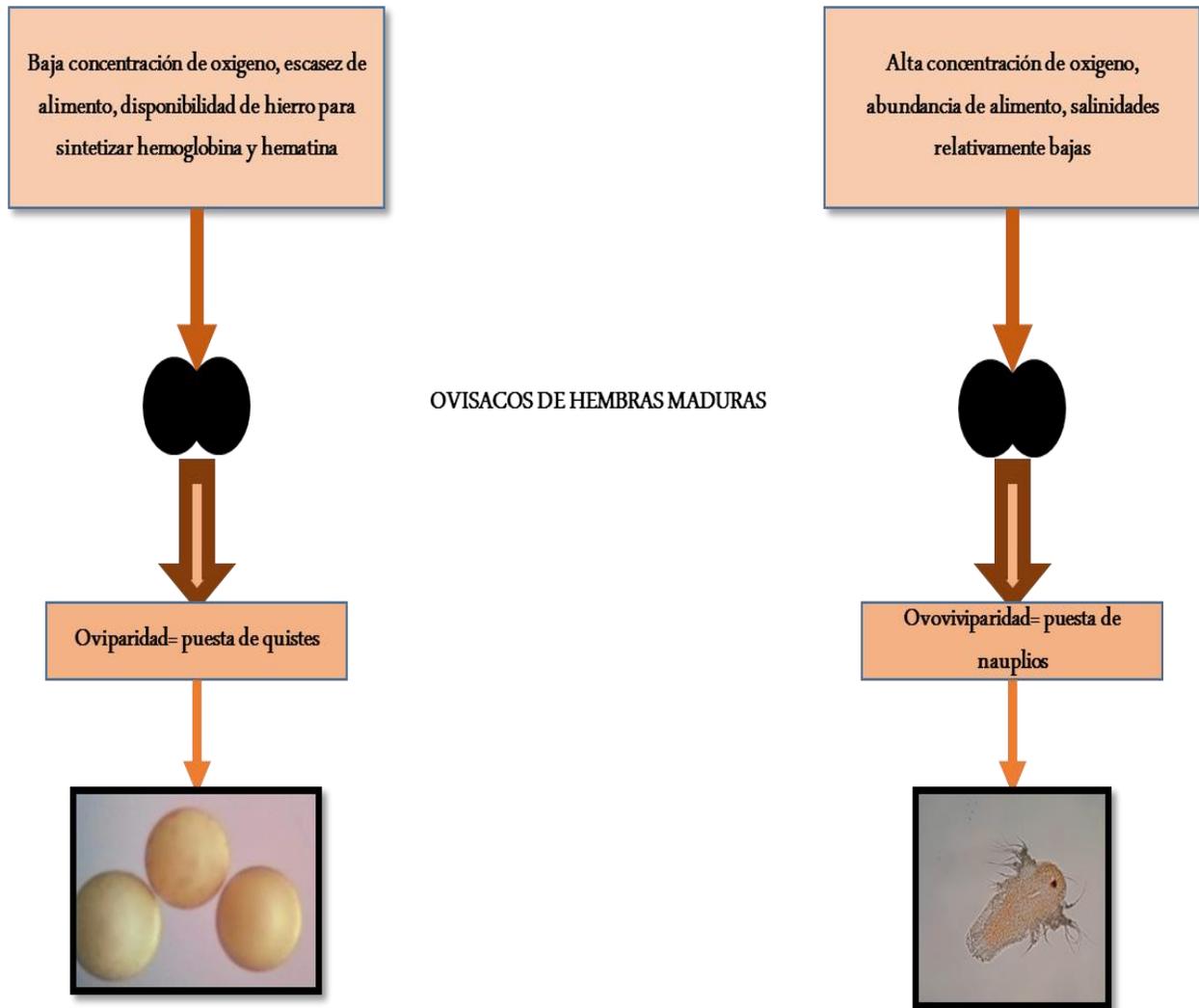


Figura 2. Modos reproductivos de *Artemia*.

Fuente: (Vinatea, 1997)

Fotografías tomadas en el laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica de la FES Cuautitlán L-324 Campo 1; por Alejandra Sánchez (2013).

El modo reproductivo ovovivíparo consiste en la producción directa de nauplios sin la necesidad de pasar antes por el proceso de enquistamiento. Este modo reproductivo se da generalmente cuando la hembra no está expuesta a condiciones estresantes, es decir, cuando el ambiente goza de un alto tenor de oxígeno disuelto y abundante alimento, lo que se da en salinidades inferiores a 100% (figura 2). En estas circunstancias, *Artemia* no necesita grandes cantidades de hemoglobina para captar oxígeno del medio, por lo tanto, la glándula de la

cáscara se encontrará inactiva (fase blanca), con lo que no se facilita la producción de sustancias necesarias para la información del corion (Vinatea, 1997).

2.3.7 Parámetros para la eclosión y el mantenimiento de *Artemia franciscana* en el laboratorio

Debido a la gran demanda de *Artemia franciscana* que existe en el mercado de la acuicultura, es relativamente fácil la consecución de los quistes por medios comerciales. De igual forma existen algunos laboratorios con cultivos de los mismos e incluso pueden obtenerse directamente del medio natural, siempre y cuando provengan de aguas con buena calidad y retiradas de la orilla.

La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) en su “Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura”, propone ciertos parámetros críticos para una eclosión óptima y mantenimiento de la especie, los cuales han sido basados en la experiencia recogida a través de una extensa revisión bibliográfica (Pacheco, 2011).

A simple vista parece fácil eclosionar quistes de *Artemia*, pero resulta importante considerar los factores que intervienen:

pH

El pH es un factor fisicoquímico importante tanto para la eficiencia de eclosión como para la sobrevivencia de los nauplios; ya que cuando éstos salen de la cáscara, entran en contacto con el medio a través de su membrana de eclosión y empieza la osmorregulación iónica.

Así, para tener un óptimo desarrollo de los nauplios libre nadadores, se requiere que el pH sea similar al medio marino, o sea que debe tener valores entre 8 y 9.

Oxígeno

El metabolismo de los carbohidratos es un fenómeno aeróbico, por lo tanto la presencia de oxígeno es importante. La *Artemia* tiene un rango amplio de concentraciones de oxígeno, que va desde la saturación, hasta 2 ppm, que es la mínima concentración en que puede vivir.

Para obtener una máxima eclosión, se considera necesario mantener un nivel de oxígeno, por arriba de 2mg/L. Bajo condiciones de hidratación y buena oxigenación, se desencadena el metabolismo de los quistes, pero cuando se deja de oxigenar, éste se suspende y el proceso es reversible, de manera que sí se vuelve a oxigenar continúa el metabolismo y así sucesivamente. Experimentalmente se ha demostrado que se requieren 18 horas acumuladas de oxigenación para que ocurra la eclosión.

Iluminación

La luz es un factor indispensable para que se realice la eclosión, se ha observado que los quistes, una vez hidratados, requieren cuando menos 1 hora de luz, que sirve como fuente de energía para llegar a la eclosión. Los requerimientos de luz varían de una cepa a otra, y esto se explica por la diferencia en el grosor del corion, dado por la cantidad de hematina que

contiene; lo cual, a su vez, determina la mayor o menor transparencia de dicha cubierta. Una iluminación continua de alrededor de 2000 lux, sobre la superficie del agua del estanque, promete resultados óptimos en la eclosión.

Densidad

Se recomienda una densidad de 5 gramos de quistes por litro, cuanto mayor sea la densidad de quistes, colocados en un recipiente para la eclosión, se requerirá una mayor cantidad de oxígeno, de manera que sí se agregan de 10-20g/L, para suministrar la cantidad necesaria de oxígeno, se requerirá aplicar una aireación tan fuerte, que los quistes se dañarían físicamente.

Humedad

De acuerdo con Castro Barrera y Gallardo Romero (1993), el porcentaje de humedad que deben de tener los quistes para que sean viables debe ser menor al 10% (Castro & Gallardo, 1993), (Vinatea, 1997).

2.3.8 La importancia del bioensayo de *Artemia* en las investigaciones.

Actualmente, el bioensayo de *Artemia* se utiliza para una variedad de objetivos tales como:

Investigación de la fuente de toxicidad en mezclas de sustancias químicas y muestras ambientales, tamizaje de toxicidad aguda de sustancias químicas, detección de toxinas naturales en comestibles y farmacéuticos, estudios de modelos de acción tóxica de sustancias, y estudios de la transferencia trófica de contaminantes.

2.4 Clavo



Figura 3. Flores de clavo.
Fuente: (CONABIO, 2014)

2.4.1 Sinonimia popular

Clavo de olor o clavo de especias

2.4.2 Sinónima botánica

Caryophyllus aromaticus L., *Jambosa caryophyllus*, *Eugenia caryophyllus*.

2.4.3 Taxonomía

Tabla 7. Clasificación taxonómica del clavo.

Categoría taxonómica	Nombre
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Myrtales
Familia	Myrtaceae
Genero	<i>Syzygium</i>
Especie	<i>Syzygium aromaticum</i>

Fuente: (Hernández, 2011)

2.4.4 Descripción botánica

Flores y frutos: poseen pedículos pequeños, el tubo del cáliz consiste en una estructura cilíndrica de 1 a 1.5 cm de largo, hay 4 pétalos. El fruto mide de 2 a 2.5 cm de largo y posee una semilla; son globosos, de color rosa o amarillentos y tienen un aroma agradable (UNAM, 2013).

Hojas, tallo y raíz: es un árbol perenne que alcanza los 20 m de altura con forma piramidal, el diámetro del tronco es de 40 cm, se encuentran las ramas alrededor. Las hojas miden de 9 a 12 cm de largo y 3.5 cm de ancho, son verde-oscuro en el anverso y verde-amarillento en el reverso, lustrosas y muy puntiagudas, poseen formas desde elípticas hasta lanceoladas.

2.4.5 Distribución

Syzygium aromaticum, Zanzibar (parte de Tanzania) es desde hace tiempo el principal productor de clavo, aunque el árbol también se cultiva en Jamaica, Sri Lanka, Malasia e Indonesia (Islas Molucas). (Reader's, 1987)

2.4.6 Hábitat

El clavo de olor es nativo de las islas Molucas y de la región sur de las Filipinas, se cultiva en estos sitios y muchas zonas y tropicales como: islas del este de África (Zanzíbar y Pemba), Madagascar, Malasia, Tanzania, Sri Lanka y algunos países del sur de América (Brasil).

2.4.7 Usos

Alimentario: las flores cerradas y desecadas o clavos aromáticos se utilizan como condimento, enteros o molidos, para elaborar adobos y salsas. Como especia, se utiliza abundantemente para curris, en Indonesia se consume en forma de cigarrillos 'kretek'.

Medicinal: como fitomedicamento de uso tópico se indica para el tratamiento de pequeñas heridas, como analgésico (cefaleas, dolores dentales), para colutorios y enjuagues de higiene bucal; por vía oral en el tratamiento sintomático de trastornos digestivos diversos.

El eugenol es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria, durante mucho tiempo lo han empleado los cirujanos dentales en medicación intracanal, pero puede originar lesiones histológicas sobre tejidos vivos; tiene propiedades anestésicas locales al inhibir la conducción nerviosa, también es antiinflamatorio (inhibe la síntesis de prostaglandinas), a concentraciones bajas es bactericida. Forma parte de formulaciones de disoluciones para enjuagues bucales y pomadas.

2.4.8 Composición química del aceite esencial de clavo (AEC)

El AEC está formado por una gran variedad de compuestos. Su composición varía dependiendo de su procedencia. Entre sus componentes destaca eugenol (figura 4) (49-98%) como compuesto mayoritario, β -cariofileno (figura 5) (4-21%) y acetato de eugenilo (figura 6) (0,5-21%). Además también se pueden encontrar pequeñas cantidades de α -humuleno y trazas (< 1%) de otros 25 a 35 constituyentes (Hernández, 2011).

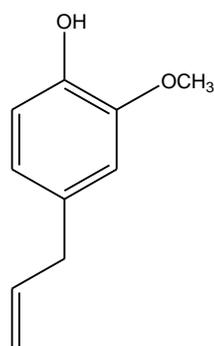


Figura 4. Eugenol.

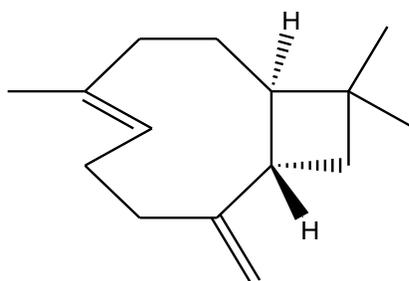


Figura 5. β -cariofileno.

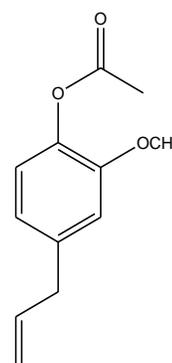


Figura 6. Acetato de Eugenilo.

2.4.9 Usos de AEC

El AEC es usado como antiséptico, antibacterial, fungicida, antiviral, espasmolítico y anestésico local. El aceite presenta una acción estimulante del apetito y la digestión; dichas propiedades se deben probablemente a la presencia del eugenol en su composición química.

2.5 Epazote



Fotografía 3. Planta de epazote.

Fotografía tomada por la profesora Brígida del Carmen Camacho Enríquez (2014).

2.5.1 Sinonimia popular

Epazotl (náhuatl): hierba olorosa; cuitlazotl (náhuatl); vara de estiércol. Ep'azot, epazote blanco, epazote de zorrillo, epazote morado, epazote verde, n'aí, podeey, shtakala-kajui, yepazotli; Chiapas: kak'an, kajk'an, kaka'an(tzeltal), koko 'on, kokono' (tzotzil); Estado de México: chimi (mazahua); Michoacán: kuatsitasi (purhépecha); Nayarit:cu cú (cora), pasich (tepehuano); Puebla: alskini (tepehua), xkejet (totonaco); San Luis Potosí: tijson(tenek) (UNAM, 2013).

2.5.2 Sinonimia botánica.

Chenopodium ambrosioides L; *Chenopodium antihelminthium* L.; *Atriplex ambrosioides* Crantz; *Chenopodium obovatum* Moq. ; *Botrys anthelmintica* Nieuwl (UNAM, 2013).

2.5.3 Taxonomía

Tabla 8. Clasificación Taxonómica del epazote.

Categoría taxonómica	Nombre
Reino	Plantae
Clase	Magnoliopsida
Familia	Chenopodiaceae
Genero	<i>Chenopodium</i>
Especie	<i>Chenipodium ambrosioides</i> L.

Fuente: (León V. , 2005)

2.5.4 Descripción botánica

Hierba que dura todo el año de hasta 1 m de altura. Los tallos son erguidos y pueden ser simples o ramificados. Sus hojas son aromáticas con bordes de curvas anchas e irregulares de color verde o púrpura y en forma de lanza. Tiene flores pequeñas, verdes, creciendo en racimos delgados, con semillas negras y pequeñas.

2.5.5 Distribución

Planta nativa de las zonas tropicales de América, se encuentra en abundancia en casi todo nuestro país, Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán (Villaseñor R. & Espinosa, 1998).

2.5.6 Hábitat

Es originario de América, y está adaptado a distintos hábitats de clima cálido, semicálido, semiseco y templado. Hierba silvestre o cultivada, crece en terrenos de cultivo abandonados a las orillas de los caminos; asociada a bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio y perennifolio; así como a bosques espinoso, mesófilo de montaña, de encino, de pino, mixto de encino-pino, bosque de junípero y pastizal de zona templada.

2.5.7 Usos

Las infusiones de hojas y flores son utilizadas, entre otros, como tónico estomacal carminativo, en humanos y animales no rumiantes se utiliza como antihelmíntico, por su acción paralizante y narcótica sobre ascárides, oxiuros y anquilostomas. Estas infusiones son diuréticas, hepatoprotectoras, antiespasmódicas, antirreumáticas y las hojas se emplean como ingrediente en sopas típicas y de aderezo en la preparación de quesadillas (León C. Z., 2009).

2.5.8 Características y composición química del aceite esencial de Epazote (AEE).

El AEE es un líquido incoloro o ligeramente amarillo, de consistencia no muy viscosa, con olor penetrante y pungente parecido al alcanfor, con un sabor ligeramente amargo que se extrae de la planta completa, especialmente de las semillas y frutos, por destilación a vapor (Gómez, 2008) (Lianet Monzote , Werner Stamberg , & Katrin Stanie, 2009).

Las partes aéreas de la planta contienen un aceite esencial rico en ascaridol (figura 7), peróxido monoterpénico que puede encontrarse en proporción del 45% y hasta del 75% en el aceite esencial. Otros terpenoides como el p-cimeno, limoneno, mirceno, β -pineno, alcanfor, α -terpineno, terpineol y safrol, así como alcanos y ácido butírico en pequeñas cantidades, también están presentes en el aceite. En las hojas se han detectado los flavonoides ambrósido y el ramnósido del kamferol, mientras que en el fruto, dos glicósidos de kamferol. La flor contiene, además del aceite esencial, componentes fenólicos como: los ácidos ferúlico y vanílico y en la semilla, saponinas y esteroides. En la raíz, las saponinas, quenopodiósidos A y B, y heterósidos triterpénicos (Kumar & Mishra, 2007), (Gómez, 2008).

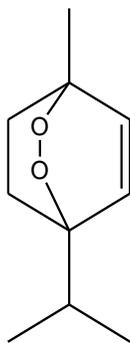


Figura 7. Ascaridol.

2.6 Laurel



Fotografía 4. Parte de un árbol de laurel.

Fuente: (León V. , 2005)

2.6.1 Sinonimia popular

Tzil tzil ujch', tziytzil ujch, uich té (Tzeltal), tzij uch (Tzotzil, Chiapas); li gua disí, ma qu loh (Chinanteco, Oaxaca), Laurel, laurelillo, laurel de castilla, laurel de olor, laurel de campo, laurel delgado (Español); ecapatli, cuauhxiuitl (Nahuatl); wixi tika'a, tu Káa, yucú ñesachoetiaá (Mixteco); Sanshiño (Mazahua), zit-zuch (Luna, 2003).

2.6.2 Sinonimia botánica

Tetranthera glaucescens var. *subsolitaria* Meisn, *Litsea glaucescens* var. *subsolitaria* (Meisn.) Hemsl., *L. guatemalensis* Mez., *L. flavescens* Bartlett, *L. schaffneri* Bartlett, *L. pallens* Lundell, *L. neesiana* (Schauer) Hemsl., *L. orizabae* (Mart. et Gal.) Mez (Luna, 2003).

2.6.3 Taxonomía

Tabla 9. Clasificación Taxonómica de Laurel.

Categoría Taxonómica	Nombre
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lurales
Familia	Lauraceae
Género	<i>Litsea</i>
Especie	<i>Litsea glaucescens</i>

Fuente: (Tapia, 2011)

2.6.4 Descripción botánica

Arbustos o árboles bajos, 1.5-5.4 m alto, ramas jóvenes teretes, verde amarillentas, corteza pardo oscura o amarillo verdosa. Hojas alternas, peciolo 0.6-1.1 cm de largo, glabros, canaliculados; láminas 5.0-9.0 cm largo, 2-3 cm de ancho, elípticas, base atenuada o aguda, ápice gradualmente acuminado, coriáceas, pinnatinervadas. Inflorescencia (masculinas y femeninas) axilares, umbeladas, solitarias o agrupadas, 3-5 flores por inflorescencia. Fruto en drupa de color negro y de 1 cm de diámetro, rodeado por una cúpula (Luna, 2003).

2.6.5 Distribución

Distribución en México: Aguascalientes, Chiapas, Durango, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Tamaulipas y Veracruz.

2.6.6 Hábitat

Planta originaria de México. Presente en la República Mexicana en zonas tropicales (climas cálidos, semiseco y seco) y templadas. Planta silvestre encontrada a orillas de ríos y riachuelos, asociada a bosque tropical perennifolio, bosques de encino, pino y mixto de pino-encino. Planta cultivada en huertos familiares (UNAM, 2013).

2.6.7 Usos

El principal uso medicinal que se le da al laurel es para aliviar afecciones respiratorias (amigdalitis, dolor de garganta, tos, etc.) y gastrointestinales (diarrea, cólicos, úlceras), también se utiliza para dolores por frío, escalofrío, hipo y para bañarse.

Se le atribuye propiedades aromática, astringente, balsámica, carminativa, emenagoga, emoliente, espasmolítica y pectoral (Cano, 2010), (UNAM, 2013).

Otros usos populares

Las hojas aromáticas son empleadas como condimento en la preparación de platillos como sopas, guisos y repostería (Cano, 2010).

2.6.8 Composición química del aceite esencial de Laurel (AEL)

El AEL contiene 1,8-cineol (figura 9) (22%), sabineno (figura 10) (13%), terpinen-4-ol (10%), γ -terpineno (9%), acetato de nerilo (7%), α -pineno (5%) y β -pineno (4%) (Cano, 2010).



Figura 8. 1,8-Cineol



Figura 9. Sabineno.

2.7 Orégano



Fotografía 5. Orégano mexicano. *Lippia graveolens*.
Fotografía tomada por Pablo Arturo Martínez Soriano (2013).

2.7.1 Sinonimia popular

Cacachica, canelilla, flor de orégano, hierba dulce, orégano del monte, orégano del país, oreganón, salvia, salvia de castilla. Quintana Roo: ak'ilche, xak' ilche, xaak' che (maya); Puebla: kaoreegano, kamaxha, nga ga'a ntaa (popoloca) (UNAM, 2013).

2.7.2 Sinonimia botánica.

Lippia palmeri Watson, *Lippia berlandieri* Schauer (UNAM, 2013).

2.7.3 Taxonomía

Tabla 10. Clasificación taxonómica del orégano.

Categoría taxonómica	Nombre
Reino	Plantae
División	Angiospermae
Clase	Dicotyledonae
Orden	Labiales
Familia	Verbenaceae
Genero	<i>Lippia</i>
Especie	<i>Lippia graveolens</i> Kunth.

Fuente: (Villavicencio, Cano, & García, 2010)

2.7.4 Descripción botánica

La planta forma un pequeño arbusto achaparrado que mide de 45 cm hasta 1.80 metros de alto. Los tallos a menudo adquieren una tonalidad rojiza, se ramifican en su parte superior, tienden a deshojarse en las partes inferiores y contienen sustancias tánicas glandulares (Willman D, Schmidt, & Rimpler, 2000). Sus hojas son opuestas ovales y anchas de entre 2 a 5 cm de largo, con bordes enteros o ligeramente dentados con el haz denso y suavemente piloso, el envés glandular y densamente tomentoso a piloso, el margen finamente crenado, el ápice generalmente obtuso o redondeado, raramente agudo, la base redondeada a subcordada; pecíolos de 5-10 mm de largo; el envés con pequeñas vellosidades (Quintero D & Gutiérrez G, 1991). Las flores son diminutas de color blanco, que nacen en apretadas inflorescencias terminales muy ramificadas, están protegidas por diminutas hojillas de color rojizo. Inflorescencias con 2-6 pedúnculos en las axilas de las hojas, de 4-12 mm de largo, las espigas primero subglobosas pero a menudo cambiando a oblongas de 4-12 mm de largo; brácteas comúnmente en 4 hileras, ovaladas a lanceoladas, glandulares y densamente pilósulas, agudas; cáliz 1-2 mm de largo, glandular y vellosa; corola blanca, con el tubo estriado, de alrededor de 3 mm de largo. Frutos pequeños encerrados en el cáliz (Villavicencio, Cano, & García, 2010).

2.7.5 Distribución

Lippia graveolens, se encuentra distribuido en: San Francisco de Conchos, Chihuahua; San Dimas, Durango; Atoyac de Álvarez, Guerrero; Mezquitlán e Ixmiquilpan, Hidalgo; Santiago Chazumba, Oaxaca; Toluca y Peñamiller, Querétaro; Tehuacán, y Tepexco Puebla; Río Verde y San Antonio, San Luis Potosí, La Paz, Baja California Sur; La Trinitaria y Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; General Cepeda, Coahuila; Tepoztlán, Morelos; Jalpa, Zacatecas. *Lippia palmeri*: Comondú, La Paz y Mulegé, Baja California Sur; Hermosillo, Sonora; Tepetlán, Veracruz. *L. graveolens* está registrada para Jalisco (SEMARNAT, 2008).

2.7.6 Hábitat

En la República Mexicana, sus principales hábitats se localizan en lugares poco accesibles como cerros, lomeríos, laderas, arroyos y cañadas de suelos alcalinos, generalmente pedregosos, de textura franco-arenosa (Villavicencio G, 2007).

2.7.7 Usos

Popularmente, *Lippia graveolens* Kunth se usa como conservador natural y potenciador del sabor en muchos alimentos preparados en fresco como: pozole, guisados, sopas, estofados de carnes, platillos típicos, pizzas y otras comidas. En alimentos procesados se emplea como antioxidante para la elaboración de embutidos y en conservas como: salmón, atún y sardinas. En la industria refresquera y licorera el orégano se utiliza como fijador y saborizante (Huerta, 1997).

2.7.8 Actividad Farmacológica

Tanto las hojas como el aceite esencial tienen propiedades antiasmáticas, antiespasmódicas, expectorantes, antiinflamatorias, antisépticas, analgésicas y cicatrizantes. Se utiliza en la industria farmacéutica como componente de medicamentos para el control de enfermedades de las vías respiratorias y del aparato digestivo en humanos y animales. El aceite de orégano tiene actividad biológica como: antibacteriana, antiviral, larvicida, moluscida y fungicida (Arcila & Loarca, 2004).

2.7.9 Composición química del Aceite esencial de orégano (AEO)

El aceite AEO contiene timol (40-60%) (Figura 10), *p*-cimeno (7.7-9.2%), 1,8-cineol (4.5-4.8%), carvacrol (3.1-21%) (Figura 11), γ -terpineol (3.1-3.9%), metil-timol (2.4-3.8%), mirceno (0.9-2.5%), 3-careno (0.9-1.5%), cariofileno (0.8-1.2%), linalool (0.7-1.3%) y al menos 34 elementos más en menores cantidades.

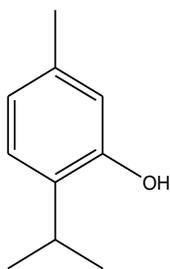


Figura 10. Timol.

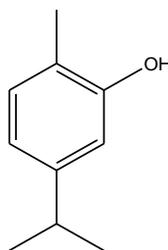


Figura 11. Carvacrol.

2.7.10 Usos del AEO

Cosmético, el extracto de aceite de orégano se usa como esencia y fijador de olor en perfumes de marcas comerciales reconocidas; así como, en la manufactura de jabones y productos de aromaterapia.

Industrial, fabricación de aceite para aeronáutica y limpieza de piezas automotrices y en la elaboración de veladoras (Huerta, 1997).

2.8 Romero



Fotografía 6. Arbusto de romero.

Fuente: (León V. , 2005).

2.8.1 Sinonimia popular

Romero, arbusto marino

2.8.2 Taxonomía

El nombre romero proviene del griego *rophi*, que significa arbusto y *myrinus* “aromático”; arbusto aromático, catalogada por Carlos Linneo como *Rosmarinus officinalis*. En la tabla 11 se muestra la clasificación taxonómica de la planta.

Tabla 11. Clasificación Taxonómica del romero.

Categoría Taxonómica	Nombre
Reino	Plantae
División	Angiospermae
Clase	Dicotyledonea
Orden	Tubiflorae
Familia	Labiatae
Subfamilia	Nepetoideae
Género	<i>Rosmarinus</i>
Especie	<i>Rosmarinus officinalis</i>

Fuente: (González & Cruz, 2013)

2.8.3 Descripción botánica

Es un subarbusto perfumado que puede medir de 50 a 150 cm de altura, perenne, frondoso y muy ramificado. Los principios activos se concentran en las hojas y a veces, en la sumidad florida. Las primeras son opuestas, coriáceas y estrechamente lineares. Pueden llegar a medir

hasta 3 cm de largo y 4 mm de ancho, y sus márgenes enteros enrollados hacia abajo hacen que parezcan casi cilíndricas. La cara superior de las hojas jóvenes es pelosa y de color verde intenso, las hojas adultas son glabras. Esta cara es rugosa y está surcada por el nervio medio, que está hendido. Este mismo nervio sobresale claramente en el envés, que está cubierto por un denso tomento blanco.

La floración dura casi todo el año y produce flores labiadas que se agrupan en inflorescencias densas, que se encuentran en las axilas de las hojas. La coloración es azulada, rosa o blanca, con manchas violáceas en el interior y tienen dos estambres encorvados que están soldados a la corola y tienen un pequeño diente. Estas flores presentan dos labios bien marcados, el superior con dos lóbulos y el inferior con tres, de los cuales el intermedio es cóncavo y alargado. El fruto es una tetraquenoio de color pardo.

Toda la planta desprende un fuerte y aromático olor, algo alcanforado. Su sabor característico también es aromático, pero áspero y algo picante.

2.8.4 Distribución

Se da en la región mediterránea, sur de Europa, norte de África y también Asia menor, en España se halla en la mayor parte de Cataluña, hasta los Pirineos en Aragón y Navarra, Castilla-La Mancha, Castilla-León, la Rioja, Madrid, Murcia, en las zonas montañosas de la Comunidad Valenciana.

Planta nativa de la región mediterránea, introducido en América como hierba culinaria. Se cultiva en diversos lugares de nuestro país en escala comercial y doméstica (Reader's, 1987).

2.8.5 Hábitat

Este arbusto es propio de zonas secas y áridas. La recolección se realiza entre los meses de abril a julio y se conserva en cajas de cartón o bolsas de papel.

2.8.6 Usos

Popularmente, el *R. officinalis* se usa como antiséptico, antidepresivo, antiespasmódico, digestivo, diurético, carminativo, abortivo, insecticida y como estimulante, mientras que, su AE mezclado con otras drogas se emplea para la elaboración de tónicos capilares para el cuidado del cabello, la alopecia y la caspa.

En medicina, el AE de *R. officinalis* se emplea por sus propiedades estimulantes, presumiblemente debido a que en su composición química se encuentra contenido alcanfor, mientras que, en las industrias cosmética, farmacéutica y de alimentos, se utiliza como fragancia en cremas, lociones y perfumes, asimismo como conservador por sus propiedades antioxidantes.

2.8.7 Actividad farmacológica

El romero es carminativo, digestivo y antiespasmódico, y tiene propiedades coleréticas, colagogas y hepatoprotectoras. El efecto favorable que ejerce en la digestión se produce al

actuar sobre varios niveles. En primer lugar, estimula la producción de los jugos gastrointestinales. Además relaja el músculo liso gastrointestinal, elimina posibles espasmos y favorece las secreciones.

En cuanto a la actividad antiinflamatoria de los principios del romero, se ha comprobado en animales de experimentación que, el ácido rosmarínico incrementa la producción de prostaglandinas E2 y reduce la producción de prostaglandina B4 en leucocitos polimorfos nucleares humanos.

2.8.8 Características y composición química del aceite esencial de romero (AER)

El aceite esencial es un líquido incoloro o de color amarillo pálido con un fuerte aroma fresco, alcanforado o mentolado herbáceo y una nota baja a madera balsámica (AENOR, 1997).

El AER está compuesto principalmente por:

La presencia de α -pineno (figura 13), β -pineno, canfeno, ésteres terpénicos como el 1,8-cineol (figura 14), alcanfor (figura 12), linalol, verbinol, terpineol, carnosol, rosmanol, isorosmanol, 3-octanona, acetato de isobanilo y β -cariofileno; los ácidos vanílico, caféico, clorogénico, rosmarínico, carnósico, ursólico, oleanólico, butilínico, betulínico, betulina, α -amirina, β -amirina, borneol, y acetato de bornilo (Avila, Navarro, & Vera, 2011). Sin embargo, la composición del aceite esencial de romero puede variar significativamente, en función de distintos factores como la parte de la planta recolectada, el grado de desarrollo de la planta en el momento de la recolección o la procedencia geográfica, entre otros (López, 2008).

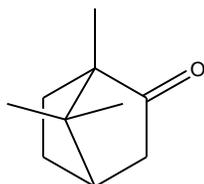


Figura 12. Alcanfor.

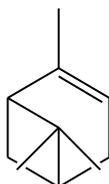


Figura 13. α -pineno.



Figura 14. 1,8-cineol.

3 Objetivos

3.1 Objetivo general:

- Determinar la concentración letal media (CL₅₀) de los aceites esenciales aislados de cinco especias por medio del bioensayo de letalidad de *Artemia* para evaluar su toxicidad aguda.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar la búsqueda bibliográfica para determinar el estado actual de la investigación.
- Identificar el material vegetal en el Herbario Etnobotánico IZTA de la FES- Iztacala, UNAM.
- Seleccionar el método adecuado de extracción de aceites esenciales, para obtener el mejor rendimiento.
- Obtener y caracterizar los diferentes aceites esenciales a evaluar.
- Investigar el ciclo de vida de la *Artemia franciscana*.
- Establecer las condiciones óptimas de cultivo de *Artemia franciscana*, para su uso en un bioensayo.
- Desarrollar un bioensayo con *Artemia franciscana*, para probar los diferentes aceites esenciales a evaluar.
- Observar el daño ocasionado al sujeto de estudio (naupli de *Artemia*) por microscopía electrónica de barrido y óptica.
- Efectuar el análisis estadístico.

4 Metodología

Esta investigación corresponde a un estudio de carácter experimental, la cual fue realizada mediante bioensayos de letalidad de la especie *Artemia franciscana* al ser sometida a diferentes concentraciones de los aceites esenciales aislados de 5 diferentes especias.

La metodología se dividió en 4 partes:

- 1) Eclosión de *Artemia franciscana*
- 2) Aceites esenciales
- 3) Bioensayo
- 4) Estudio gráfico de evaluación de toxicidad

4.1 Eclosión de *Artemia*

Los quistes de *Artemia franciscana* se adquirieron en el Mercado del Pez, en la esquina que forman las calles Imprenta y Jardineros. Colonia Morelos, Delegación Venustiano Carranza, Ciudad de México D.F.

4.1.1 Control de calidad a quistes de *Artemia*

Para el control de calidad de quistes de *Artemia* se realizan las siguientes pruebas:

4.1.1.1 Color

Parámetro determinado por comparación entre la muestra y cartas Munsell (Anexo C) (Lynn, 2014)

4.1.1.2 Determinación de % de humedad

- a) Determinar el peso de un pesafiltro después de haberlo mantenido una hora en una estufa a 60°C.
- b) Colocar aproximadamente medio gramo de quistes en el pesafiltros y pesar
- c) Poner el pesafiltros con la muestra a secar durante 24 h a una temperatura de 60°C.
- d) Después de 24 h, determinar el peso del pesafiltros con la muestra.
- e) Calcular el contenido de humedad (%) presente en los quistes.

4.1.1.3 Tamaño promedio

Medir 100 quistes con la ayuda de un microscopio óptico (Iroscope®) y un micrómetro ocular.

4.1.2 Eclosión

Para eclosionar los quistes es necesario seguir la siguiente metodología (diagrama 1):

Preparar agua de mar artificial de la siguiente manera: Pesar 35 gramos de sal marina (sal marina marca Oceanic®) y adicionar un litro de agua desionizada, filtrar y burbujear aire por 30 minutos.

Pesar aproximadamente 20 mg de quistes, hidratarlos con agua desionizada por un período de 30 minutos.

Preparar la solución descapsuladora (3 mL de hipoclorito de sodio (NaOCl) más 3 mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 5% más 20 mL de agua de mar).

Pasar los quistes hidratados a la solución descapsuladora por un período de 5-8 minutos en agitación constante. Transcurrido el tiempo filtrar y enjuagar con abundante agua desionizada. En seguida pasar a una solución de HCl al 1%, por un período de 30 segundos a 1 minuto, filtrar y enjuagar con abundante agua de mar y finalmente dejar en agua de mar suficiente, para trasvasar.

Montar un equipo de eclosión: para ello se utiliza un soporte universal donde se fija un anillo y en éste se coloca un recipiente cónico que contiene el agua de mar con los quistes a eclosionar, un termómetro, para verificar la temperatura del proceso, una lámpara que proporciona la temperatura ideal de eclosión (para este fin se necesita una lámpara que contenga un foco incandescente de 60 W) y una bomba de aire que suministre aireación constante; como el que se observa en la Fotografía 7 (NMX-AA-110-SCFI, 1995).

Trasvasar los quistes previamente descapsulados al embudo de separación y anotar la hora.

Controlar las siguientes condiciones que son óptimas para la eclosión: Temperatura de 25-30°C, aireación e iluminación constante, pH de 7.5-8 y densidad de 5 g/L.

Los quistes eclosionan y se tienen las Artemias en el estadio de Naupli. Los nauplis de *A. franciscana* estarán listos para utilizarse 24h después de la eclosión.

4.1.3 Control de Calidad de Nauplis

4.1.3.1 Tamaño promedio

Tomar aleatoriamente 100 nauplis y medirlos con la ayuda de un microscopio óptico y un micrómetro ocular

4.1.3.2 Determinación de la eficiencia de eclosión (EE)

- a) Colocar 80 mL de agua de mar artificial en una probeta de 100 mL
- b) Colocar aproximadamente 0.25 g de quistes en la probeta
- c) Mantener la probeta con aireación y luz constante
- d) Después de una hora ajuste el volumen hasta 100 mL
- e) Transcurridas 24 h, tomar 5 muestras de 0.250 mL cada una y colocarlas en cajas Petri
- f) Colocar 5 mL de agua de mar artificial en cada caja
- g) Añadir una gota de lugol en cada caja

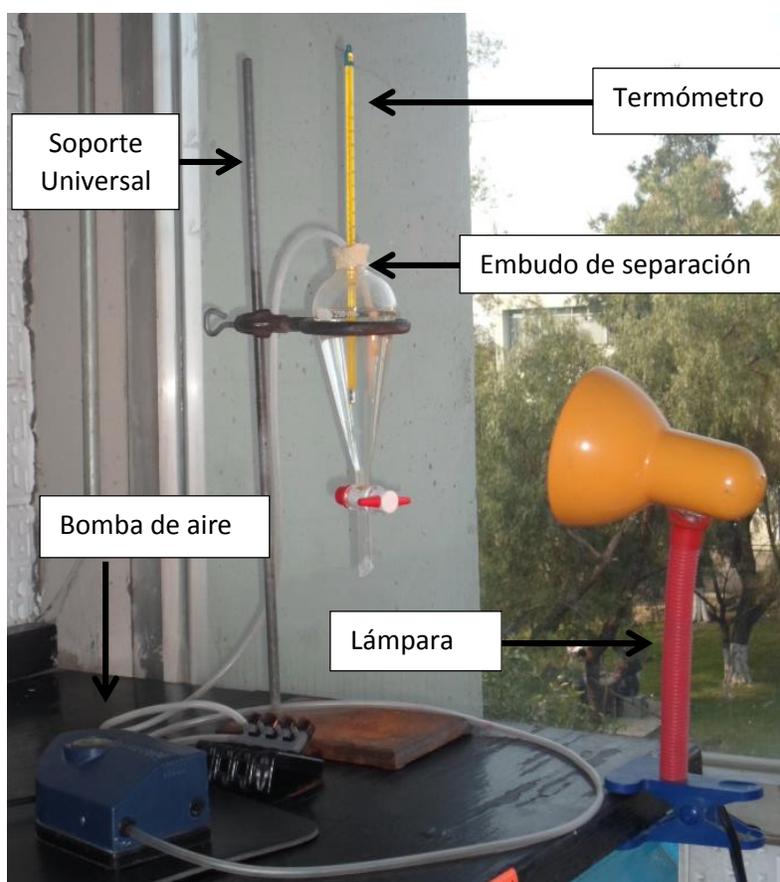
- h) Contar los nauplis presentes
- i) Calcular la eficiencia de eclosión

4.1.3.3 Porcentaje de eclosión

Para el cálculo del % de eclosión tomar la muestra previamente fijada con lugol y seguir el siguiente procedimiento:

- a) Agregar 3 gotas de hipoclorito de sodio (NaOCl) a cada caja para que las cáscaras vacías y los quistes que no eclosionaron se disuelvan y queden solo los embriones.
- b) Observar al microscopio y contar los embriones.
- c) Calcular % de eclosión

Nota: las ecuaciones para determinar % de humedad, EE y % de eclosión se encuentran en el anexo B.



Fotografía 7. Equipo de eclosión.

4.1.4 Estudio gráfico del ciclo de vida de *Artemia franciscana*.

Tomar una serie de fotografías y microfotografías, para situar las etapas de desarrollo de la *Artemia*, así como también la etapa del estadio en el cual se llevará el bioensayo.

- ✓ Para las fotografías utilizar un microscopio óptico.

- ✓ Para las micrografías utilizar un microscopio electrónico de barrido.

La preparación de las muestras es la siguiente:

1. Seleccionar un ejemplar de cada transformación visual observada de la Artemia.
2. Lavar con abundante agua desionizada para retirar los restos de sal que pudiera tener la muestra.
3. Colocar cada muestra en un cubreobjetos y dejar secar.
4. Una vez seca la muestra, colocar la laminilla en el microscopio y tomar la fotografía correspondiente.
5. Ya que se tomó la fotografía, llevar las muestras al laboratorio de microscopia electrónica de la FES Cuautitlán y tomar las micrografías convenientes.
6. Finalmente ordenar y organizar las fotografías y micrografías del ciclo de vida de la Artemia; en microscopia óptica y en MEB. Para su posterior uso en el bioensayo (Diagrama 1).

4.2 Aceites esenciales.

4.2.1 Materia prima

4.2.1.1 Colecta de la materia prima

El material vegetal se adquirió en el Mercado Sonora ubicado en Fray Servando Teresa de Mier # 419, colonia Merced Balbuena, Delegación Venustiano Carranza, C.P. 15800 (entre las calles San Nicolás, Canal y La Viga, a espaldas de la Estación Central de Bomberos), México D.F.

4.2.1.2 Herborización e identificación del material biológico.

Una vez obtenida la materia prima, herborizar; colocar un ejemplar de las partes aéreas de romero, epazote y laurel; (hojas, tallos y flores si es que las posee) entre dos hojas de papel secante; del clavo y del orégano se toma una muestra representativa, posteriormente llevar al Herbario Etnobotánico IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM, para la identificación de la planta medicinal.

4.2.1.3 Material Extraño

Considerando las características macroscópicas del material vegetal, efectuar una separación de todo aquello que no cumpla con la descripción botánica (tierra, hojas, material con cambio de coloración o signos de deterioro, etc.) (WHO, 1998).

4.2.1.4 Parte utilizada de la planta

Romero, epazote y laurel se utiliza la parte aérea, orégano, las hojas y clavo los botones florales.

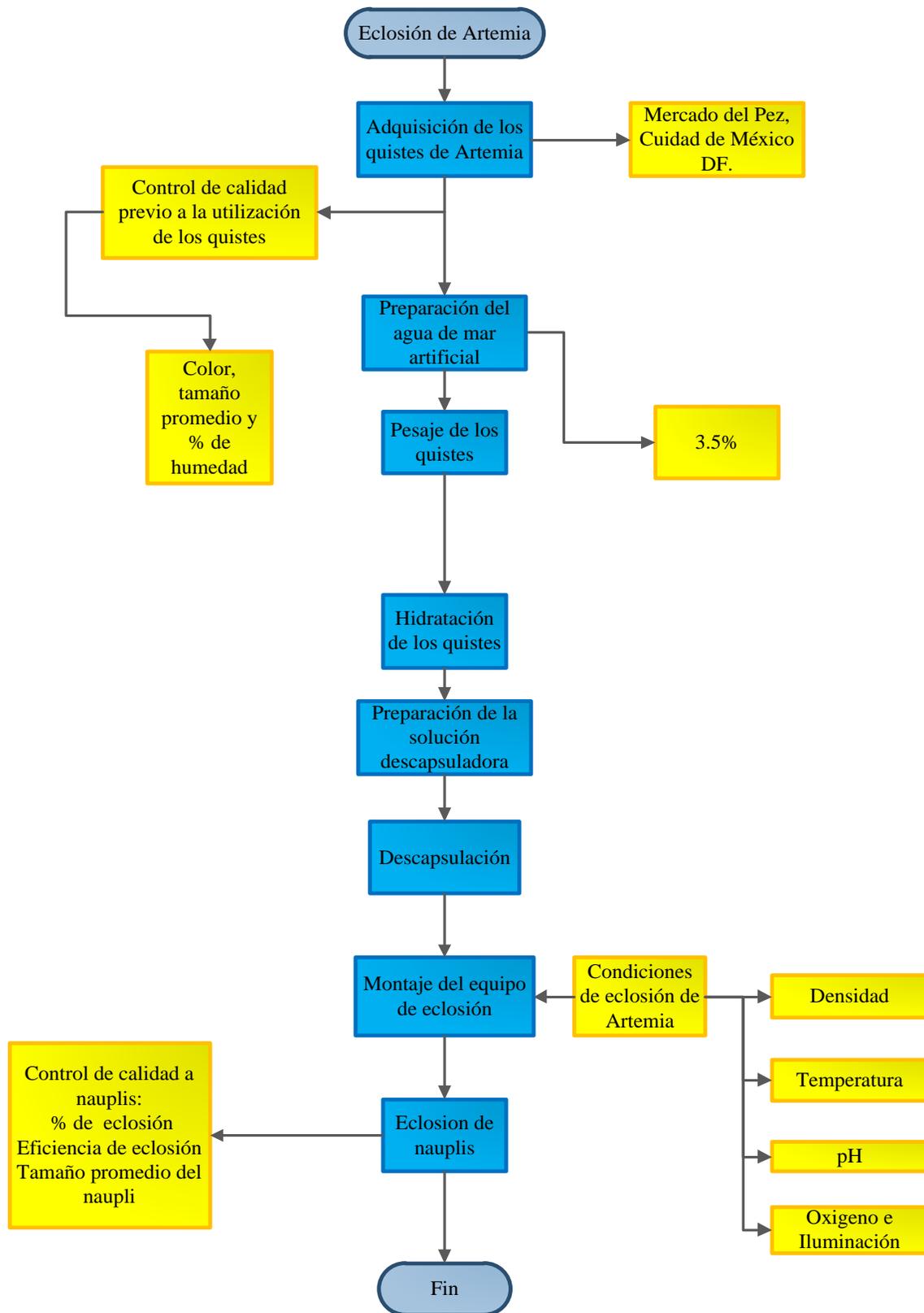


Diagrama 1. Eclosi3n de Artemia.

4.2.1.5 *Desecación a la sombra*

Colocar a los ejemplares en disposición de capas delgadas entre papel desecante. Desecar a temperatura ambiente, protegiendo del polvo y luz solar a la materia prima (Villar del Fresno, 1999). La desecación aplica para romero, epazote y laurel; en el caso de clavo y orégano se adquirieron secos.

4.2.2 **Obtención de los aceites esenciales**

4.2.2.1 *Molienda.*

Colocar el material vegetal en un mortero para triturar la materia prima.

4.2.2.2 *Extracción*

Los aceites esenciales de romero, laurel, epazote y orégano se obtuvieron por hidrodestilación (HD), para esta metodología pesar aproximadamente 100 g del material vegetal y colocarlo en un matraz bola de 3 L al cual se le adiciona 1.5 L de agua destilada. Montar un equipo de hidrodestilación adaptado con una trampa tipo Clevenger, (figura 15). Se inicia el calentamiento, una vez que comienza la destilación se toma el tiempo (2 h). Durante este proceso se cuida la temperatura.

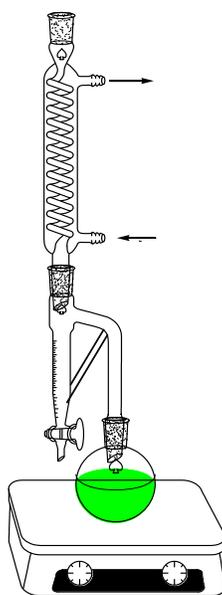


Figura 15. Dispositivo de hidrodestilación adaptado con una trampa tipo Clevenger.

Para el aceite de clavo, se sustituye la trampa tipo Clevenger, por una trampa de Dean Stark (figura 16) y se efectúa el siguiente procedimiento:

Pesar aproximadamente 100 g del material vegetal, colocarlo en un matraz bola de 2 L al cual se le adiciona 1 L de agua destilada; seguido de esto, montar el equipo de HD utilizando una trampa Dean Stark, se inicia el calentamiento, una vez que comienza la destilación se

colecta la mezcla aceite-agua que se obtiene, este procedimiento se detiene hasta que se deje de obtener la mezcla, durante el proceso es necesario adicionar agua destilada en medida que lo requiera el sistema. Cuidar la temperatura.

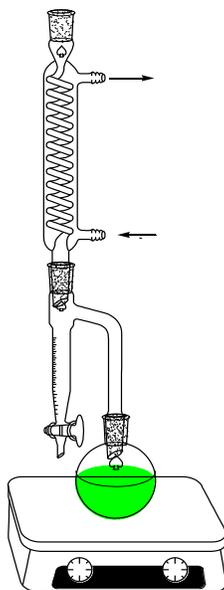


Figura 16. Equipo de Hidroddestilación adaptado con una trampa de Dean-Stark.

4.2.2.3 Separación de la mezcla aceite-agua

En el caso de la HD con trampa Clevenger, el aceite se separa de la mezcla aceite-agua por diferencia de densidades, directamente de la trampa (aceites más ligeros que el agua). En el caso del aceite de clavo (aceite esencial más pesado que el agua), se colecta la mezcla aceite-agua, directamente de la trampa de Dean-Stark y se coloca en un embudo de separación y se separa el aceite, que posteriormente se seca con un poco de sulfato de sodio anhidro.

4.2.2.4 Almacenamiento

Almacenar los aceites esenciales en frascos color ámbar, perfectamente cerrados a una temperatura de 4°C.

4.2.3 Control de calidad

En el control de calidad de los aceites esenciales se consideraron los siguientes parámetros:

4.2.3.1 Pruebas Sensoriales

Estado Físico: De acuerdo al estado de agregación de la muestra.

Color: Parámetro determinado por comparación entre la muestra y cartas Munsell (Lynn, 2014)

Olor: Se propone utilizar la clasificación de aromas en vinos (Etaio, 2007).

- Afrutado: con aroma de frutas. Frutos rojos (grosella negra, cereza o frambuesa) para los vinos tintos y otros (durazno, damasco o cítricos) para los vinos blancos.
- Animal: vino tinto que presenta un bouquet de cuero, musgo, caza.
- Balsámico: incienso, alcanfor, resina, pino, vainilla.
- Empireumático: pan tostado, café ahumado, tabaco, cacao.
- Especiado: con olores a especias (regaliz, canela, pimienta, clavo de olor, nuez moscada).
- Floral: con perfume de flores (rosa, violeta).
- Maderizado: posee un olor particular producto de su crianza en barricas de roble.
- Vegetal: hierba, hoja, maleza, humus, heno cortado, pimienta morrón.

4.2.3.2 Pruebas Físicas

4.2.3.2.1 Densidad relativa¹

Para el desarrollo de este control, se utiliza el principio del método de picnómetro (NMX-F-075-SCFI, 2012). Debido a que el rendimiento de los aceites esenciales es muy bajo y no se contaba con un picnómetro muy pequeño, se optó por utilizar matraces volumétricos de 1 mL. Los matraces secos y limpios se mantuvieron en una estufa (hasta tener peso constante), se pesaron vacíos. En seguida se llenaron con agua destilada a la misma temperatura y se pesaron de inmediato. Posteriormente se lavaron con etanol, se secaron interiormente y exteriormente con un material absorbente, cuidando no dejar pelusas; se llenaron con el aceite esencial hasta el nivel de aforo e inmediatamente se pesaron.

4.2.3.2.2 Índice de refracción²

Para la determinación del índice de refracción, se emplea un refractómetro Abbe con una precisión de ± 0.0002 . El refractómetro se ajustó con agua destilada y se tomó la lectura de ésta (1.3333). Se registraron las temperaturas del agua, del aceite esencial y del medio ambiente. Posteriormente se colocó una gota de la muestra en el prisma y se tomó la lectura. Se aplicó un factor de corrección y se ajustó la temperatura ambiente con la estándar a 20° C (NMX-F-074-SCFI, 2011).

¹ La densidad se calculó de acuerdo a la ecuación que se encuentra en el anexo B.

² El índice de refracción se corrigió de acuerdo a la ecuación que se encuentra en el anexo B.

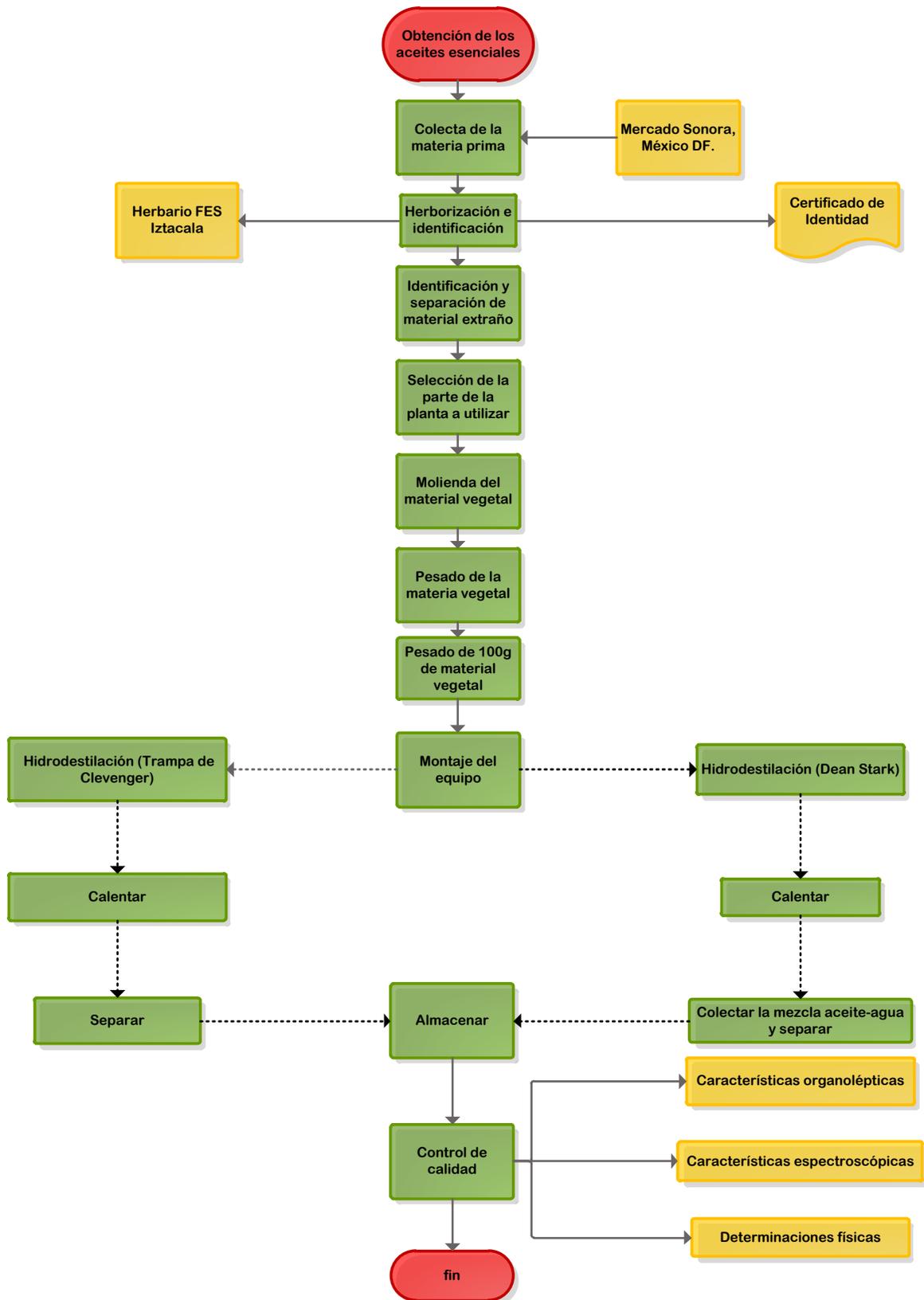


Diagrama 2. Obtención de aceites esencial.

4.2.3.3 Infrarrojo

La espectroscopia se determinó en un espectrofotómetro de infrarrojo, modelo Nicolet iS10FT con punta de diamante, en la que se colocó la muestra directa sin dilución alguna; se obtiene el espectro para su posterior interpretación (Diagrama 2).

4.3 Bioensayo

4.3.1 Preparación de las concentraciones de los aceites esenciales a evaluar.

Para poder realizar la prueba de actividad biológica, se debe considerar la baja solubilidad que tienen los aceites esenciales en medio acuoso, (recordar que las Artemias son organismos acuáticos), es por esto que primero, se debe realizar una búsqueda de agentes surfactantes o disolventes auxiliares que coadyuven a la solubilidad de los aceites en medio acuoso, para esto se debe seguir la siguiente metodología.

La bibliografía sugiere cómo agentes surfactantes al Tween 20, y al 80 y como disolventes auxiliares al dimetilsulfóxido (Colegate, 1993).

Para seleccionar experimentalmente el agente adecuado y favorecer la solubilidad total de los aceites esenciales a evaluar se hace tomando en cuenta los siguientes criterios:

- a) Qué en la mínima cantidad se solubilice el aceite y sea estable por más de 48 h.
- b) Qué en esa mínima cantidad en un período de 48 h no se muera ningún nauplio.

Realizar los cálculos necesarios para preparar las concentraciones adecuadas de los diferentes aceites a evaluar. La manera general en la que se preparan las concentraciones es la siguiente:

- ✓ Realizar los cálculos tomando en cuenta las densidades de cada aceite.
- ✓ Preparar 11 diferentes concentraciones de 1 ppm-100 ppm (de 10 en 10), a partir de una solución stock (aceite esencial, agente coadyuvante y agua de mar) (diagrama 3).

En el anexo D, se indica cómo se prepara cada concentración de los diferentes aceites esenciales a evaluar, así como, los cálculos que se realizan para la preparación de las concentraciones Diagrama 3).

Ya que se tienen listas las concentraciones se puede realizar el bioensayo.

4.3.2 Evaluación de toxicidad

Para la realización del bioensayo se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Realizar la prueba en nauplis de *A. franciscana* de 24 h de eclosión los cuales van a ser contenidos en pequeñas cajas Petri de plástico de 5 cm de diámetro, previamente perforadas de la tapa, con orificios suficientes para tener buena entrada de aire.

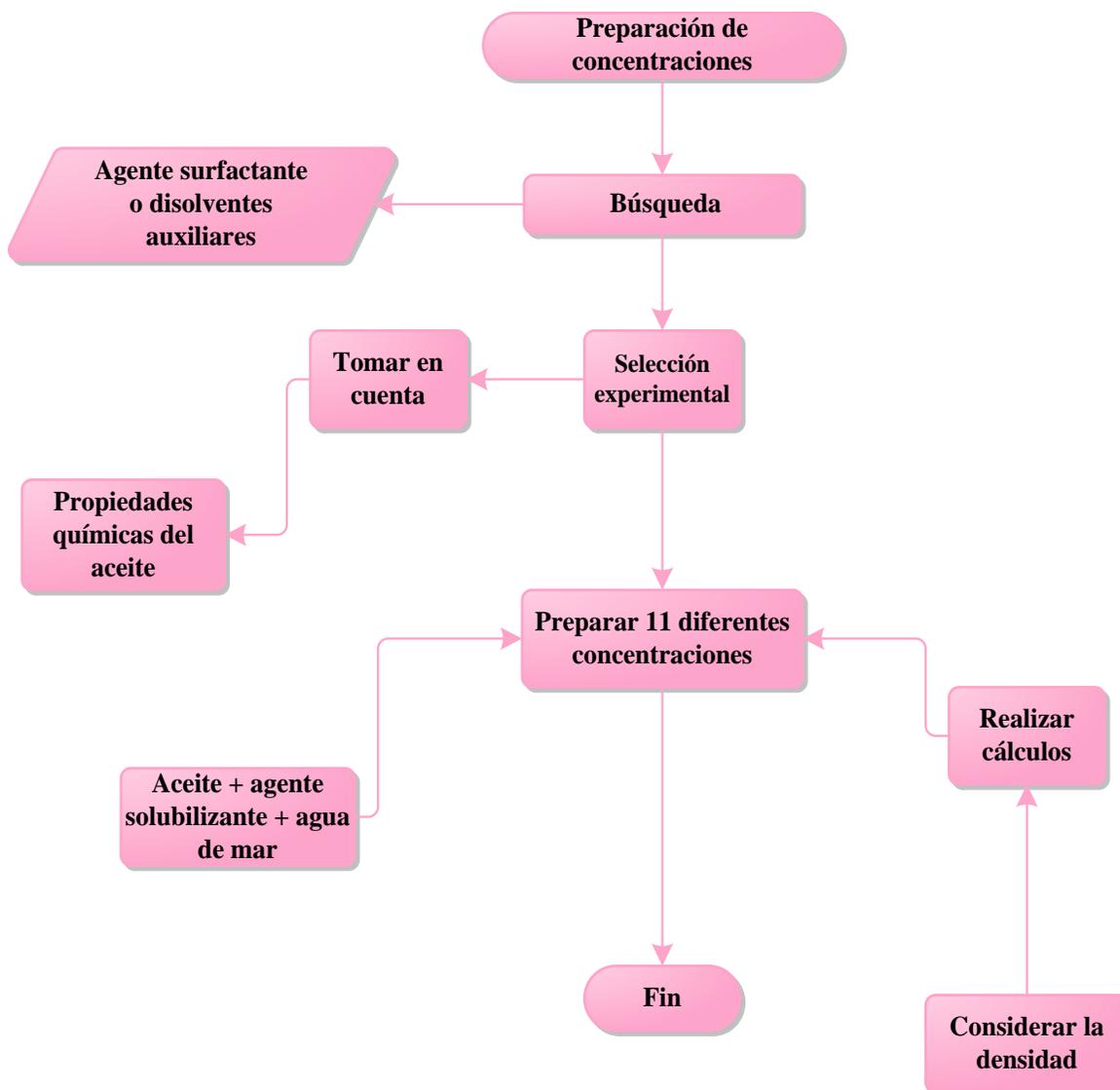


Diagrama 3. Preparación de concentraciones.

Transferir 10 naupliis de *A. franciscana* con una pipeta Pasteur a cada caja Petri. Cuidar que el volumen de agua de mar que se toma con los naupliis no exceda 0.05 mL.

Posteriormente, transferir a las cajas Petri 10 mL de las concentraciones respectivas del aceite a evaluar (previamente preparadas) realizar un total de 4 réplicas por cada muestra. Anotar la hora en la que se agrega cada concentración. Posteriormente colocar una lámpara la cual genera el calor suficiente para la incubación $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Considere en cada corrida el control positivo y control negativo (Pino & Jorge, 2010).

4.3.3 Controles

Control positivo: Preparar una solución de dicromato de potasio (K_2CrO_7) a una concentración de 500 ppm utilizando agua de mar para su preparación.

Control negativo: Agua de mar más la cantidad de coadyuvante (tween) que se necesita para solubilizar la muestra a evaluar.

4.3.4 Tiempo de prueba

Tomando en cuenta que se va a realizar la determinación de la concentración que causa la muerte al 50% (CL₅₀) de nauplis de *A. franciscana*, el tiempo de prueba debe ser de 24 h (Pino & Jorge, 2010), pasado este tiempo determinar el número de organismos muertos en cada caja Petri.

Durante el periodo de prueba, observar el comportamiento de los nauplis al ser expuestos a los AE.

4.3.5 Criterio para dictaminar vivas o muertas

Para la evaluación de los nauplis fueron tenidos en cuenta los siguientes factores: nado errático, nado superficial, debilidad y pérdida del reflejo de huida; esta evaluación se hace con la ayuda de un estereoscopio. La larva es considerada muerta si no se observan movimientos de los apéndices durante 10 segundos.

4.3.6 Calculo de CL₅₀

Se cuenta el número de organismos muertos utilizando el criterio del punto anterior y se calculan los valores de CL₅₀ y los intervalos de confianza 95% por el método de análisis estadístico Probit, en este trabajo se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20 (Diagrama 4).

4.4 Estudio gráfico de evaluación de toxicidad

Para documentar el bioensayo, se procederá a dar una evidencia gráfica utilizando microscopia electrónica de barrido y óptica.

Procedimiento para preparación de laminillas:

Una vez que se ha hecho el dictamen y conteo de muertas, se toman dos nauplis de *A. franciscana* muertos de las concentraciones más altas y realizar lo siguiente:

1. Colocar en una caja Petri y realizar varios lavados con agua desionizada, para no tener restos de sal que pudieran interferir en la observación al microscopio.
2. Una vez que ya no tienen residuos de sal, colocar a cada naupli en un cubreobjetos, dejar secar. Etiquetar de la siguiente manera:
 - ✓ Naupli1 (N1)
 - ✓ Naupli2 (N2)
3. Teñir a N1 con safranina O, de la siguiente manera:
 - a. Cubrir a la Artemia con safranina O
 - b. Dejar 1 minuto y enjuagar al chorro de agua

- c. Secar
- d. Observar al microscopio óptico a 40x tomar una fotografía
- 4. Preparar N2 para observar al microscopio electrónico de barrido (MEB).
- 5. Efectuar el mismo procedimiento, para el control positivo y el negativo.
- 6. Finalmente observar el daño ocasionado por cada aceite (Diagrama 5).

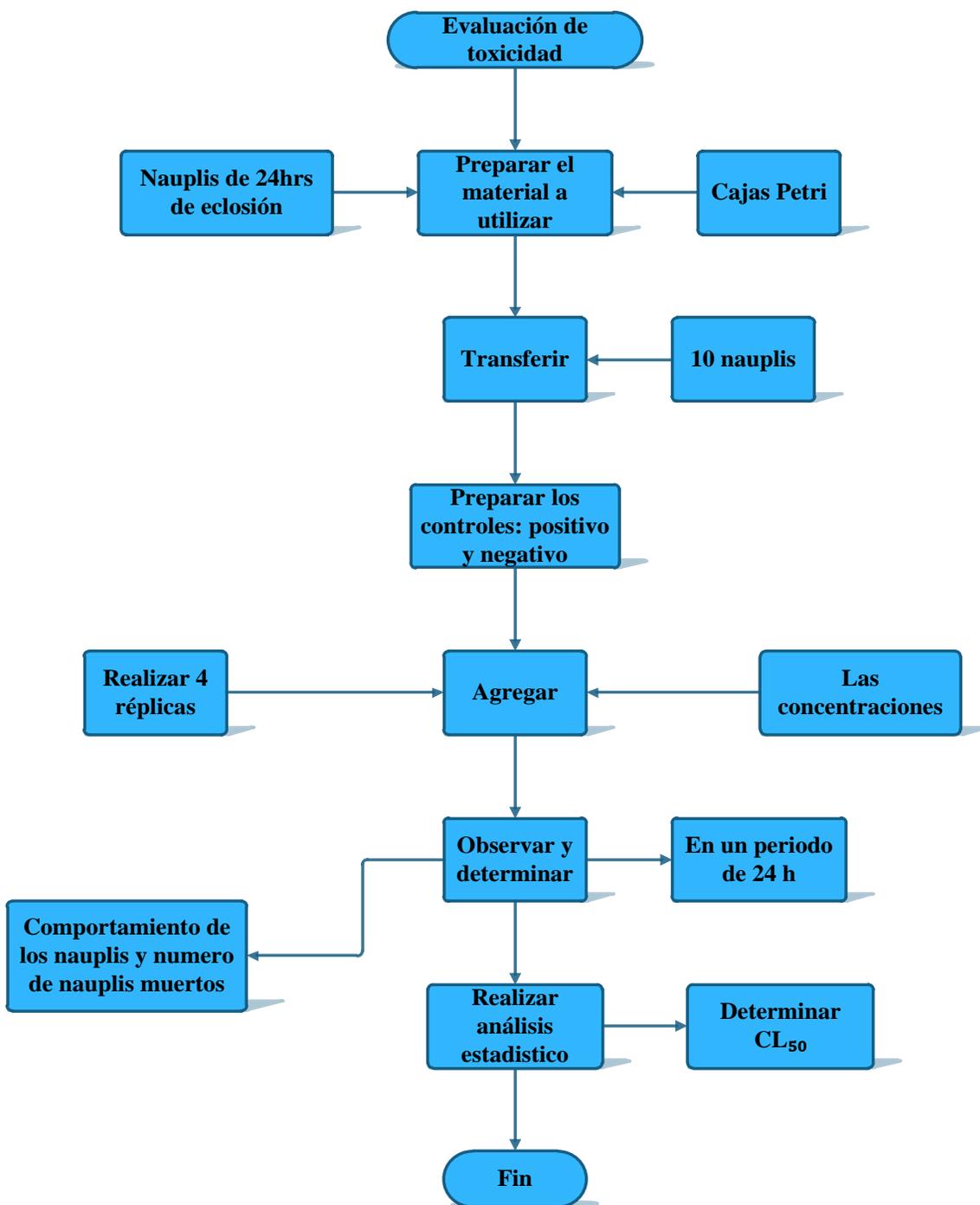


Diagrama 4. Evaluación de toxicidad.

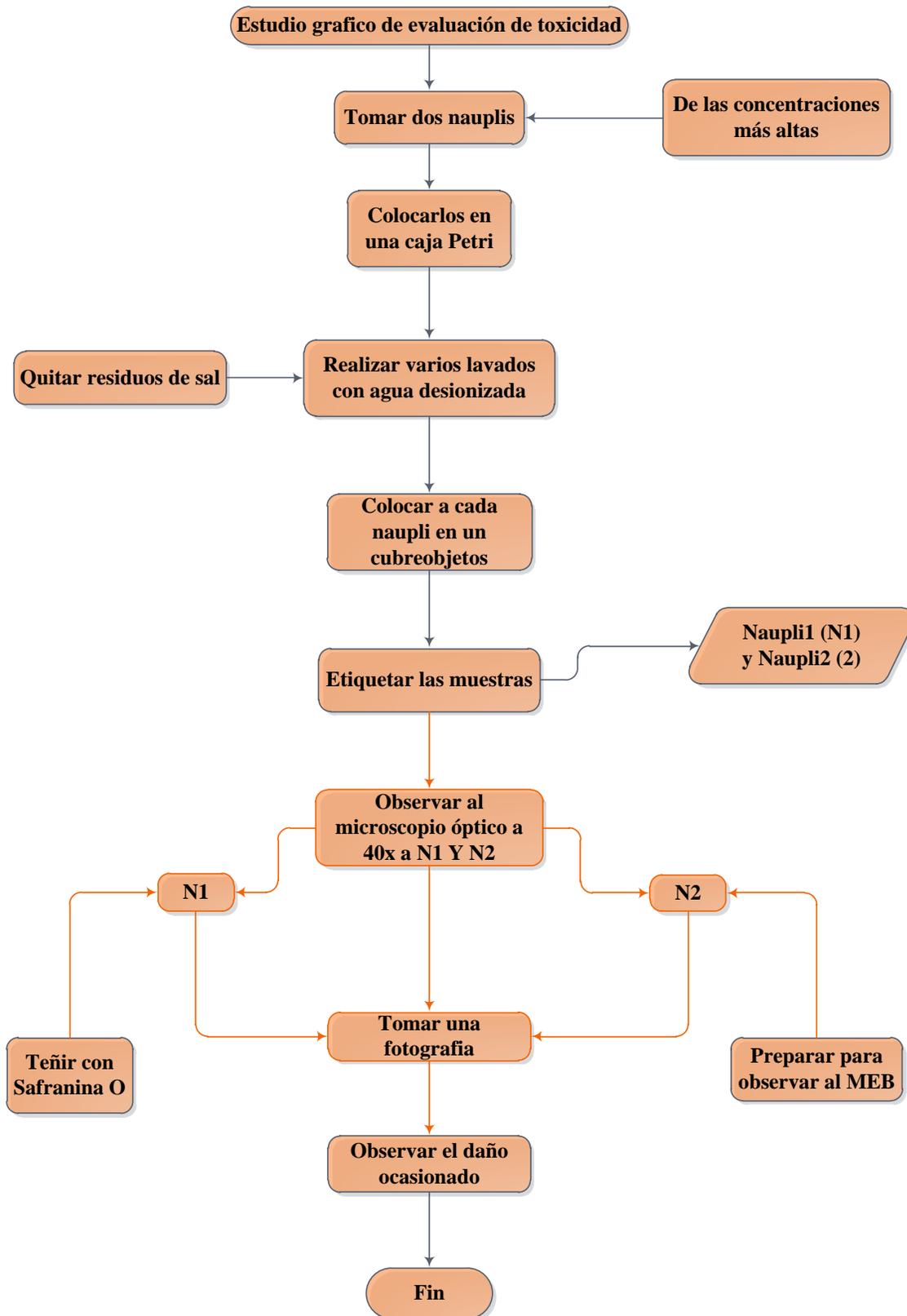


Diagrama 5. Estudio gráfico de evaluación de toxicidad.

5 Resultados

5.1 Eclosión de *Artemia*

5.1.1 Control de calidad

La viabilidad de los quistes se determinó realizando las siguientes pruebas: (tabla 12)

Tabla 12. Resultados del control de calidad de los quistes de *Artemia*.

Color Visual y utilizando cartas Munsell	Tamaño promedio ³	% de humedad
Marrón (8/8, 5YR)	230.7 μm	5.77 %

La calidad de los nauplis se establece calculando los parámetros: Tamaño promedio, eficiencia y porcentaje de eclosión (tabla 13).

Tabla 13. Resultados del control de calidad de los nauplis de *Artemia* de 24 h de eclosión.

Tamaño promedio ³	Eficiencia de eclosión	% de eclosión
743.7 μm	189589.5049 nauplios/g	82.96 %

5.1.2 Estudio gráfico del ciclo de vida de la *Artemia*

Para el estudio de cada etapa del ciclo de vida de *Artemia* se tomaron una serie de micrografías y fotografías (series fotográficas 1 y 2). Documentando y permitiendo de una forma sencilla reconocer cada estadio.

5.2 Aceites esenciales

5.2.1 Materia prima

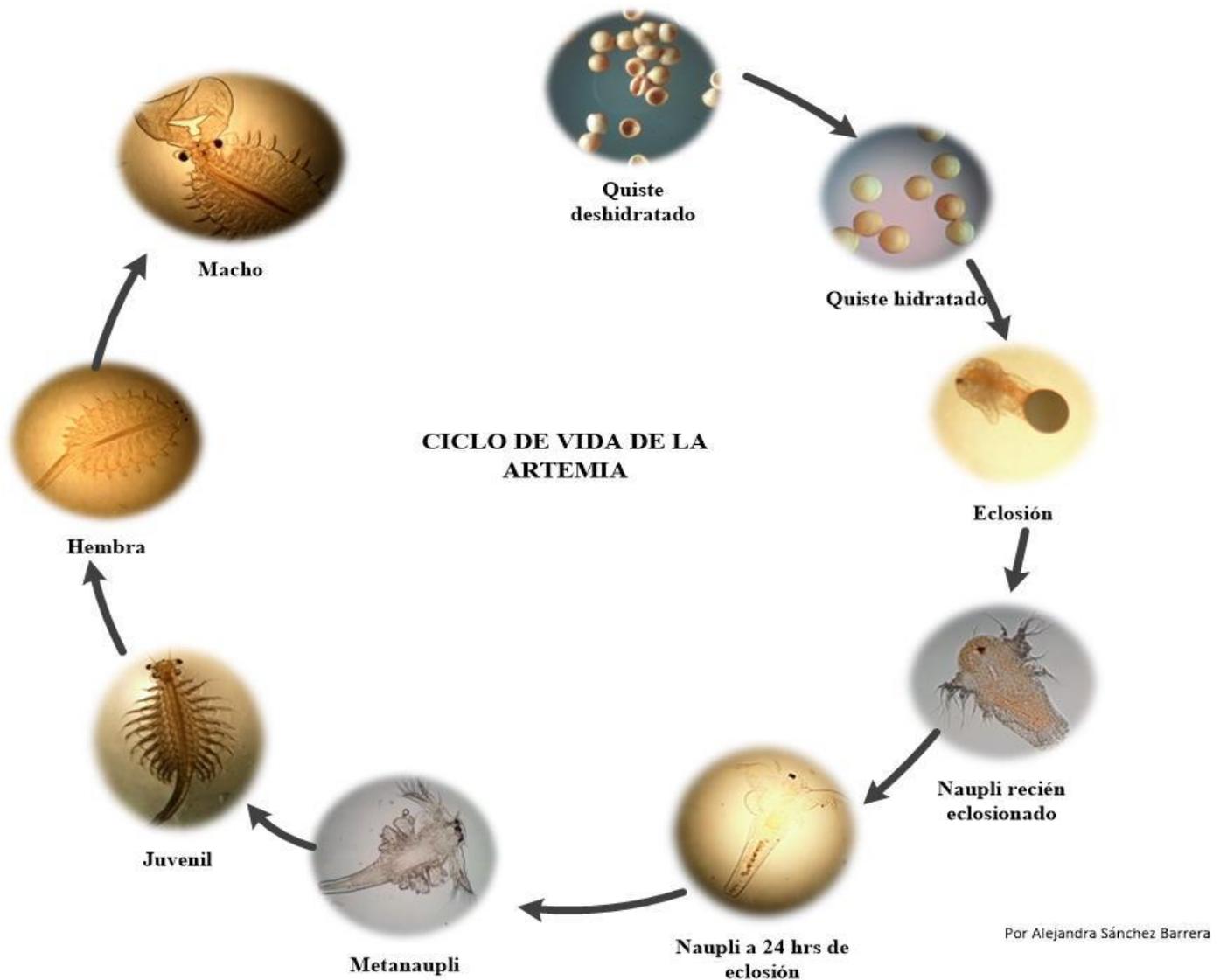
5.2.1.1 Recolección

Se adquirieron las plantas medicinales en el Mercado Sonora, en el mes de marzo del 2013.

5.2.1.2 Identificación de las plantas utilizadas

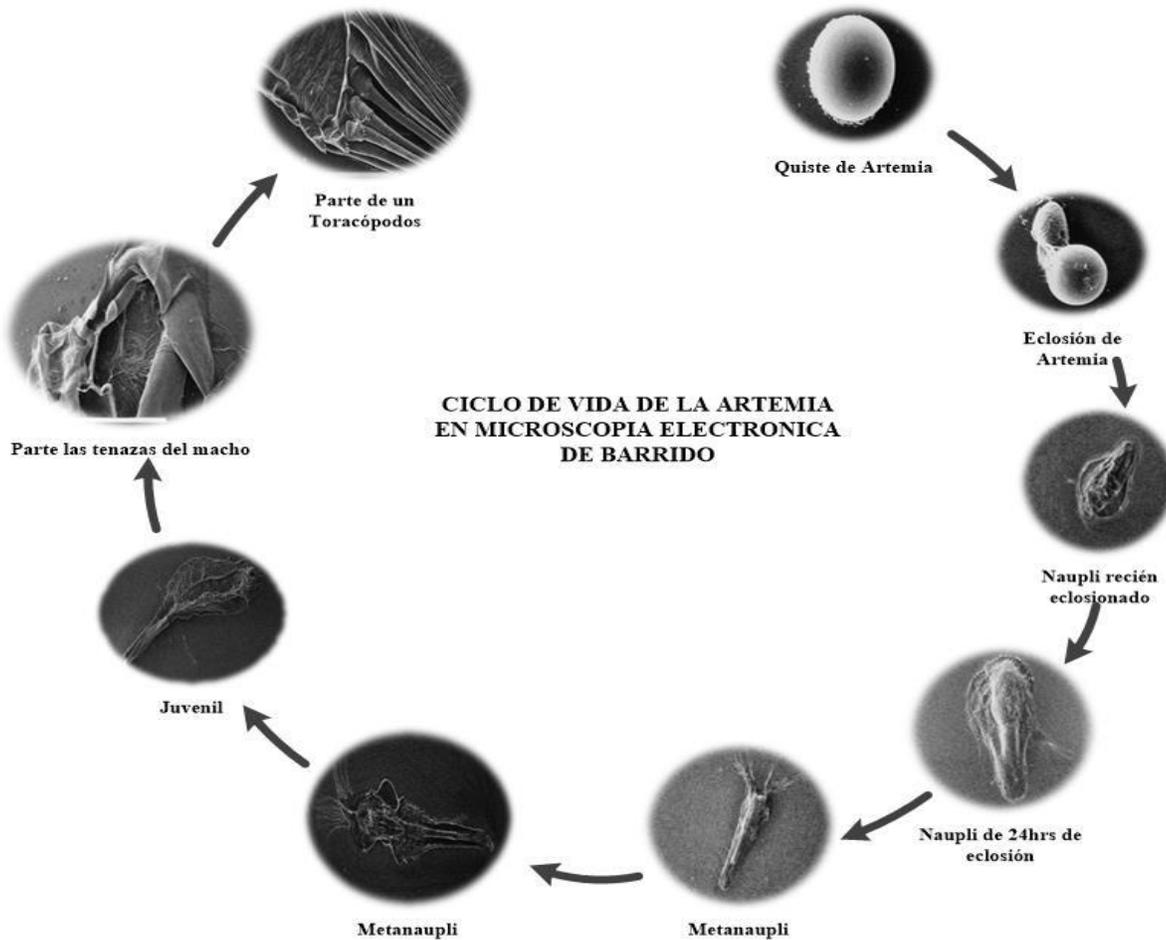
La identificación botánica de las materias primas utilizadas se llevó a cabo en la colección etnobotánica del Herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM en la tabla 14 se muestran los datos reportados.

³ Los resultados totales se encuentran en el anexo E



Serie fotográfica 1. Ciclo de vida de la Artemia franciscana^{4,5}.

⁴ Fotografías tomadas en el laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica de la FES Cuautitlán Campo 1 (L324) por Alejandra Sánchez (2013)



Serie fotográfica 2. Ciclo de vida de la Artemia en Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)⁵.

Fotografías tomadas en el laboratorio de Microscopia Electrónica de la FES Cuautitlán Campo1, por el Técnico Académico Rodolfo Robles Gómez (2013)

⁵ En el anexo A se encuentran las fotografías completas. En el anexo F se encuentran las series fotográficas a un tamaño normal.

Tabla 14. Resultados del certificado de identidad de las plantas utilizadas⁶.

Nombre científico	Familia	Nombre común	# de registro
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	Verbenaceae	“Orégano”	2072IZTA
<i>Litsea glaucences</i> H.B.K.	Lauraceae	“Laurel”	2189IZTA
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae/ Labiatae	“Romero”	2192IZTA
<i>Syzygium aromaticum</i> (L) Merrill & L.M. Perry	Myrtaceae	“Clavo”	2069IZTA
<i>Teloxys ambrosioides</i> (L) W.A. Weber Sin: <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Chenopodiaceae	“Epazote”	2190IZTA

5.2.1.3 Materia Extraña

Los criterios para la determinación de materia extraña se tomaron de la FHEUM (2013) y en la tabla 15 se muestran los datos obtenidos.

Tabla 15. Tipo de materia extraña encontrada en el material vegetal utilizado.

Nombre común	Tipo de material extraño
Clavo	Polvo
Epazote	Pasto, tierra
Laurel	Polvo
Orégano	Polvo
Romero	Tierra

5.2.1.4 Análisis macroscópico⁷



Fotografía 8. Hoja de epazote.



Fotografía 9. Botones florales del clavo.

⁶ La cédula de identificación y las fotografías de cada ejemplar se encuentran en el anexo F.

⁷ El análisis macroscópico se realizó utilizando un estereoscopio.



Fotografía 10. Flor y hojas de orégano.



Fotografía 11. Hoja de laurel.



Fotografía 12. Flores y hojas de romero.

Fotografías tomadas en el laboratorio de farmacognosia y Fitoquímica de la FES Cuautitlán Campo 1 (L-324) por Alejandra Sánchez (2014)

5.2.2 Obtención de los aceites esenciales

5.2.2.1 Extracción

Tabla 16. Parámetros de extracción.

Parámetros	Hidrodestilación (trampa Dean-Stark)	Hidrodestilación (trampa Clevenger)
Cantidad de material vegetal	100 g	100 g
Volumen de agua	1 L	1.5 L
Tiempo de extracción	5 h	2 h

5.2.2.2 Rendimiento

La materia vegetal (romero y epazote) utilizada se dejó secar a la sombra al aire libre. Orégano, clavo y laurel se utilizaron sin tratamiento previo (se adquirieron secos).

Tabla 17. Porcentaje de rendimiento de los Aceites Esenciales obtenidos.

Nombre de la planta empleada	Parte de la planta empleada	Material vegetal g	Cantidad del AE g	Rendimiento de extracción %	
				Experimental	Teórico ⁸
Clavo	Botón floral	100 g	9.61 g	9.61 %	15-20 %
Epazote	Hojas y tallos	100 g	0.14 g	0.14 %	0.6-1 %
Laurel	Hojas y tallos	100 g	1.51 g	1.51 %	No hay reportado
Orégano	Hojas	100 g	3.73 g	3.73 %	1-3 %
Romero	Hojas y tallos	200 g	1.59 g	0.795 %	1-2.5 %

5.2.2.3 Control de calidad a los aceites esenciales

Tabla 18. Resultados del control de calidad de cada aceite esencial.

Nombre de la planta empleada	Propiedades sensoriales de olor, aspecto y color		
	Color Visual y utilizando cartas Muncell	Aspecto	Olor
Clavo	Incoloro (8/1, 5YR)	Líquido	Especiado
Epazote	Amarillo tenue (8/8, 10YR)	Líquido	Especiado
Laurel	Incoloro (8/1, 5YR)	Líquido	Especiado
Orégano	Amarillo (7/8, 7.5 YR)	Líquido	Especiado
Romero	Incoloro (8/1, 5YR)	Líquido	Especiado

⁸ Los datos teóricos fueron consultados en el (Bruneton, 2001)

Tabla 19. Determinaciones fisicoquímicas de los AE.

Determinaciones fisicoquímicas

Nombre de la planta empleada	Índice de refracción a 20°C		Densidad (g/mL) a 20°C	
	Experimental	Teórico	Experimental	Teórico
Clavo	1.5320	1.5270-1.5350	1.0758	1.0380-1.060 ⁹
Epazote	1.4760	1.4760	0.9134	0.8754-0.8965 ¹⁰
Laurel	1.4660	No hay reportado	0.9144	No hay reportado
Orégano	1.4995	1.4790-1.4980	0.9570	0.890-0.922 ¹¹
Romero	1.4670	1.4640-1.4760	0.7959	0.894-920 ⁹

⁹ Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos

¹⁰ León Romaní, 2009

¹¹ Cano Morales, 2010

5.2.2.3.1 Espectroscopía infrarroja
5.2.2.3.2 Espectro infrarrojo del aceite esencial de clavo (AEC)

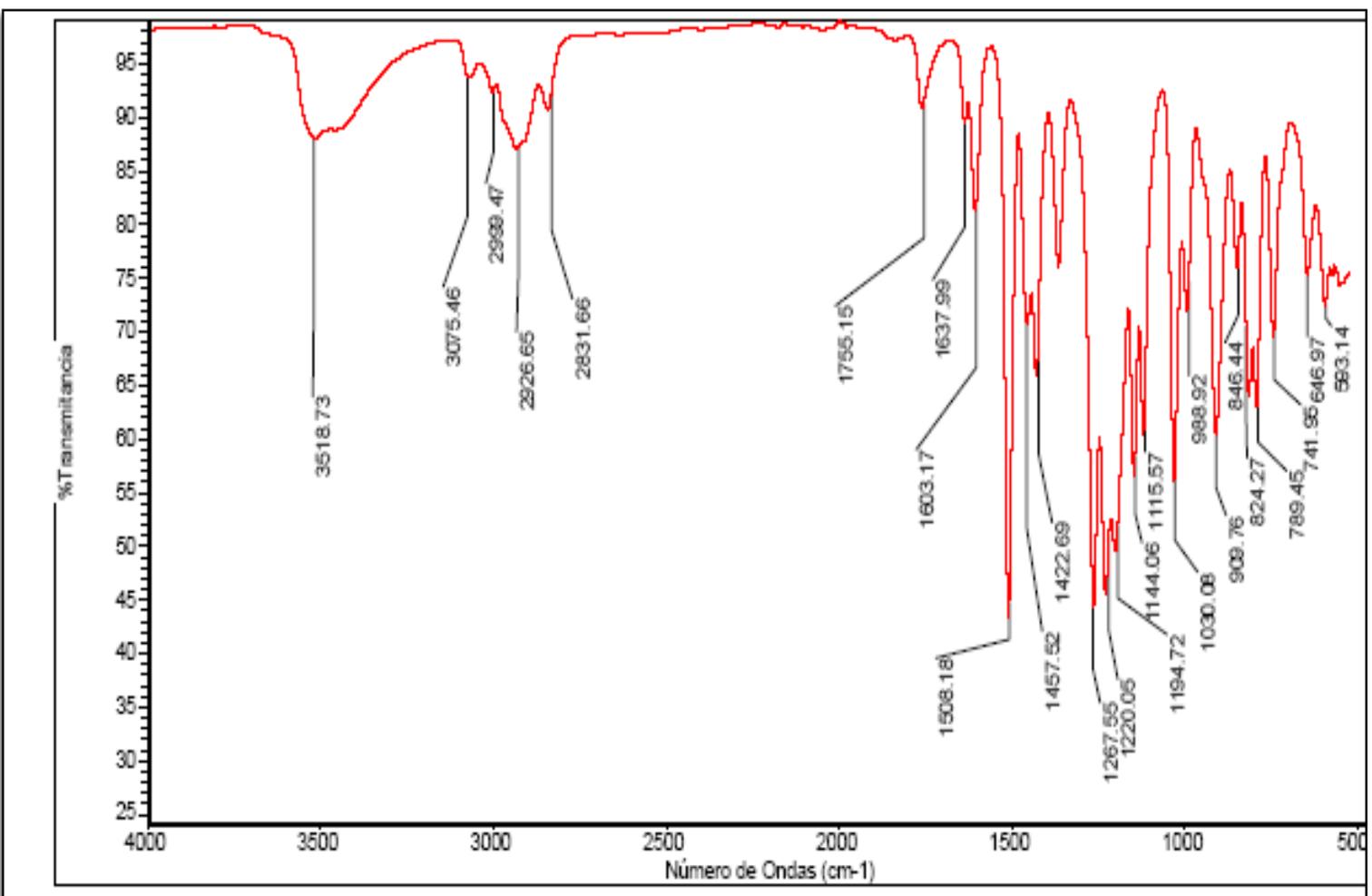


Figura 17. Espectro de IR del AEC.

5.2.2.3.3 Espectro de infrarrojo del aceite esencial de epazote (AEE)

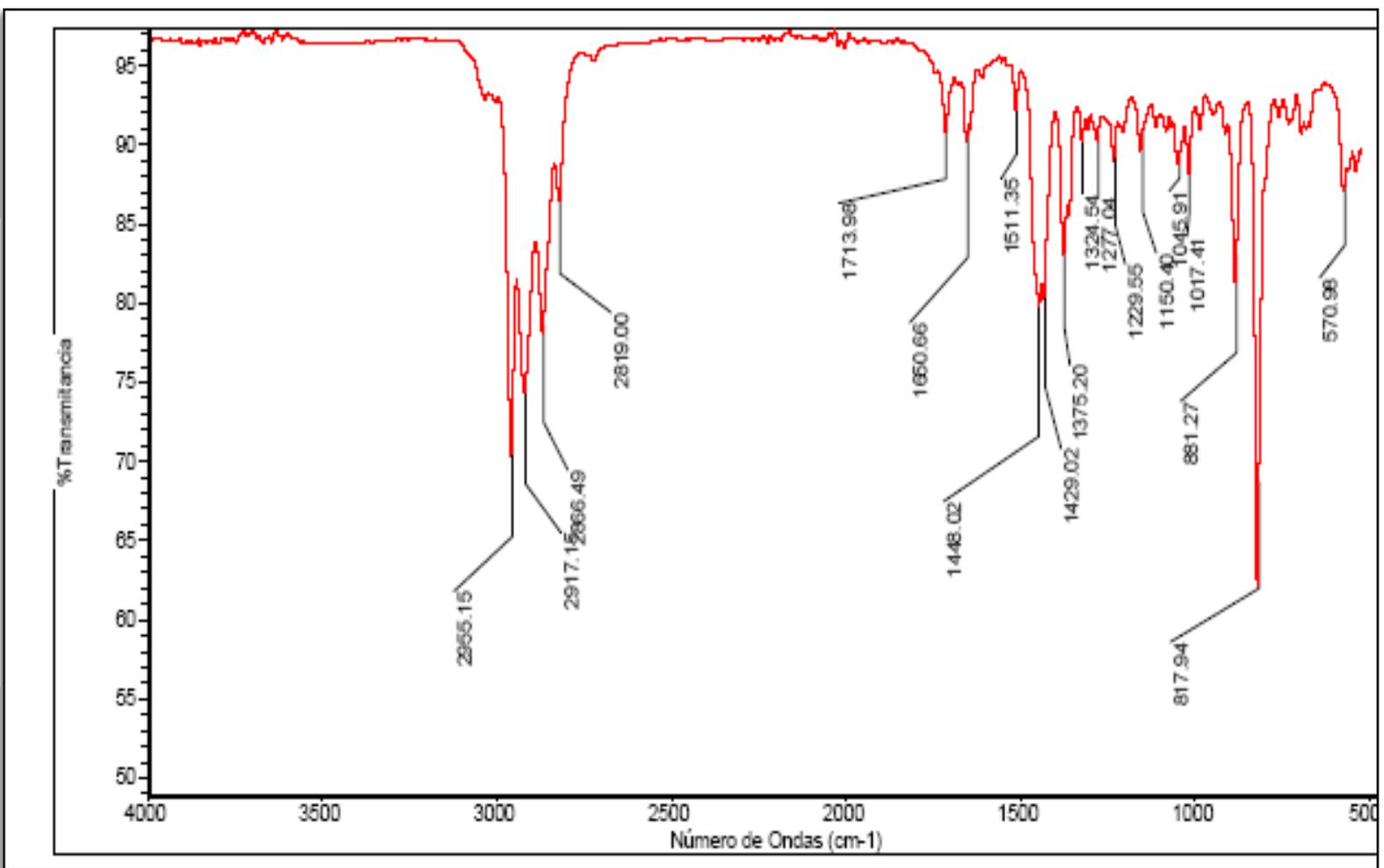


Figura 18. Espectro de IR del AEE.

5.2.2.3.4 Espectro de infrarrojo del aceite esencial de laurel (AEL)

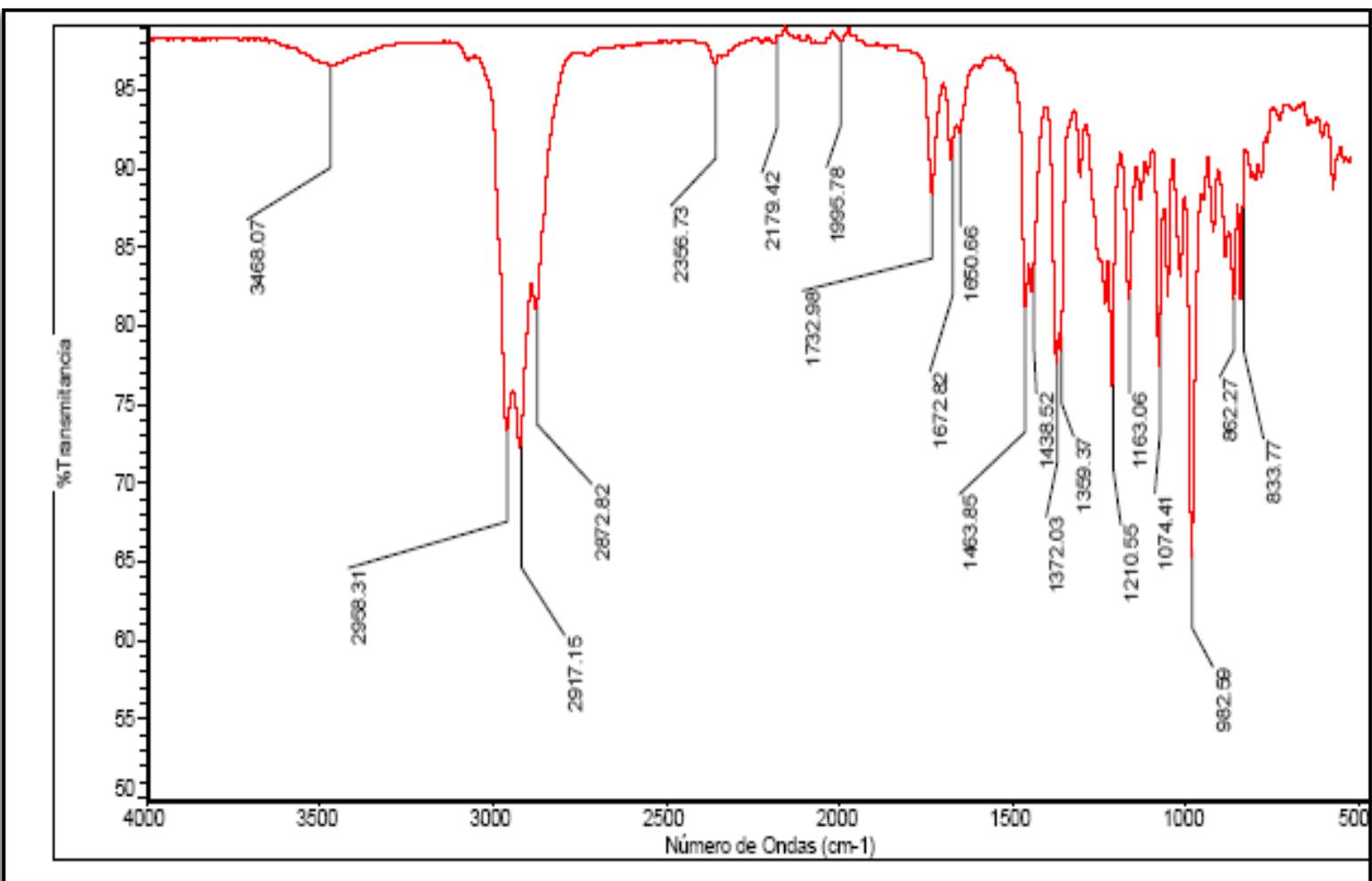


Figura 19. Espectro de IR del AEL.

5.2.2.3.4.1 Espectro infrarrojo del aceite esencial de orégano (AEO)

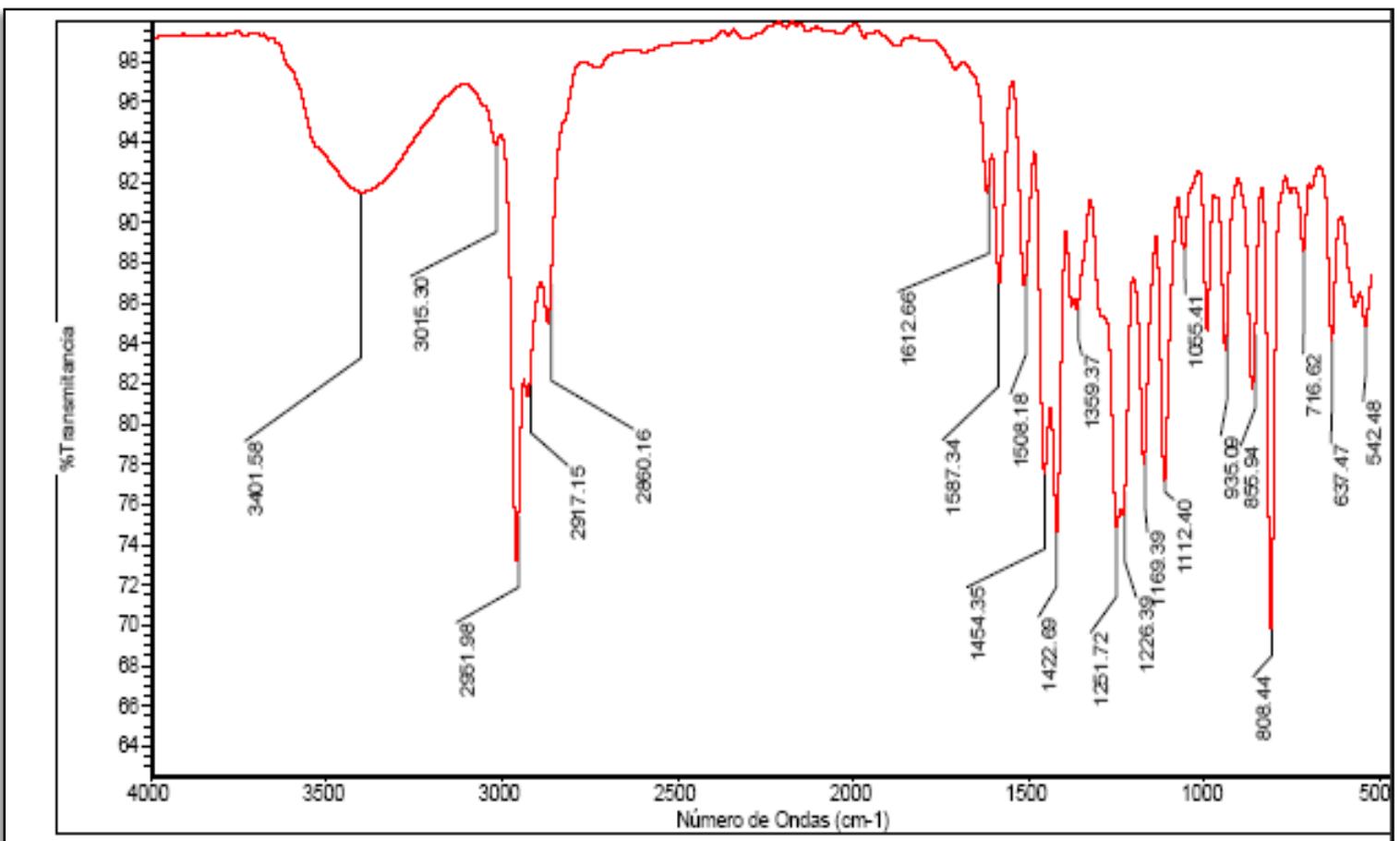


Figura 20. Espectro de IR del AEO.

5.2.2.3.5 Espectro de infrarrojo del aceite esencial de romero (AER)

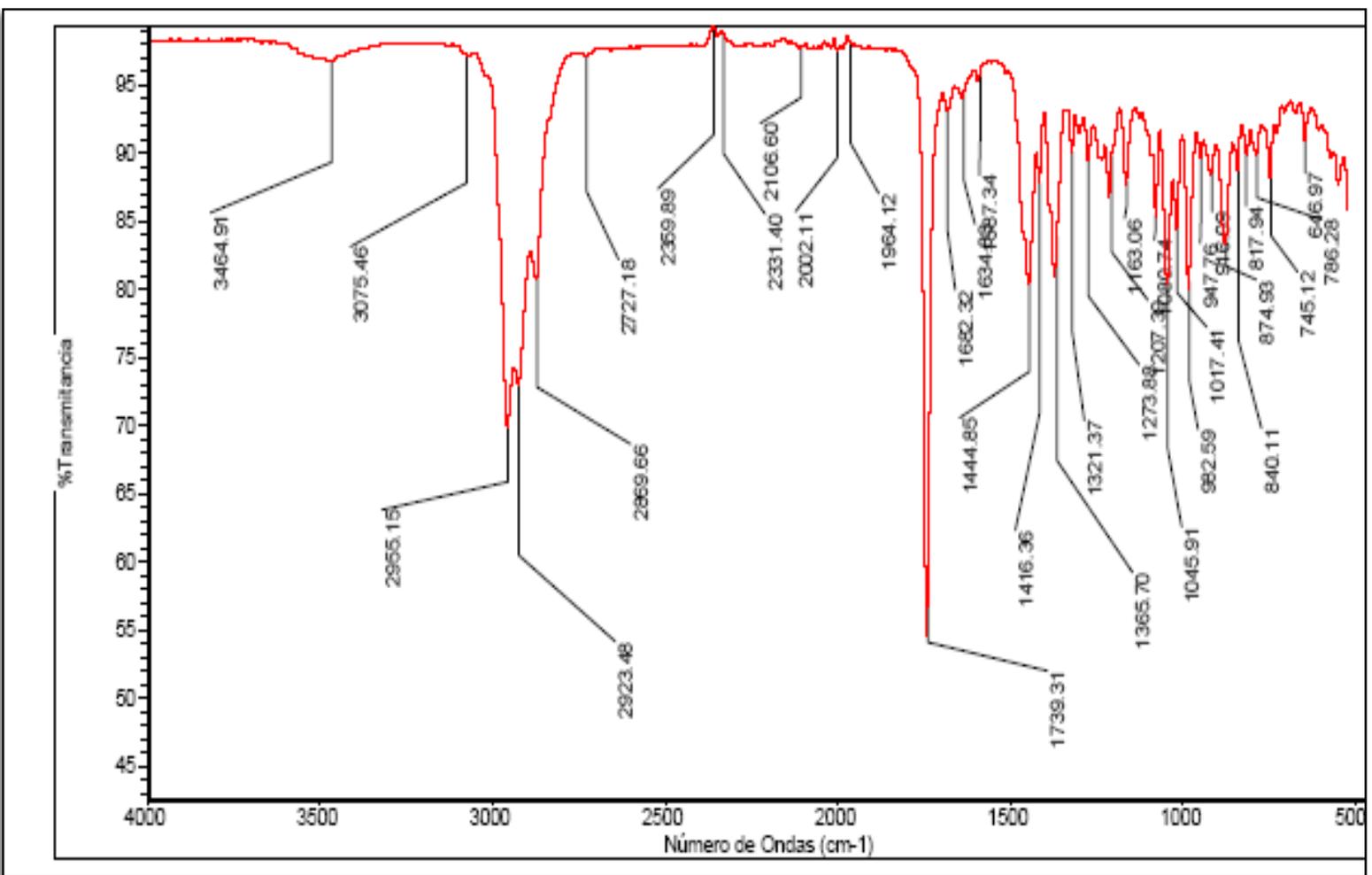


Figura 21. Espectro de IR del AER.

5.3 Bioensayo

5.3.1 Selección del coadyuvante de solubilidad

La solubilidad de los aceites en agua, es un factor muy importante a considerar en el bioensayo; para lograr una fase homogénea se utilizó tween 80 como coadyuvante de solubilidad a diferentes cantidades, dependiendo del aceite esencial a evaluar. Las cantidades utilizadas se localizan en la tabla 20.

Tabla 20. Cantidad de tween 80 utilizada.

Aceite esencial	µL de tween 80 utilizada	% de tween 80
Clavo	200	0.036
Epazote	200	0.040
Laurel	350	0.063
Orégano	200	0.036
Romero	350	0.070

5.3.2 Evaluación de toxicidad

Para la evaluación se contó el número de *Artemias* muertas de cada aceite, en las tablas 21, 22, 23, 24 y 25 se muestran los resultados obtenidos del bioensayo de letalidad.

Tabla 21. Resultados del bioensayo de letalidad de *Artemia*, utilizando AEC.

Dosis (ppm)	Número de sujetos ¹² por ensayo	Número de sujetos muertos				Total de sujetos muertos
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	
1	10	0	0	0	0	0
10	10	0	0	0	0	0
20	10	0	0	2	3	5
30	10	5	3	3	3	14
40	10	6	5	5	5	21
50	10	6	6	5	7	24
60	10	6	6	6	7	25
70	10	7	6	6	7	26
80	10	7	7	6	7	27
90	10	7	7	7	8	29
100	10	7	7	7	10	31
Control (+)	10	10	10	10	10	40
Control (-)	10	0	0	0	0	0

¹² Sujetos= número de *Artemias* muertas

Tabla 22. Resultados del bioensayo de letalidad de Artemia, utilizando AEE.

Dosis (ppm)	Número de sujetos por ensayo	Número de sujetos muertos por ensayo				Total de sujetos muertos
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	
1	10	0	0	0	0	0
10	10	0	0	0	0	0
20	10	0	0	0	0	0
30	10	0	0	0	0	0
40	10	2	3	0	2	7
50	10	4	0	2	3	9
60	10	3	1	3	3	10
70	10	3	3	7	4	17
80	10	6	5	6	5	22
90	10	5	6	4	8	23
100	10	8	7	8	5	28
Control (+)	10	10	10	10	10	40
Control (-)	10	0	0	0	0	0

Tabla 23. Resultados del bioensayo de letalidad de Artemia, utilizando AEL.

Dosis (ppm)	Número de sujetos por ensayo	Número de sujetos muertas				Total de sujetos muertos
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	
32	10	0	0	0	0	0
64	10	0	0	0	0	0
128	10	2	0	0	3	5
192	10	2	2	1	1	6
256	10	1	1	4	5	11
320	10	2	5	3	2	12
384	10	6	7	7	5	25
448	10	9	9	4	10	32
512	10	9	9	8	8	34
576	10	10	10	10	10	40
640	10	10	10	10	10	40
Control (+)	10	10	10	10	10	40
Control (-)	10	0	0	0	0	0

Tabla 24. Resultados del bioensayo de letalidad de Artemia, utilizando AEO.

Dosis (ppm)	Número de sujetos por ensayo	Número de sujetos muertas				Total de sujetos muertos
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	
1	10	0	0	0	0	0
10	10	0	0	0	0	0
20	10	2	0	0	1	3
30	10	7	8	4	0	19
40	10	8	10	6	0	24
50	10	10	10	7	7	34
60	10	10	10	7	8	35
70	10	10	10	10	10	40
80	10	10	10	10	10	40
90	10	10	10	10	10	40
100	10	10	10	10	10	40
Control (+)	10	10	10	10	10	40
Control (-)	10	0	0	0	0	0

Tabla 25. Resultados del bioensayo de letalidad de Artemia, utilizando AER.

Dosis (ppm)	Número de sujetos por ensayo	Número de sujetos muertas				Total de sujetos muertos
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	
60	10	0	0	0	0	0
70	10	1	0	0	1	2
80	10	0	1	1	1	3
90	10	1	2	2	1	6
100	10	2	2	2	3	9
124	10	4	3	3	0	10
144	10	3	5	5	0	13
165	10	2	9	5	5	21
186	10	4	8	5	6	23
206	10	6	7	7	8	28
260	10	10	10	10	10	40
Control (+)	10	10	10	10	10	40
Control (-)	10	0	0	0	0	0

5.3.2.1 Análisis estadístico

5.3.2.1.1 Determinación de CL₅₀

Los resultados del análisis estadístico realizado con el programa IBM SPSS Statistics 20 se encuentran en el anexo G. En la tabla 26 se aprecian los resultados de la determinación de CL₅₀ y los criterios de letalidad según (Sanabria & Sandra, 1997).

Tabla 26. Determinación de CL₅₀.

Aceites esenciales evaluados	CL ₅₀ (ppm)	Criterios de letalidad
Clavo	47.387	Letalidad elevada
Epazote	77.508	Letalidad elevada
Laurel	345.942	Letalidad baja
Orégano	33.704	Letalidad elevada
Romero	157.120	Letalidad moderada

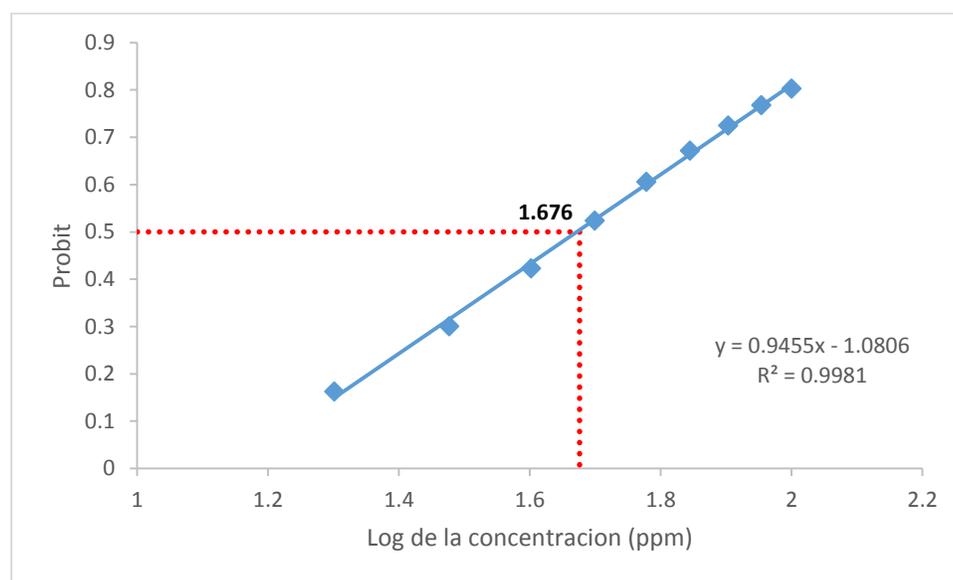
Tabla 27. Criterios de letalidad.

Criterios de letalidad (Sanabria & Sandra, 1997)	
Letalidad elevada	0.1-100 ppm
Letalidad moderada	100-300 ppm
Letalidad baja	300-600 ppm
Letalidad mínima	> 640 ppm

5.3.2.1.2 Respuestas transformadas por probit

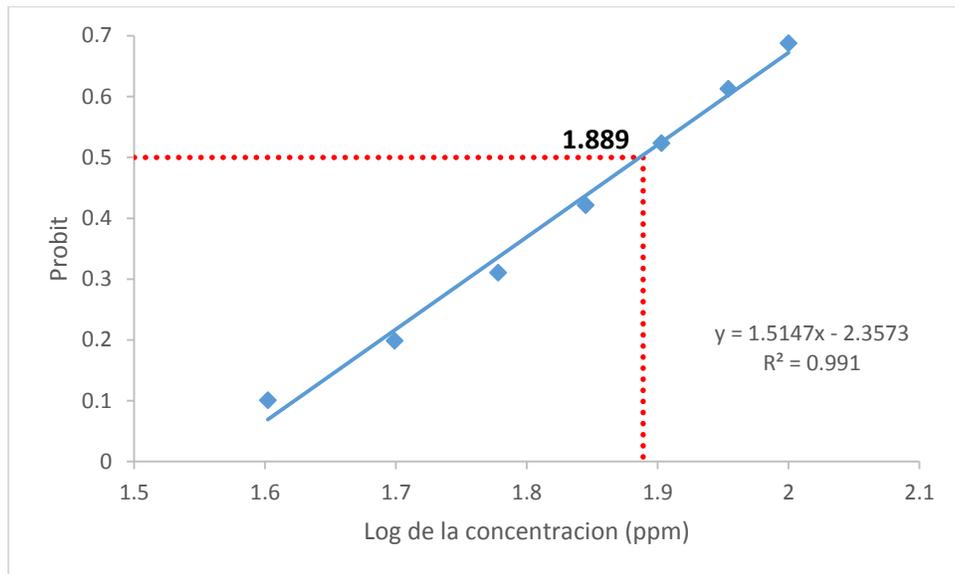
En las gráficas siguientes se observan las repuestas obtenidas por un análisis probit.

5.3.2.1.3 Clavo



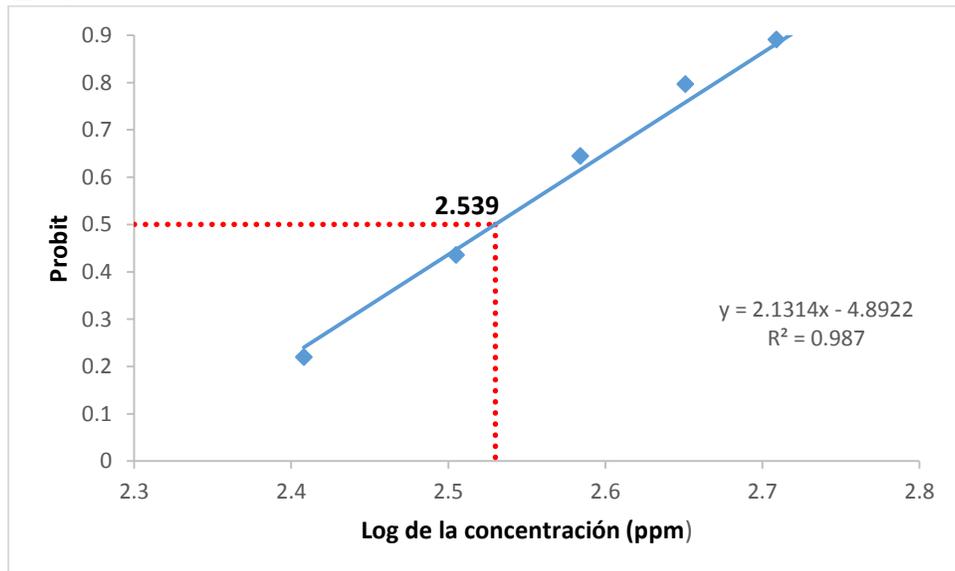
Gráfica 1. Resultados del análisis probit para AEC.

5.3.2.2 Epazote



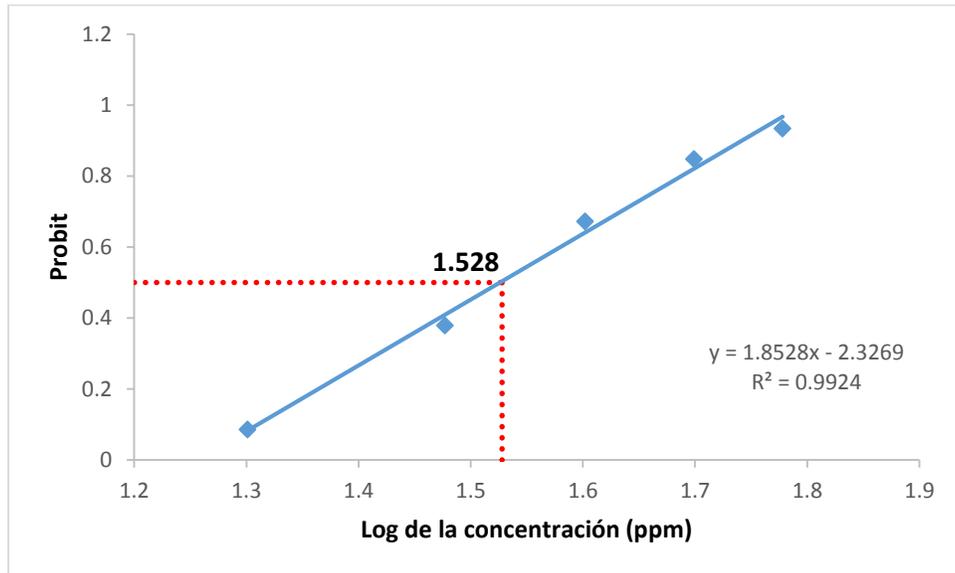
Gráfica 2. Resultados del análisis probit para AEE

5.3.2.3 Laurel



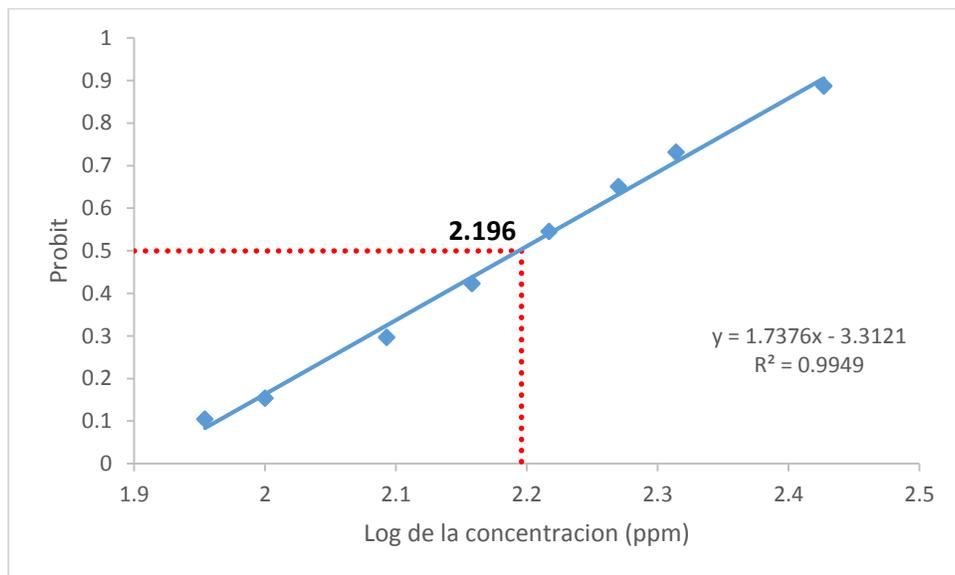
Gráfica 3. Resultados del análisis probit para AEL

5.3.2.4 Orégano



Gráfica 4. Resultados del análisis probit para AEO

5.3.2.5 Romero

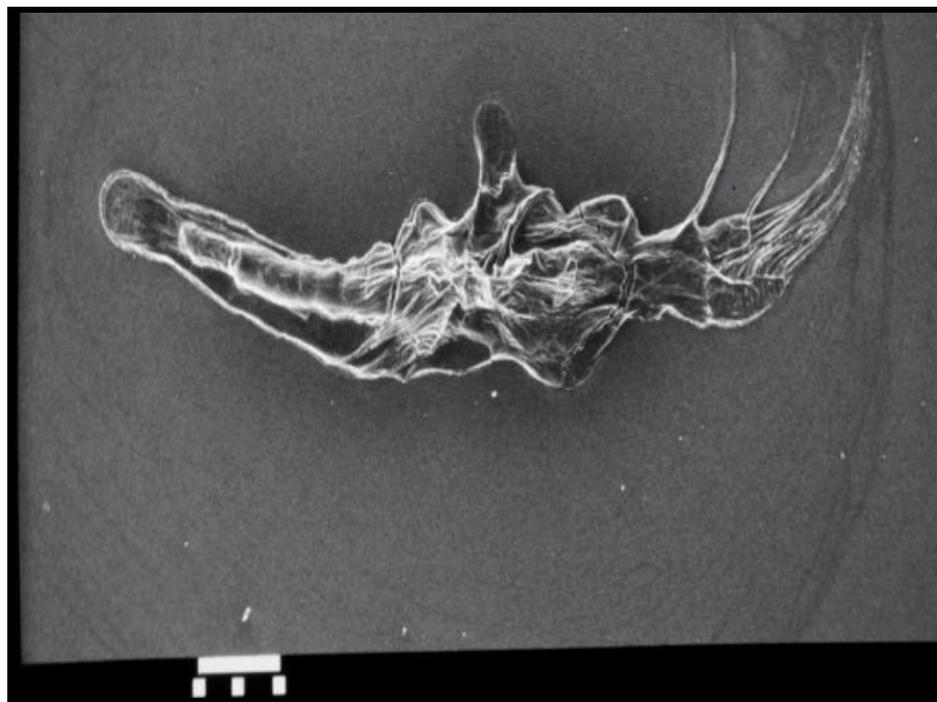


Gráfica 5. Resultados del análisis probit para AER

5.4 Estudio gráfico de evaluación de toxicidad

Para deducir las posibles causas de muerte de los nauplis de *Artemia franciscana*, se tomaron fotografías utilizando un microscopio óptico (teñidas con Safranina O y sin teñir); y se tomaron una serie de micrografías¹³ por microscopia electrónica de barrido a las Artemias tratadas y a los controles positivo (K_2CrO_7 500ppm) y negativo (agua de mar y tween 80). Fotografías (teñidas y sin teñir) y micrografías de los grupos control negativo y positivo

5.4.1.1 Micrografía del control negativo



Micrografía 1. Por MEB (150x) del nauplio de *A. franciscana* control negativo, después de 24 h de exposición.

¹³ Las micrografías que se presentan en este capítulo fueron tomadas en el laboratorio de Microscopia Electrónica de la FES Cuautitlán Campo1, por el Técnico Académico Rodolfo Robles Gómez (2013).

5.4.1.2 Fotografía del control negativo sin tinción



Fotografía 13. Naupli de *A. franciscana* control negativo, después de 24 h de exposición.

5.4.1.3 Fotografía del control negativo con tinción



Fotografía 14. Naupli de *A. franciscana* control negativo, después de 24 h de exposición, teñido con Safranina O.

5.4.1.4 Micrografía del control positivo



Micrografía 2. Por MEB (150x) del nauplio de *A. franciscana* control positivo, (K₂Cr₂O₇ 500 pm) después de 24 h de exposición.

5.4.1.5 Fotografía del control positivo sin tinción



Fotografía 15. Naupli de *A. franciscana* control positivo, (K₂CrO₇ 500 ppm), después de 24 h de exposición.

5.4.1.6 Fotografía del control positivo con tinción



Fotografía 16. Naupli de *A. franciscana* control positivo (K_2CrO_7 500 ppm), después de 24 h de exposición, teñido con Safranina O.

5.4.2 Fotografías (teñidas y sin teñir) y micrografías de los nauplis tratados con los AE

5.4.2.1 Fotografías y micrografías de los nauplis tratados con AEC

5.4.2.1.1 Fotografía de un naupli tratado con AEC sin tinción



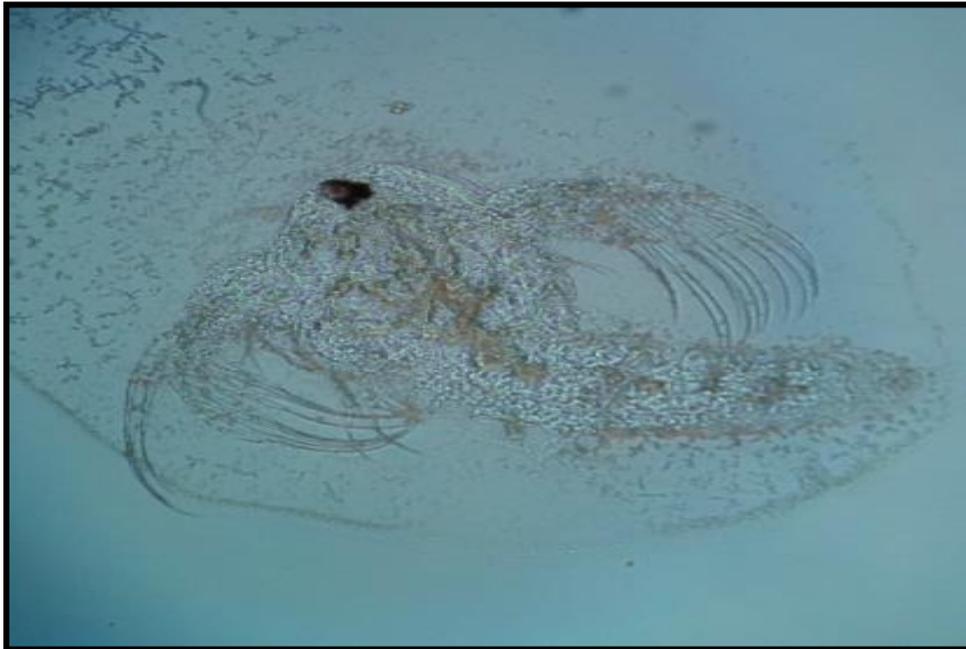
Fotografía 17. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 100 ppm, después de 24 h de exposición.

5.4.2.1.2 Fotografía de un naupli tratado con AEC con tinción



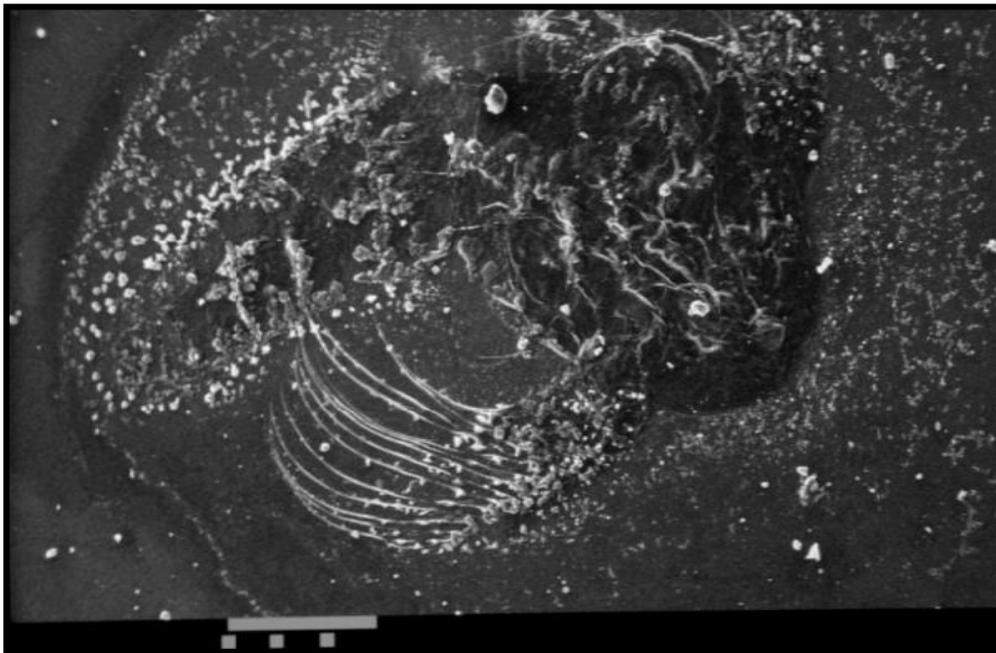
Fotografía 18. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 100 ppm, después de 24 h de exposición, teñido con Safranina O.

5.4.2.1.3 Fotografía de un naupli tratado con AEC sin tinción previo a su observación en MEB



Fotografía 19. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 100 ppm, después de 24 h de exposición.

5.4.2.1.4 Micrografía de un naupli tratado con AEC sin tinción por MEB



Micrografía 3. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 100 ppm, después de 24 h de exposición a 100x.

5.4.2.2 *Fotografías y micrografías de los nauplis tratados con AEE*

5.4.2.2.1 *Fotografía de un naupli tratado con AEE sin tinción*



Fotografía 20. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 100 ppm, después de 24 h de exposición.

5.4.2.2.2 *Fotografía de un naupli tratado con AEE con tinción*



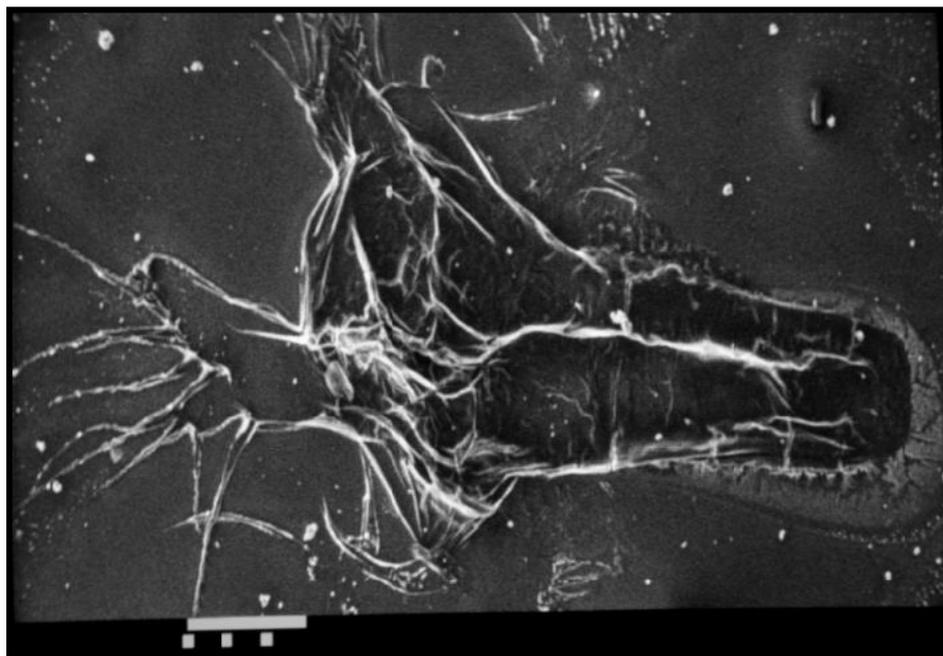
Fotografía 21. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 100 ppm, después de 24 h de exposición, teñido con Safranina O.

5.4.2.2.3 Fotografía de un naupli tratado con AEE sin tinción previo a su observación en MEB



Fotografía 22. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 100 ppm, después de 24 h de exposición.

5.4.2.2.4 Micrografía de un naupli tratado con AEE sin tinción por MEB



Micrografía 4. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 100 ppm, después de 24 h de exposición a 100x.

5.4.2.3 Fotografías y micrografías de los nauplis tratados con AEL

5.4.2.3.1 Fotografía de un naupli tratado con AEL sin tinción



Fotografía 23. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 640 ppm, después de 24 h de exposición.

5.4.2.3.2 Fotografía de un naupli tratado con AEL con tinción



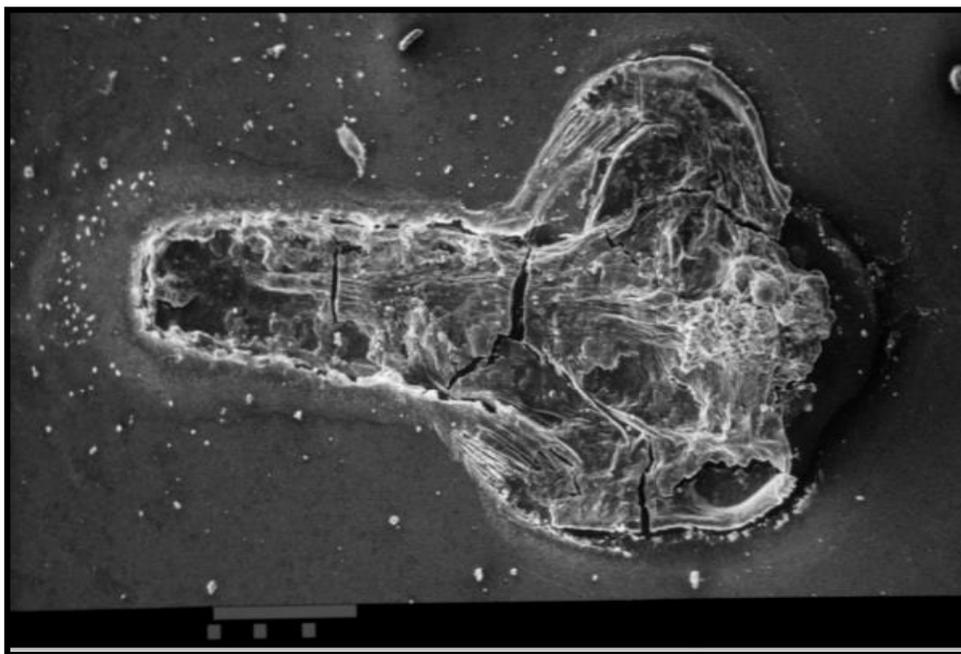
Fotografía 24. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 640 ppm, después de 24 h de exposición, teñido con Safranina O.

5.4.2.3.3 Fotografía de un naupli tratado con AEL sin tinción previo a su observación en MEB



Fotografía 25. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 640 ppm, después de 24 h de exposición.

5.4.2.3.4 Micrografía de un naupli tratado con AEL sin tinción por MEB



Micrografía 5. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 640 ppm, después de 24 h de exposición a 100x.

5.4.2.4 Fotografías y micrografías de los nauplis tratados con AEO

5.4.2.4.1 Fotografía de un naupli tratado con AEO sin tinción



Fotografía 26. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 100 ppm, después de 24 h de exposición.

5.4.2.4.2 Fotografía de un naupli tratado con AEO con tinción



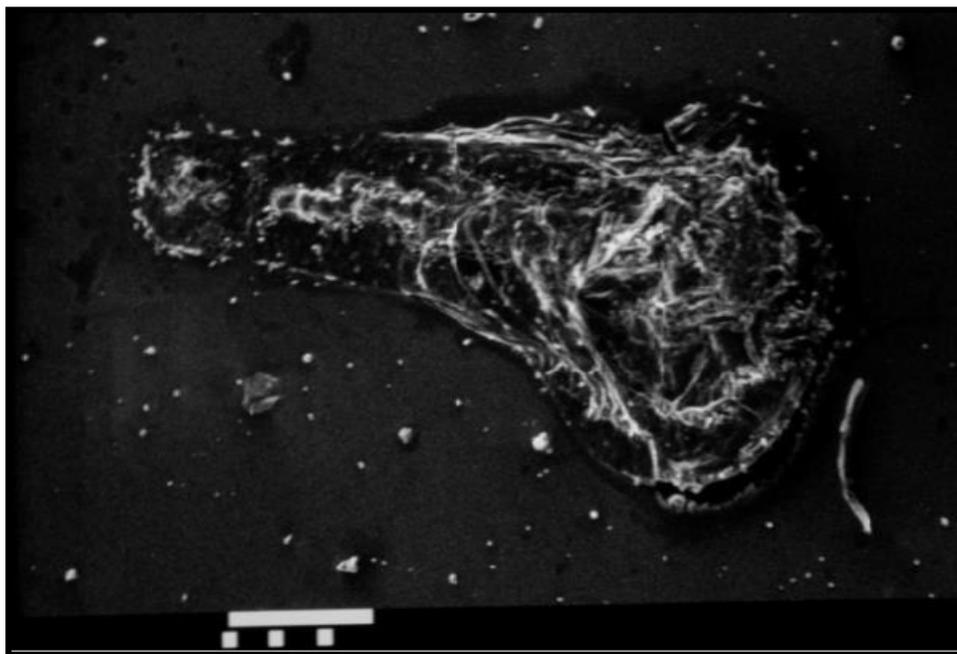
Fotografía 27. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 100 ppm, después de 24 h de exposición, teñido con Safranina O.

5.4.2.4.3 Fotografía de un naupli tratado con AEO sin tinción previo a su observación en MEB



Fotografía 28. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 100 ppm, después de 24 h de exposición.

5.4.2.4.4 Micrografía de un naupli tratado con AEO sin tinción por MEB



Micrografía 6. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 100 ppm, después de 24 h de exposición a 100x.

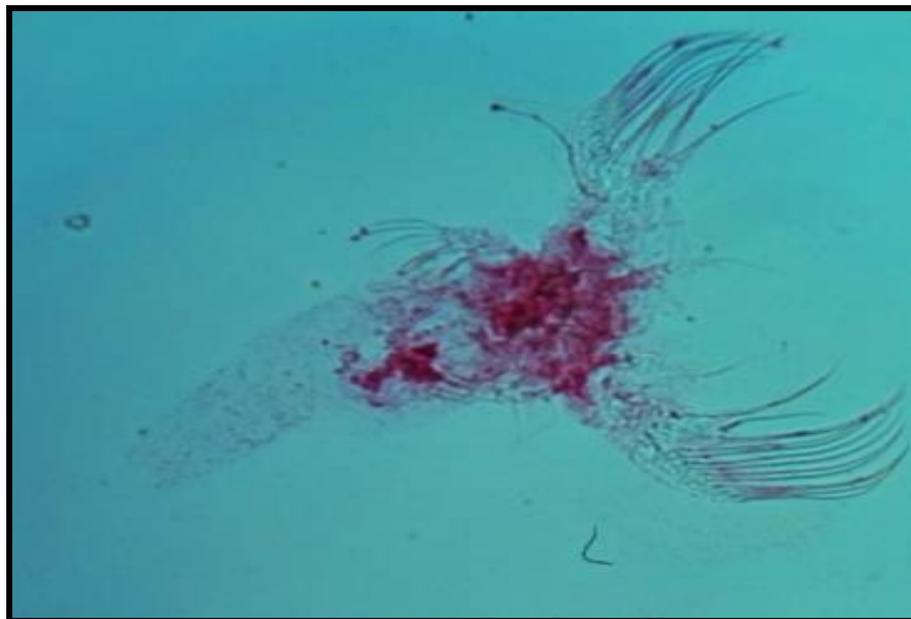
5.4.2.5 Fotografías y micrografías de los nauplis tratados con AER

5.4.2.5.1 Fotografía de un naupli tratado con AER sin tinción



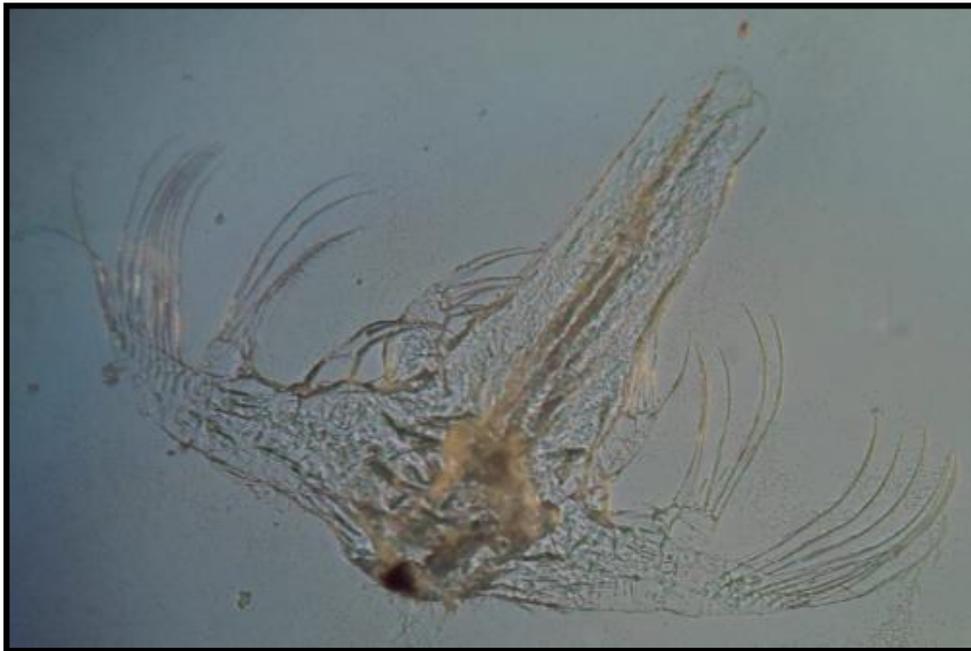
Fotografía 29. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 260 ppm, después de 24 h de exposición.

5.4.2.5.2 Fotografía de un naupli tratado con AER con tinción



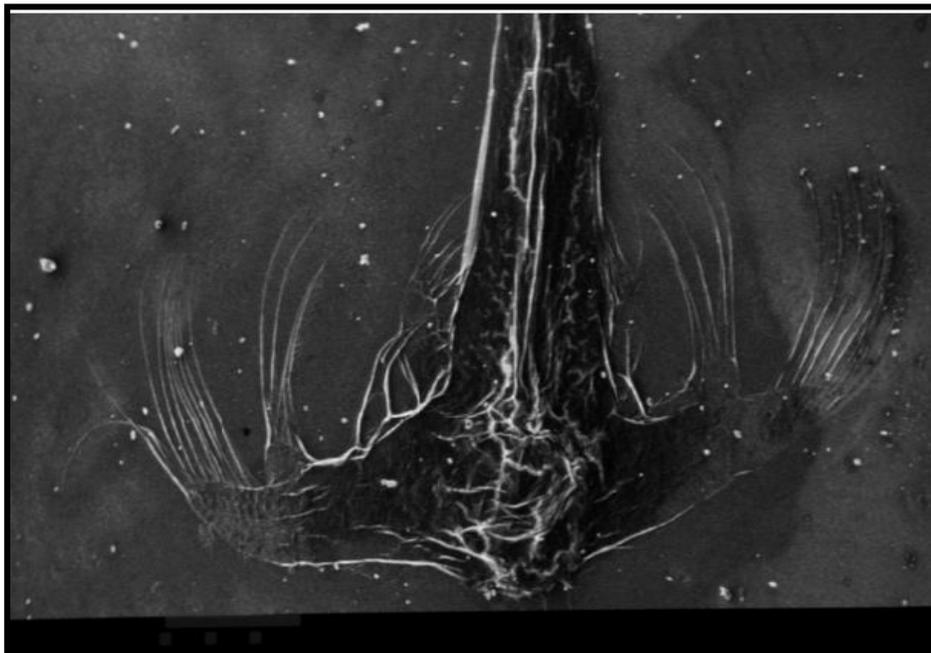
Fotografía 30. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 260 ppm, después de 24 h de exposición, teñido con Safranina O.

5.4.2.5.3 Fotografía de un naupli tratado con AER sin tinción previo a su observación en MEB



Fotografía 31. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 260 ppm, después de 24 h de exposición.

5.4.2.5.4 Micrografía de un naupli tratado con AER sin tinción por MEB



Micrografía 7. Naupli de *A. franciscana* a la concentración de 260 ppm, después de 24 h de exposición a 100x.

6 Discusión

6.1 Eclosión de Artemia

Humedad: Vinatea (1997) reporta que para que la viabilidad de los quistes no se vea afectada debe mantenerse en un porcentaje menor a 10%; al exceder este valor, los quistes inician su actividad metabólica y por tanto disminuyen su posibilidad de eclosionar y de vivir. Como se puede observar en la tabla 12 el porcentaje de humedad que tuvieron los quistes utilizados fue de 5.77%, por lo tanto son viables.

Color: Los quistes poseen una capa externa dura (corión) formada de lipoproteínas impregnadas de quitina y hematina, la concentración de ésta última varía el color de marrón pálido a marrón oscuro. La principal función del corion es de proporcionar una protección adecuada al embrión contra rupturas mecánicas y radiaciones. Cuando los quistes se hidratan cambian de color anaranjado que al verlo al microscopio se ve transparente.

Con el objeto de tener un parámetro de comparación se determina el color utilizando las tablas Munsell dando por resultado un color marrón (818,5) (fotografía 32).



*Fotografía 32. Quistes hidratados de Artemia.
Fotografía tomada en el laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica (L-324) de la
FES- Cuautitlán Campo 1; por Alejandra Sánchez (2013).*

Tamaño de quistes: Uno de los criterios para evaluar la calidad de los quistes es el tamaño. La talla es indicativa de quistes saludables (para alimentación de peces son los que tienen mayor valor nutricional), éste varía de 200-300 micras de diámetro (Devnull, 2007-2008). El intervalo de los quistes utilizados en el ensayo es de $230.7 \pm 10 \mu\text{m}$, valor que se encuentra en especificaciones.

Porcentaje de eclosión: Este parámetro es indicativo nuevamente de la calidad y viabilidad de los quistes; a mayor porcentaje mayor calidad y viceversa. Sato, Mallo y Fenucci (2004) consideran que un valor arriba del 80% es adecuado. El valor experimental obtenido fue de 82.96 por lo que los quistes son de buena calidad.

Eficiencia de eclosión: Es el número de nauplios que nacen de un gramo de quistes comercializado, bajo condiciones estándares. Castro et al (1997) reporta un porcentaje de eclosión de 25.75 como bajo y 89.3 como bueno, mientras que la eficiencia la reporta entre 67,879 org/g y 235,500 org/g. Tomando estos rangos, el valor obtenido es de 189,589 org/g,

valor que se encuentra cercano al cercano al límite superior, por lo que se concluye que los quistes utilizados en el ensayo son de buena calidad.

Tamaño de los nauplios: La talla de los nauplios de *A. franciscana* es pequeña, el rango es de 550 µm a 0.6 mm (Valenzuela, 2013). El valor obtenido fue de 743.7 µm, lo que corresponde a un nauplio en fase II. Durante el ensayo se seleccionaron las artemias que corresponden a esa fase.

Ciclo de vida de Artemia: Para observar, documentar el desarrollo e identificar cada una de las etapas de desarrollo se tomaron una serie de fotografías; esto facilitó la selección de los sujetos de prueba (serie fotográfica 1 y 2).

6.2 Obtención de los aceites esenciales

6.2.1 Materia prima

6.2.1.1 Identificación de las plantas utilizadas

Esta etapa de identificación de la planta es muy importante, ya que el contar con un ejemplar de herbario, provee el material comparativo que es fundamental para descubrir o confirmar la identidad de una especie, son una fuente de información acerca de las plantas y del medio en el que habitan y suponen en sí mismos un registro permanente de la biodiversidad.

El herbario Etnobotánico de Iztacala facilitó los nombres científicos de cada una de las especies utilizadas: *Syzygium aromaticum*, *Lippia graveolens*, *Litsea glaucencen*, *Rosmarinus officinalis* y *Teloxys ambrosioides*, estos nombres se convierten en una referencia importante en la realización del presente trabajo y además sirven para dar la correcta identidad del material vegetal utilizado.

6.2.1.2 Materia extraña

Respecto a la materia extraña encontrada en las plantas utilizadas, solo se encontró polvo, tierra y en el caso del epazote pasto; pero en mínimas cantidades. Para el ensayo se retiró todo el material que no correspondiera a las características del material vegetal.

6.2.1.3 Descripción macroscópica¹⁴

6.2.1.3.1 Clavo

Como se puede apreciar en la fotografía 9, la parte utilizada de la planta es el clavo que es un botón floral. Se puede observar sus cuatro pétalos rosas y varios pistilos amarillos. También se puede observar el parecido que tienen las yemas florales de esta planta con un clavo oxidado.

¹⁴ La descripción macroscópica se realizó en base a lo observado y a las características mencionadas en el marco teórico para cada planta.

6.2.1.3.2 Epazote

La parte utilizada del epazote fueron las hojas y como se puede apreciar en la fotografía 8 es larga irregularmente dentada, con forma de espada de color verde. Todo el material vegetal cumple con estas características.

6.2.1.3.3 Laurel

En el caso del laurel la parte utilizada fue la hoja. Como se puede distinguir en la fotografía 11 la hoja de laurel tiene una forma elíptica, una base atenuada con un ápice gradualmente acuminado. Características que cumple todo el material vegetal utilizado.

6.2.1.3.4 Orégano

Parte utilizada: las hojas y flores. Como puede advertir, las hojas de orégano como se ven en la fotografía 10 son opuestas ovales y anchas, con bordes ligeramente dentados con el haz denso, el envés es glandular y densamente tomentoso con ligeras vellosidades. Las flores son diminutas de color blanco, están protegidas por diminutas hojillas de color rojizo. Características que cumple el material vegetal utilizado.

6.2.1.3.5 Romero

Parte utilizada: las hojas y flores. En la fotografía 12 se observa las hojas características del romero, opuestas, gruesas y algo coriáceas, sésiles, lineares y obtusas, de borde doblado; de color verde por arriba y blanquizco por debajo. Las flores son labiadas de color lila. Características que cumple el material vegetal utilizado.

6.2.1.4 Extracción

El método que se utilizó en este proyecto es la hidrodestilación, con las modificaciones pertinentes por la diferencia de densidad de los aceites obtenidos. Trampa de Clevenger para aceites menos densos que el agua y trampa de Dean Stark para aceites más densos que el agua.

6.2.1.5 Rendimiento

Como se puede observar en la tabla 17 para los aceites de clavo, romero y epazote; el porcentaje de rendimiento de los aceites esenciales obtenidos es más bajo que el reportado en la literatura, las causas pueden ser: Variación estacional, en el caso del clavo la técnica de hidrodestilación utilizando la trampa de Dean-Stark no es la adecuada (mejor destilación por arrastre de vapor), la materia vegetal adquirida en el mercado haya tenido un tiempo de anaquel muy grande y que la materia vegetal se debió trabajar en fresco y no en seco como se trabajó. En el caso del laurel el rendimiento se encuentra en el rango reportado.

Orégano, en caso contrario, el rendimiento que se obtuvo es más alto que el reportado, debido a que la materia vegetal se encuentra en la temporada de mayor producción de aceite.

En todos los casos, los rendimientos reportados en la literatura corresponden al método por arrastre de vapor, entonces en todos los casos esa es la principal variación en los rendimientos.

6.2.2 Control de calidad a los aceites esenciales

6.2.2.1 Propiedades sensoriales de olor, aspecto y color

Las propiedades sensoriales de los aceites esenciales se determinaron de la siguiente forma:

Color: Comparación visual con las cartas Munsell (anexo C); se utilizaron estas cartas con el fin de tener un punto de comparación y disminuir la subjetividad. Esta es una propuesta para estandarizar el color.

Olor: Se utilizó como base a clasificación de los descriptores de vinos con el fin de tener una referencia y reducir la subjetividad. Esta es una propuesta para definir el olor de cada aceite.

6.2.2.2 Determinaciones fisicoquímicas

6.2.2.2.1 Densidad

La densidad se calculó de acuerdo con la ecuación que se encuentra en el anexo B.

En la tabla 19 se encuentran los valores obtenidos para cada uno de los aceites esenciales. Donde se puede apreciar que las densidades del orégano, epazote romero y laurel son inferiores a la del agua; todo lo contrario a la densidad del aceite esencial del clavo que es superior a 1 característica de este aceite esencial. De acuerdo con los datos teóricos como se puede ver en la tabla 19 los valores de densidad experimentales no coinciden; pero cabe señalar que la mayoría se acerca al valor encontrado en la literatura; el que no coincidan se puede deber a la época del año en que se recolectó la planta, el lugar de origen, al analista y a que como se mencionó en la metodología para determinar la densidad no se ocupó un picnómetro si no un matraz aforado de 1mL.

6.2.2.2.2 Índice de refracción

La determinación del índice de refracción de los aceites esenciales, se realizó con base en la metodología descrita. Tomando en cuenta que el índice de refracción, es utilizado como una prueba para el control de impurezas y calidad de aceites puros, tanto a nivel laboratorio como a nivel industrial; por ello la importancia de realizar esta prueba. En la tabla 19 se presentan los valores registrados del índice de refracción de los aceites esenciales evaluados donde se puede apreciar que los valores registrados son altos, característicos de los aceites esenciales. Además se puede mencionar que con respecto a los datos teóricos los valores obtenidos están dentro de especificación, exceptuando al AEL; generalmente los datos de índice de refracción y de densidad están reportados por rangos para el AEL no hay reportado en la literatura un rango.

6.2.2.3 Interpretación de los espectros de infrarrojo

En las siguientes tablas (27-31) se presentan las principales frecuencias identificadas correspondientes a los grupos funcionales de los compuestos químicos que conforman cada aceite esencial.

Cabe mencionar que los grupos funcionales identificados en cada espectro coincidieron con los grupos funcionales presentes de los componentes mayoritarios de cada aceite.

6.2.2.3.1 Aceite esencial de clavo (AEC)

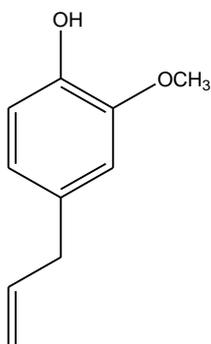


Figura 22. Eugenol.

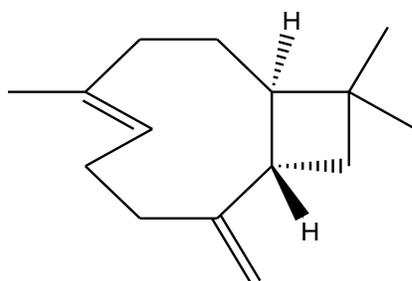


Figura 23. β -cariofileno.

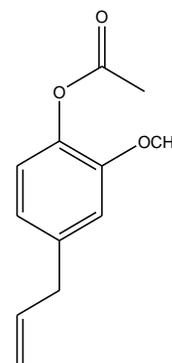


Figura 24. Acetato de Eugenilo.

Tabla 28. Frecuencias identificadas en espectrofotometría IR del AEC

Grupo funcional	Intervalos de frecuencia teórica cm^{-1}	Frecuencias cm^{-1} del AEC
Alcanos		
C-H _{ST}	3000-2840	2951.98
CH ₃ -O	2850-2815	2831.66
CH ₂ δ	1475-1450	1457.52
CH ₃ γ	1250-800	1220.05
Alquenos		
=CH δ ip	1420-1290	1422.69
=CH δ oop	1005-675	909.75
Aromáticos		
ar C-C	1625-1575	1508.18
ar C-H δ ¹ ip	1250-950	1220.05
ar C-H δ ¹ oop	900-650	909.75
Acetato		
C=O	1790-1650	1755.15
Éteres		
C-O-C	1310-1000	1267 y 1040
Alcoholes		
O-H _{ST}	3650-3200	3518.75
C-O _{ST}	1260-970	1267.55
O-H _{oop}	1540-1200	1457.52

6.2.2.3.2 Aceite esencial de epazote (AEE)

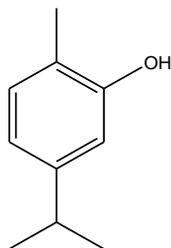


Figura 25. Carvacrol.

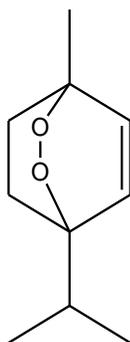


Figura 26. Ascaridol.

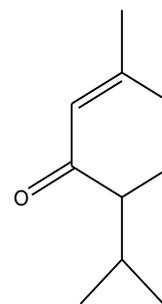


Figura 27. Piperitona.

Tabla 29. Frecuencias identificadas en espectrofotometría IR del AEE

Grupo funcional	Intervalos de frecuencia teórica cm^{-1}	Frecuencias cm^{-1} del AEE
Alcanos		
C-H_{ST}	3000-2840	2955.15
CH₃ γ as	1470-1430	1448
Alquenos		
=C-H_{st}	3040-3010	3020
C=C_{ST}	1690-1635	1660.66
Cetonas		
C=O	1775-1650	1713-1660.66
Peróxidos		
C-O-O st	1200-1000	1443.02-1429.02 ¹⁵
O-O_{ST}	1000-800	817.94

6.2.2.3.3 Aceite esencial de laurel (AEL)



Figura 28. 1,8-Cineol



Figura 29. Sabineno.

¹⁵ Al analizar el espectro IR y comparar con Koutsoupakis et. al., (2002) el ascaridol muestra estas bandas en 1472 y 1450 cm^{-1} . Por lo que se observa una coincidencia, este desplazamiento de bandas pudo ser ocasionado por los otros componentes del aceite esencial.

Tabla 30. Frecuencias identificadas en espectrofotometría IR del AEL

Grupo funcional	Intervalos de frecuencia teórica cm^{-1}	Frecuencias cm^{-1} del AEL
Alcanos		
C-H _{st}	3000-2840	2917.15
CH ₂ δ	1475-1450	1463.85
CH ₃ d	1395-1365	1359.52
Alquenos		
=CH ₂ st	3095-3075	3050
=CH γ oop	1005-675	982.59
C=C	1690-1635	1672.82
Aldehídos		
C=O	1780-1610	1732.98
Éteres		
C-O-C st as	1310-1000	1210.55
C-O _{st}	1260-970	982.59

Cruz, SM (2012) reporta que en el género *Litsea* se identificó p-metoxicinamaldehído, por lo que la banda del grupo carbonilo se puede asignar a este compuesto.

6.2.2.3.4 Aceite esencial de romero (AER)

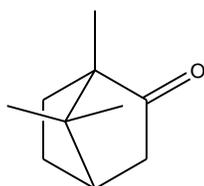


Figura 30. Alcanfor.

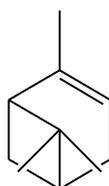


Figura 31. α -pineno.



Figura 32. 1,8-cineol.

Tabla 31. Frecuencias identificadas en espectrofotometría IR del AER

Grupo funcional	Intervalos de frecuencia teórica cm^{-1}	Frecuencias cm^{-1} del AER
Alcanos		
C-H _{st}	3000-2840	2955.15
CH ₂ δ	1475-1450	1444.85
Alquenos		
C-H st	3040-3010	3040
C=C st	1690-1635	1682.32
C=C-H δ oop	1005-675 (Varias bandas)	982.59, 916.09, 745.12
Cetonas		
C=O	1780-1610	1739.31
Éteres		
C-O-C st as	1310-1000	1045.91
C-O st sy	1055-870	982.59

6.2.2.3.5 Aceite esencial de orégano (AEO)

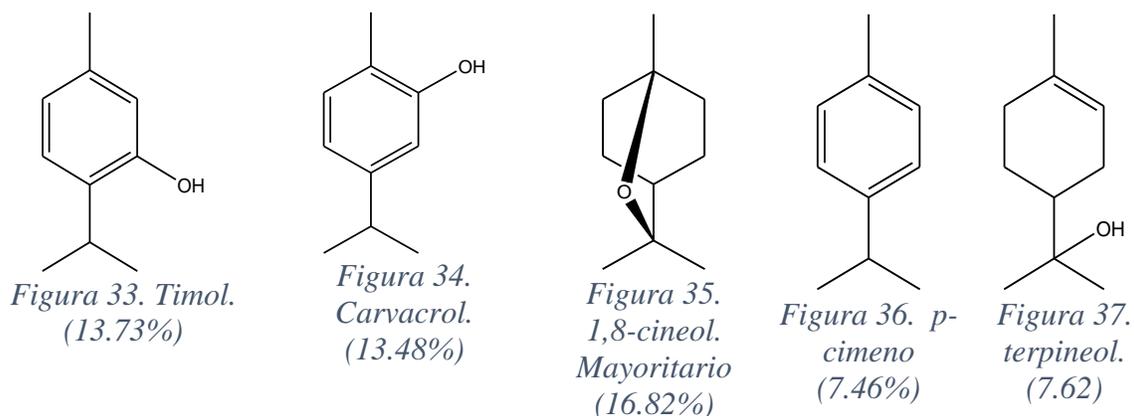


Tabla 32. Frecuencias identificadas en espectrofotometría IR del AEO

Grupo funcional	Intervalos de frecuencia teórica cm^{-1}	Frecuencias cm^{-1} del AEO
Alcanos		
C-H _{st}	3000-2840	2951.98
CH ₂ _δ	1475-1450	1454.35
CH ₃ _γ	1250-800	1251.72
Alquenos		
=CH _{st}	3040-3010	3015-3010
C=C _{st}	1690-1635	
C=C-H _{δ st}	1005-675 varias bandas	
Aromáticos		
arC-H	3080-3030	
ar C-C	1625-1575	1587.34
ar C-H _{δ¹ip}	1250-950	1065.41, 1000
ar C-H _{δ¹oop}	900-650	808.44
Alcohol		
O-H _{st}	3650-3200	3401.58
O-H _{δ ip}	1450-1200	1422.09
C-O _{st}	1260-970	1251.72
Fenoles		
O-H _{st}	3650-3200	3401.58
Ar C-OH _{st}	1275-1150	1226.39
Éteres		
C-O-C _{st as}	1310-1000	1045.91
C-O _{st}	1055-870	935.09

6.3 Actividad biológica

Para la realización de la prueba de la actividad biológica de los aceites esenciales a evaluar se utilizó como agente surfactante tween 80, fue el que cumplió con las características mencionadas en la metodología, en la tabla 20 se presentan los volúmenes y por ciento de tween 80 utilizado para cada uno de los AE.

6.4 Análisis estadístico

En las gráficas 1-5 se observan las respuestas obtenidas por el analisis probit realizado para cada uno de los bioensayos; estas respuestas son lineales en las cuales se puede realizar una interpolación y conocer gráficamente la CL_{50} ; cabe mencionar que se efectuó un análisis probit debido a que el objetivo principal de este análisis determinar la concentración letal media.

6.5 Concentración letal media y estudio gráfico

Los datos correspondientes a la concentración letal media (CL_{50}) de los aceites esenciales (AE) sobre nauplios de *Artemia franciscana* expuestos durante 24 h, son presentados en la Tabla 26. Cabe destacar que el pH de las diferentes soluciones preparadas, incluyendo los controles, no tuvo una variación que pudiera incidir sobre los resultados del estudio (pH con valores entre 7.53 y 7.82), teniendo en cuenta que la *Artemia franciscana* puede desarrollarse perfectamente a un pH entre 7.5 y 8.

A continuación se hará un análisis conjunto de los resultados de letalidad y del estudio gráfico.

Como anteriormente se mencionó en los objetivos planteados por el presente trabajo, se dará una aproximación del daño probable ocasionado al nauplio de *Artemia* por los aceites evaluados. Para cumplir con esta tarea, primeramente presentaré una semblanza de cómo es que los AE actúan a nivel biológico y después cómo es que están constituidas las artemias.

Se señaló anteriormente, que los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos químicos, por ello es difícil puntualizar el componente responsable de la actividad biológica observada, sin embargo, la naturaleza hidrofóbica de los AE permite afirmar que, existe un aumento de la permeabilidad celular y la consiguiente fuga de constituyentes celulares; es importante comprender que una estructura de la célula alterada puede afectar a otras estructuras celulares en un tipo de acción en cascada; los componentes pasan a través de la pared celular y de la membrana citoplasmática, alterando la estructura de las diferentes capas de ácidos grasos, fosfolípidos y polisacáridos. El daño a la pared celular y a la membrana, puede conducir a la salida de macromoléculas y posteriormente a la muerte celular. En general la actividad tóxica de cada aceite esencial se debe principalmente a los componentes mayoritarios (Bakkali & Averbeck, Biological affects of essential oils- A review, 2008).

En las células eucariotas, los aceites esenciales pueden provocar la despolarización de las membranas mitocondriales por la disminución del potencial de membrana, afectando a los

canales de calcio y a otros canales iónicos reduciendo el gradiente de pH, que afecta la bomba de protones para la formación de ATP. Además los AE cambian la ósmosis de las membranas, que se vuelven anormalmente permeables dando lugar a salidas de iones de calcio y proteínas, como en el caso del estrés oxidativo y la insuficiencia bioenergética. La permeabilización de las membranas mitocondriales externa e interna conduce a la muerte celular por apoptosis y necrosis (Bakkali & Averbek, Biological affects of essential oils- A review, 2008).

El género *Artemia* forma parte del subfilo Crustacea, y éste a su vez está incluido en el filo Arthropoda. Hadley (1986), menciona que la cutícula de los artrópodos, en general cuenta con dos principales divisiones estructurales. En la figura 38, se observa una capa externa, delgada llamada epicutícula y otra más gruesa la procutícula. La epicutícula dota a la mayoría de los artrópodos con la capacidad de retener agua; la otra división cuticular importante, la procutícula, está compuesta de un grueso tegumento compuesto esencialmente de quitina, polisacárido que le brinda carácter estructural.

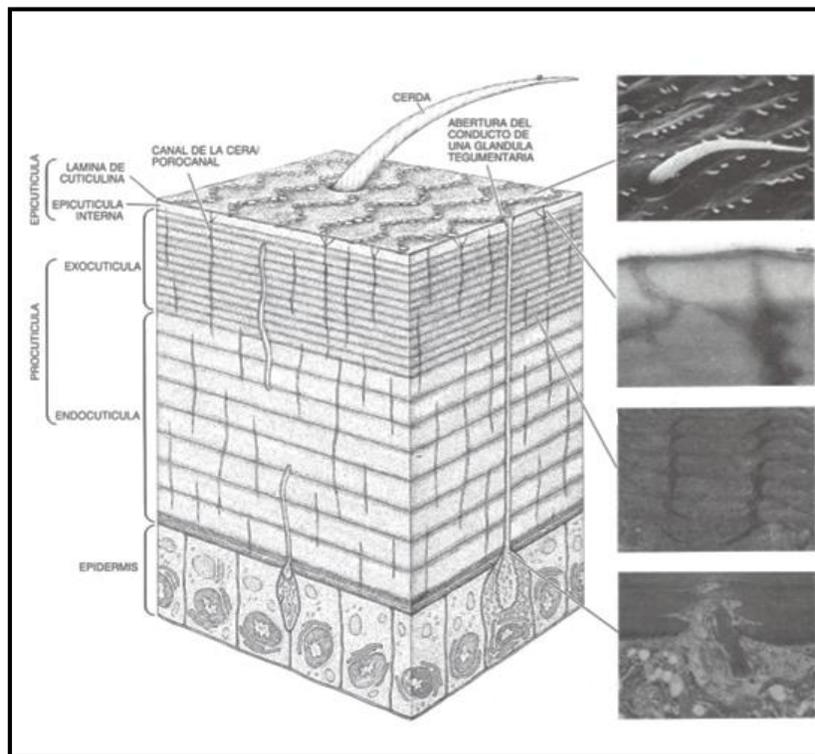


Figura 38. Características básicas de la cutícula de los artrópodos.
Fuente: (Hadley, 1986)

La cutícula del nauplio de *Artemia*; le sirve de exoesqueleto (característico de los artrópodos), cubre los apéndices, revistiendo los tubos traqueales, diversos conductos glandulares, órganos sensoriales y regiones anterior y posterior del tracto digestivo. De igual manera la cutícula brinda sostén y establece una barrera entre el animal y el medio ambiente.

Por supuesto, la estructura cuticular experimenta cambios durante la ecdisis o muda, proceso característico de los artrópodos. En las artemias durante la ecdisis hay una liberación de proteasas.

Warner y Matheson (1998) señalan que durante las dos primeras mudas larvarias en la *Artemia franciscana*, se secretan grandes cantidades de dos serin proteasas junto con la N-acetil- β -D-glucosaminidasa, una enzima que degrada la quitina y la cathepsina, proteína extracelular con actividad proteolítica. La muda en la *Artemia* se da de 16-19 veces a lo largo de su ciclo de vida, este proceso depende de diversos factores, tales como: la temperatura, el fotoperiodo, el suministro de comida entre otros. La muda de las Artemias está asociada principalmente a una actividad quitinolítica de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa (Warner & Matheson, Release of Proteases from Larvae of the Brine Shrimp *Artemia franciscana* and Their Potential Role During the Molting Process, 1998).

En otro estudio Liu y Warner (2006) indican también que la cathepsina L, es la principal proteasa en embriones y larvas de *Artemia*, ésta se encuentra presente en el desarrollo de los embriones y larvas jóvenes en al menos la primera muda larval.

En base a lo anterior y analizando, las fotografías y micrografías obtenidas a lo largo del estudio gráfico de evaluación de toxicidad, se puede deducir de manera general lo siguiente: Los AE son capaces de pasar a través de la membrana celular y la membrana citoplasmática de las dos principales divisiones estructurales del exoesqueleto, llegando así a la quitina que se encuentra en la procutícula. Los AE por su composición química activan la acción enzimática de las serinproteasas, de la cathepsina y de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa. Es por esto que se observan daños diferentes en cada uno de los aceites evaluados (Liu & Warner, Further characterization of the cathepsin L-associated protein and its gene in two species of the brine shrimp, *Artemia*, 2006).

Nunes et al (2006), establece que en las pruebas de toxicidad sobre el organismo *Artemia*, solo se pueden obtener respuestas binarias, tales como: vida vs muerte, respuestas de carácter enzimático, de carácter fisiológico en velocidad de consumo de oxígeno y reproductivos. Bajo este criterio, se puede inferir que de acuerdo a los resultados obtenidos se da una combinación de estos factores; esto se hizo tomando a las artemias como células eucariotas.

Para tener una evidencia que muestre cómo es que actúan los AE, primero se observó el comportamiento de los animales expuestos y no expuestos, con posterior revisión a través del microscopio estereoscópico, de los individuos muertos y agonizantes. Después de observar el comportamiento de los nauplios durante la exposición de los AE se llevó a cabo el procedimiento del diagrama 5. Teniendo como resultado una serie de fotografías y micrografías.

Analizando las CL₅₀, fotografías y micrografías se observa lo siguiente:

La micrografía 1, fotografías 13 y 14, corresponden al control negativo, donde se aprecia a un crustáceo de forma piriforme con tres apéndices cefálicos: anténulas, antenas, mandíbulas. La región torácica (tórax y toracópodos con los que nada). En la parte central, se aprecia el ojo naupliar y en la final del cuerpo, el telson (pequeños segmentos en forma de abanico);

estructuras que corresponden a la fase metanaupliar de la *Artemia*. Estas características indican que tanto el agua de mar “artificial” que se preparó como el tween 80, no interfirieron en su desarrollo normal.

La fotografía 14 muestra una *Artemia* en estadio metanaupliar (control negativo) teñido con safranina O. La safranina es un colorante catiónico que tiene afinidad por las que tienen una carga opuesta, sirve para teñir los núcleos celulares de rojos conformados por más de 50 proteínas llamadas nucleoporinas. La epicutícula es una capa conformada por lípidos, que forman una barrera que impide la entrada del colorante a la procutícula que está formada por quitina. La poca coloración que presenta en el interior la *Artemia*, es porque se introduce por la boca naupliar, tiñendo las proteínas que constituyen el cuerpo del crustáceo.

En la fotografía 15 se muestra la *Artemia* expuesta a una concentración de 500 ppm de Dicromato de potasio (control positivo) después de 24 h de exposición; se observa que el nauplio continúa con su desarrollo pero no llega a diferenciarse completamente el telson o abanico (parte final del cuerpo), característico de la fase metanaupliar.

Durante la ecdesis o muda (nauplio-metanauplio), la estructura cuticular experimenta cambios decisivos, si el animal ha de crecer; antes de que la cutícula vieja se desprenda, las células epidérmicas secretan una epicutícula nueva y blanda, esto favorece a que el cromo hexavalente se transporte a las células a través de los mecanismos de transporte de sulfato, tomando ventaja de la similitud entre el sulfato y cromato.

Se ha propuesto que la toxicidad del Cr (VI) se debe a que dentro de las células se generan intermediarios reducidos de cromo [Cr (V), Cr (IV) y Cr (III)] que en presencia de H₂O₂ funcionan como catalizadores de una reacción tipo Fenton, generando Especies Reactivas Oxigenadas (ERO), con el consecuente daño oxidativo, produciendo peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y ácidos nucleicos. La peroxidación de lípidos (presentes en la epicutícula) destruye la membrana celular (capa externa), dejando la procutícula expuesta y permitiendo a la safranina interactuar con la quitina produciendo la coloración roja característica.

En la fotografía 16 se observa el nauplio teñido al 100%; el colorante logra introducirse debido a que el Cr (III), también inhibe la fosforilación oxidativa y por tanto la producción de ATP en consecuencia no hay metabolismo celular, se desprende la epicutícula (micrografía 2 y fotografía 15), provocando así la muerte de la *Artemia* (Zulita Prieto & León Inicio, 2008).

La CL₅₀ obtenida del aceite esencial de orégano (AEO) fue de 33.704 ppm (tabla 26), utilizando los criterios de Sanabria Galindo, 1997 (tabla 27) se considera que tiene una letalidad elevada, relacionando este resultado con el estudio gráfico se observa en las fotografías de la 26-28 y en la micrografía 6 que el daño causado al nauplio de *Artemia* por el AEO es similar al causado por el cromo: desintegración de la pared celular de los órganos del nauplio y daño del exoesqueleto (pero no en la magnitud del provocado por el AEC). El exoesqueleto es más delgado y ligeramente destruido (micrografía 6) comparándolo con el control negativo (micrografía 1), dicha acción se puede atribuir a los componentes principales del AEO, el carvacrol y el timol que presentan un alto poder antimicrobiano.

La estructura química del carvacrol y del timol está representada por un grupo fenólico con características hidrofóbicas. García y Palou (2008) reportan que ambos son capaces de desintegrar la membrana externa de las bacterias gram positivas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando con ello la salida de ATP e inhibiendo la actividad de las ATPasas. Se puede inferir que debido a este mecanismo de acción el AEO logra permear el exoesqueleto del nauplio destruyendo la primera división estructural de la cutícula, una vez destruida la epicutícula pasa a través de las aberturas del conducto de la glándula tegumentaria llegando a la pared de los órganos vitales y así activar la catepsina (enzima que activa la ecdesis) destruyendo la membrana citoplasmática.

La CL_{50} obtenida para el aceite esencial de clavo (AEC) es 47.387 ppm, según los criterios de Sanabria Galindo, 1997, posee una letalidad elevada. Este resultado se ve reflejado en las fotografías 17, 18 y 19 donde se puede apreciar que la cutícula del nauplio esta desecha, al observar en el microscopio estereoscópico los nauplios de las concentraciones más altas, después de 6 h de exposición, éstos presentaban nado errático, debilidad, pérdida del reflejo de huida y desintegración de la cutícula aun cuando el nauplio se encontraba con vida; esta acción se puede atribuir al Eugenol que es el componente mayoritario del AEC, González Escobar (2002) reporta que el Eugenol provoca lesiones cáusticas o quemaduras superficiales cuando es colocado en forma directa y en altas concentraciones en los tejidos blandos. La severidad del daño es proporcional al tiempo de exposición, a la dosis y a la concentración. Se ha visto que el eugenol puede llegar a mostrar tanto *in vivo* como *in vitro* daño directo al tejido, dermatitis, reacciones alérgicas, disfunciones hepáticas, entre otras.

Baldovino (1994) menciona que el eugenol actúa como inhibidor de la respiración mitocondrial y como desacoplador del transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, con efectos dependientes de la dosis empleada.

En base a lo anterior se dedujo que el AEC, actúa principalmente en el exoesqueleto ya que se cree que activa a la N-acetil- β -D-glucosaminidasa y a las proteasas encargadas de activar la ecdesis. Las proteasas destruyen la primera división estructural del exoesqueleto (la epicutícula) afectando la retención de agua al estimular la acción quitinolítica y destruyendo a los órganos vitales del nauplio, causando su muerte (micrografía 3).

La CL_{50} obtenida del aceite esencial de epazote (AEE) es de 77.508 ppm; según los criterios de Sanabria Galindo, (1997) se considera con una letalidad elevada; hecho que concuerda con lo observado en las fotografías de la 20-22 y en la micrografía 4. La parte externa de la cutícula del nauplio está completa, pero el interior del cuerpo no concuerda con la morfología característica de los nauplios (fotografía 5), sus órganos están destruidos.

El componente principal del AEE, el ascaridol, es un componente altamente tóxico (Rimada, 2006). Monzote y Stamberg (2009) reportan que el ascaridol es un potente microbicida ya que hace una inhibición inespecífica del complejo III de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria; se deduce con este mecanismo de acción que los nauplios de *Artemia* ingirieron el AEE y una vez ingerido, permeo la membrana celular y causó daños en las mitocondrias celulares, por lo que los órganos se desintegraron. El AEE pudo también haber

activado a la catepsina, (proteasa que se encuentra en la mayoría de los órganos de las artemias), ocasionando permeabilidad de las células y salida de macromoléculas causando así la lisis celular.

La CL_{50} obtenida del aceite esencial de romero (AER) es de 157.120 ppm, aplicando los criterios de Sanabria Galindo (1997) tiene una letalidad moderada; esto se puede apreciar en las fotografías de la 20-22 y en la micrografía 7. En el nauplio de Artemia se observa tanto la capa externa como el interior del cuerpo están completos ya que corresponden con la morfología del nauplio (fotografía 5), pero a diferencia del control negativo se ve una desintegración de la pared celular de los órganos de manera que no se pueden distinguir de manera clara; se infiere que la causa probable de este efecto sea el 1,8-cineol, componente mayoritario del AEL, éste componente tiene registrada actividad antimicrobiana e insecticida; ya que puede penetrar a través de la cutícula o al ser ingerido por el nauplio, permeando la pared y membrana celular, ocasionando un shock osmótico y por lo tanto muerte celular y en consecuencia la muerte del nauplio (Jiang & Wu, 2011).

Para el aceite esencial de laurel (AEL) se determinó una CL_{50} de 345.942 ppm y según Sanabria Galindo (1997), tiene una letalidad baja, este resultado coincide con lo que muestra en las fotografías 14-16 y la micrografía 5. Comparando las fotografías de AEL y AER (20-22 vs 14-16), se observa que los daños son similares ya que tienen el mismo componente mayoritario (1,8 cineol), por lo que se infiere que el mecanismo de acción es el mismo.

7 Conclusiones

- Se determinó la toxicidad aguda de los aceites esenciales aislados de cinco especies por medio del bioensayo de letalidad de *Artemia* teniendo como resultado :

Aceites esenciales evaluados	CL ₅₀ (ppm)
Clavo	47.387
Epazote	77.508
Laurel	345.942
Orégano	33.704
Romero	157.120

- Se evaluó la toxicidad aguda de los cinco aceites esenciales analizados en este estudio, siguiendo los criterios de Sanabria (1997), teniendo como resultado que los aceites esenciales de orégano, clavo y epazote poseen una letalidad elevada, el romero una letalidad moderada y el laurel una letalidad baja.
- Se identificaron los especímenes utilizados en esta experimentación en el Herbario Etnobotánico IZTA de la FES- Iztacala, UNAM.

Nombre científico	Familia	Nombre común
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	Verbenaceae	“Orégano”
<i>Litsea glaucences</i> H.B.K.	Lauraceae	“Laurel”
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae/ Labiatae	“Romero”
<i>Syzygium aromaticum</i> (L) Merril & L.M. Perry	Myrtaceae	“Clavo”
<i>Teloxys ambrosioides</i> (L) W.A. Weber Sin: <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Chenopodiaceae	“Epazote”

- El método adecuado de extracción de aceites esenciales evaluados fue; para el caso del orégano, epazote, laurel y romero: hidrodestilación adaptado con una trampa tipo Clevenger; para el caso del clavo: hidrodestilación utilizando una trampa Dean Stark.
- Se investigó el ciclo de vida de la *Artemia* mediante microscopía óptica y MEB conociendo así las características morfológicas de cada estadio.
- Se logró establecer las condiciones óptimas de cultivo de *Artemia franciscana*, para su uso en un bioensayo en el laboratorio 324.
- Se desarrolló un bioensayo con *Artemia franciscana*, para determinar la CL₅₀ de los diferentes aceites esenciales a evaluar.
- Por medio de MEB y microscopía óptica se logró inferir las posibles causas de muerte de la *Artemia franciscana*, y con ayuda de la literatura se consiguió deducir cual fue el posible daño provocado por cada aceite en los nauplios de *Artemia*.

8 Prospectivas

- ✓ El bioensayo de *Artemia* puede utilizarse no solo en aceites esenciales, sino también en extractos y en residuos que se generen en los laboratorios de la facultad; ya que el camarón de salmuera es un crustáceo sensible a una gran variedad de sustancias, el bioensayo de *Artemia* puede ser útil como una prueba rápida y simple para predecir la toxicidad.
- ✓ Se sugiere realizar la cuantificación e identificación de los componentes de los aceites esenciales evaluados en este trabajo.
- ✓ En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se propone que los aceites esenciales que presentaron una CL_{50} elevada, como fue el caso del clavo, orégano y epazote se evalúen en líneas celulares con el fin de evaluar propiedades anticancerígenas.

9 Referencias

- Aguirre, H. I. (2012). Colorante Safranina O. *Tecnología en salud*, 1(2), 83-85.
- Arcila, C., & Loarca, S. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1).
- Avila, R., Navarro, A. R., & Vera, O. (2011). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar*, XV(43), 23-36.
- Bakkali, F., & Averbeck, S. (2008). Biological affects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*, 446-475.
- Bakkali, F., & Averbeck, S. (2008). Biological affects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- Baldovino, M. (1994). el eugenol y sus efectos biológicos. *Dugandia*, 13-15.
- Bauer, K., Garbe, H., & Surburg, H. (2001). *Common Fragrance and Flavors materials*.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia y Fitoquímica. Plantas Medicinales*. España: Zaragoza. Acriba S.A.
- Can, K. H., & Buchbauer, G. (2010). *Handbook of Essential Oils Science, Technology and Applications*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Cano, T. M. (2010). *Obtención y caracterización del aceite esencial y oleoresina de dos especies de laurel y orégano*. Guatemala: Facultad de Ingeniería; Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Castro, L. M., & Alzate, M. Y. (2008). *Estudio preliminar de la actividad biológica de extractos de Annona cherimolia Mill*. Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira; Facultad de tecnologías; Escuela de Química.
- Castro, M., Malpica, S., Castro, B., De Lara, A. R., & al, e. (1997). El uso de nauplios y quistes de la población de *Artemia* de Oaxaca en el desarrollo de la acuicultura en la región del Istmo. *Ciencia y Mar*, 1(2), 35-38.
- Castro, T., & Gallardo, C. (1993). *Artemia sp*. México: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.
- CENAIM. (2006). *Manual de Artemia*. Ecuador: Nutrishrimp.
- Colegate, S. (1993). *Bioactive Natural Products; Detaction, Isolation and Estructural Dertetermination*. United States of America: CRC Press.

- CONABIO. (16 de Junio de 2014). *Biodiversidad Mexicana*. Obtenido de <http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/especies.html>
- Devnull. (2007-2008). *Portal Pez Biblioteca*. Recuperado el 29 de Octubre de 2014, de La Artemia Salina: <http://biblioteca.portalpez.com/la-artemia-salina-vp15740.html>
- Díaz, O. (2007). *Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de Aloysia triphylla (Litler) Britton, cultivada en tres regiones de Colombia*. Colombia: Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química; Laboratorio de Cromatografía CENIVAM.
- Etaio, I. (2007). *Guía para la evaluación sensorial de la calidad de los vinos tintos de Rioja Alavesa : vinos jóvenes y vinos con crianza en bodega*. País Vasco, España: Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco.
- García, R., & Palou, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 2, 41-51.
- Gómez, J. R. (2008). Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(1), 3-9.
- González, Á., & Cruz, A. (2013). *Guía técnica del cultivo de Romero (Rosmarinus officinalis)*. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S. C.
- González, R. (2002). Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *revista cubana*, 39(2), 1-6.
- González, Y., & Aportela, P. (2001). Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de artemia salina. *Anuario de Toxicología*, 1(1), 104-108.
- Hadley, N. (1986). La cutícula de los artrópodos. *Investigación y ciencia*, 1(120), 80-86.
- Hernández, P. (2011). *Encapsulación de Aceite Esencial de Clavo para su Aplicación en la Industria Alimentaria*. Murcia: Facultad de Ciencias de la Salud de la Actividad Física y del deporte.
- Huerta, C. (1997). Orégano mexicano: oro vegetal. *Biodiversidad*, 13, 8-13.
- INE, 2. (2007). *Evaluación de riesgo de extinción de Lippia graveolens de acuerdo al numeral 5.7 de la NOM-059-SEMARNAT-2001*. Recuperado el 11 de Noviembre de 2013, de <http://www.ine.gob.mx/publicaciones/libros/534/cap8.pdf>
- Jiang, Y., & Wu, N. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *environmental toxicology and pharmacology*, 63-68.

- Jiang, Y., & Wu, N. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *environmental toxicology and pharmacology*, 32(1), 63-68.
- Koutsoupakis, C., Gialou, I., Pavlidou, E., Kapetanaki, S., & Varotsis, C. (2002). Antimalarial endoperoxides: synthesis and implications of the mode of action. *ARKIVOC*, xiii, 62-69.
- Kuklinski, C. (2003). *Farmacognosia; estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. España: Omega.
- Kumar, R., & Mishra, M. (2007). Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*, 115(2), 159-164.
- León, C. Z. (2009). Estudio de la extracción y determinación de la composición química del aceite esencial de paico (*Chenopodium ambrosioides* L.). *Ciencia y Tecnología*, 12(1), 6-12.
- León, V. (2005). *Elaboración de una base de datos de plantas utilizadas en la medicina tradicional de México*. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Lianet Monzote , Werner Stamberg , & Katrin Stanie. (2009). Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(3), 337–347.
- Liu, L., & Warner, A. (2006). Further characterization of the cathepsin L-associated protein and its gene in two species of the brine shrimp, *Artemia*. *Science direct*, 145(4), 458-467.
- Loewenfeld, C., & Back, P. (1980). *Guía de las hierbas y especias*. España: Omega.
- López, T. (2008). El romero, planta aromática con efectos antioxidantes. *Ámbito farmacéutico*, 27(7), 60-63.
- Luna, M. (2003). *Litsea glaucescens. Taxones del bosque mesófilo de montaña de la Sierra Madre Oriental incluidos en la norma oficial mexicana*. México: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO.
- Lynn. (7 de Marzo de 2014). *munsellcharts*. Obtenido de <http://envirothonpa.org/documents/munsellcharts.pdf>
- Medina, M. (2011). *Aceites esenciales: Usos, Composición Química y Actividades Biológicas*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

- Monzote, L., & Stamberg, W. (2009). Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(3), 337-347.
- NMX-AA-110-SCFI. (1995). Análisis de agua evaluación de toxicidad aguda con *Artemia franciscana* Kellogg (Crustácea–Anostraca). Método de prueba. *Secretaría de Comercio y Fomento Industrial*.
- NMX-F-074-SCFI. (2011). Alimentos para humanos - aceites esenciales, aceites y grasas vegetales o animales - determinación del índice de refracción con el refractómetro de abbé - método de prueba (cancela a la NMX-F-074-SCFI-2006). *Diario oficial de la Federación*.
- NMX-F-075-SCFI. (2012). Alimentos – aceites y grasas vegetales o animales determinación de la densidad relativa . *Diario Oficial de la Federación*, pág. 6.
- Ortuño, L., Sosa, R., & Giles, A. (2009). *Ejecución de bioensayos y asistencia en estudios de impacto ambiental*. México: Dirección General de Educación en Ciencia y Tecnología del Mar.
- Pacheco, J. D. (2011). *Determinación de la toxicidad aguda (cl50) del extracto de polvillo de carbón frente a larvas de Artemia franciscana*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Pino, O., & Jorge, F. (2010). Ensayo de Artemia: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Protección vegetal*, 25(1), 34-43.
- Quintero D, A., & Gutiérrez G, A. (1991). Manual para la identificación de los oréganos mexicanos. México, México: Estado actual del conocimiento sobre el orégano en México. Bermejillo, Dgo.
- Reader's, D. (1987). *Plantas Medicinales Virtudes insospechadas de plantas conocidas*. México: Reader's Digest.
- Rimada, R. (2006). La Estabilidad Térmica de Ascaridol en Solución Acuosa. Su Importancia en la Acción Farmacológica. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(1), 115-118.
- Rodríguez, L., Maldonado, T., & Carrillo, L. (2006). Calidad biológica y bioquímica de la población de *Artemia* (Anostraca: Artemiidae) localizada en las salinas de Real de Salinas, Calkini, Campeche, México. *Rev. Biol. Trop*, 54(4), 1283-1293.
- Rodríguez, M., Alcaráz, L., & Real, S. (2012). *Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas*. México, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur.

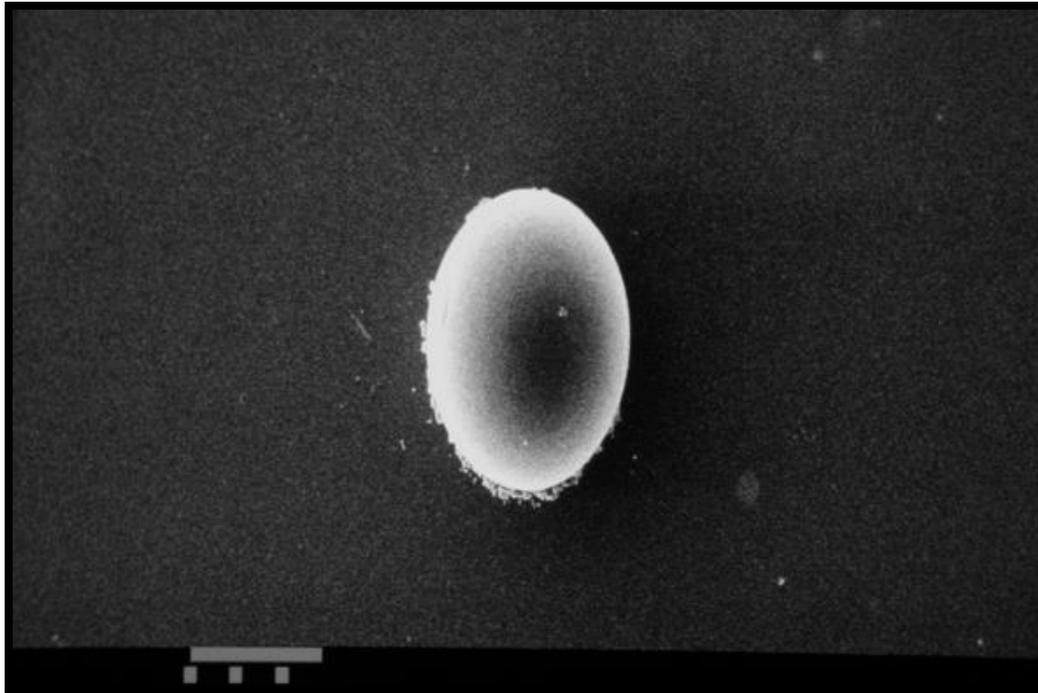
- Ruiz Pérez, O. (2008). *Caracterización de diversas poblaciones de Artemia desde el punto de vista de su composición en ácidos grasos y de sus patrones moleculares*. España: Universidad de Valencia, Servei de Publicacions.
- Sanabria, A., & Sandra, L. (1997). Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Ciencias Químicas Farmaceuticas*, 1(26), 15-19.
- Sato, N., Mallo, J., & Fenucci, J. (2004). Calidad de los quistes de *Artemia persimilis* (Piccinelli & Prosdocimi) (Crustacea: Branchiopoda) de diferentes zonas de Argentina, como alimento en acuicultura. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 39(2), 72-92.
- Secretaría de Salud. (2013). *Farmacopea herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. México: Secretaría de Salud.
- SEMARNAT. (2008). *Manual que establece los criterios técnicos para el aprovechamiento sustentable de recursos forestales no maderables de clima árido y semiárido*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Solís Campoverde, P. N. (2011). *“Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*thymus vulgaris* L.) como potenciales bioconservadores en carne de pollo*. Ecuador: Escuela Superiores Politécnica de Chimborazo; Facultad de Ciencias; Escuela de Bioquímica y Farmacia.
- Tapia, N. A. (2011). *Algunas características anatómicas y químicas de la hoja y de la madera de *Litsea glaucescens**. México: Universidad Autónoma Metropolitana; Unidad Iztapalapa.
- UNAM. (29 de Noviembre de 2013). *Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana*. Obtenido de www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx
- Valenzuela, E. (2013). *Manual de Prácticas de Laboratorio de Cultivos de Apoyo*. Baja California, México: Facultad de Ciencias Marinas.
- Vargas, A. P., & Bottia, E. J. (2008). *Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los municipios de bolívar y el peñón – Santander, Colombia*. Colombia: Universidad Industrial de Santander; Facultad de Ciencias; Escuela de Química.
- Villar del Fresno, A. M. (1999). *Farmacognosia general*. España: Síntesis.
- Villaseñor R., J., & Espinosa, G. (1998). *Catálogo de malezas de México*. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario, Fondo de Cultura Económica.
- Villavicencio G, E. (2007). Orégano, recurso con alto potencial. *Ciencia y Desarrollo*, 33, 60-66.

- Villavicencio, E., Cano, A., & García, X. (2010). *Metodología para determinar las existencias de orégano (Lippia graveolens H.B.K.) en rodales naturales de Parras de la Fuente, Coahuila*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Vinatea, L. (1997). *Manual de producción de Artemia (Quistes y biomasa) en módulos de cultivo*.
- Warner, H., & Matheson, C. (1998). Release of Proteases from Larvae of the Brine Shrimp *Artemia franciscana* and Their Potential Role During the Molting Process. *Science*, 119(2), 255-263.
- Warner, H., & Matheson, C. (1998). Release of Proteases from Larvae of the Brine Shrimp *Artemia franciscana* and Their Potential Role During the Molting Process. *Science*, 119(2), 255-263.
- WHO. (1998). *Quality Control of Medicinal Plant materials*. Geneva: WHO Library Cataloging in Publication data.
- Willman D, E., Schmidt, M., & Rimpler, H. (2000). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlan. 27, 31-34.
- Zulita Prieto, & León Inicio. (2008). Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (TILAPIA). *Med Exp Salud Publica*, 25(1), 51-58.

10 ANEXOS

10.1 ANEXO A

10.1.1 Micrografías completas del ciclo de la Artemia en MEB



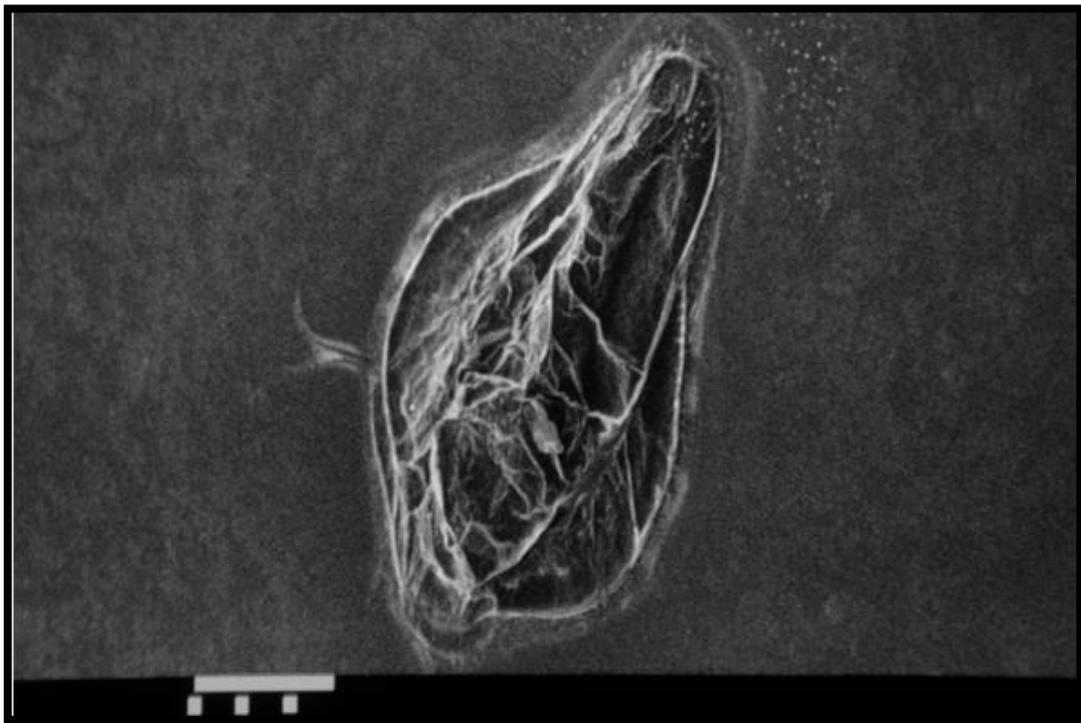
Micrografía 8. Quiste de Artemia a 150x



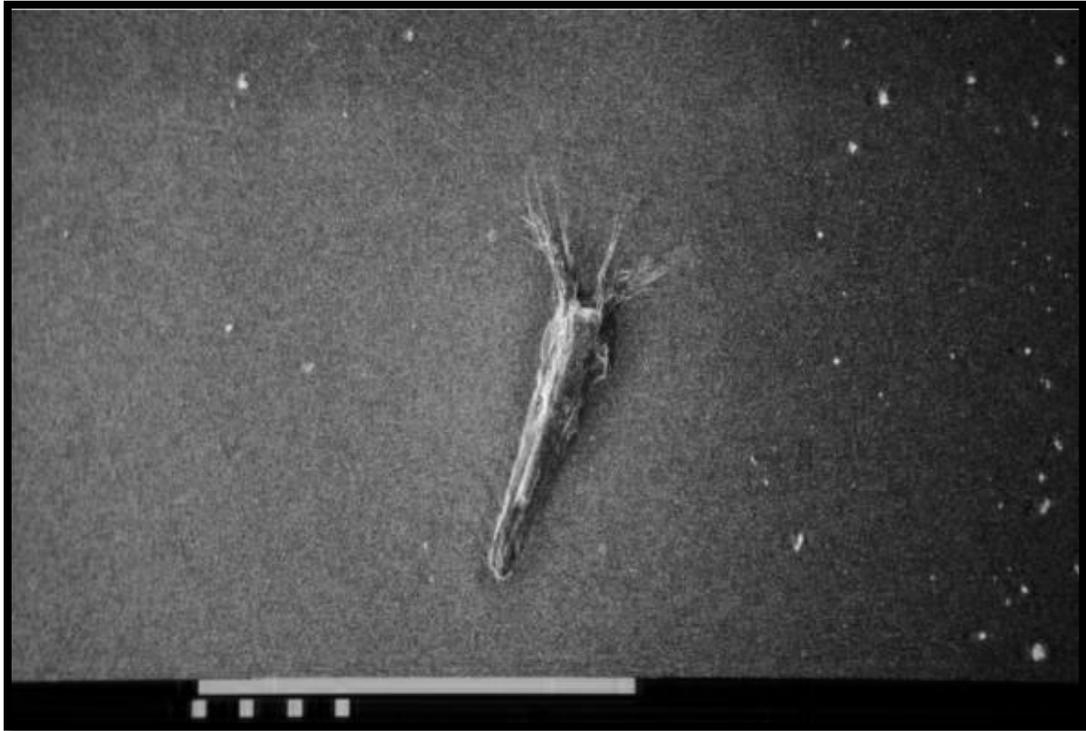
Micrografía 9. Eclosión de Artemia a 100x



Micrografía 10. Naupli de Artemia recién eclosionado a 100x



Micrografía 11. Naupli de Artemia de 24hrs. de eclosión a 150x



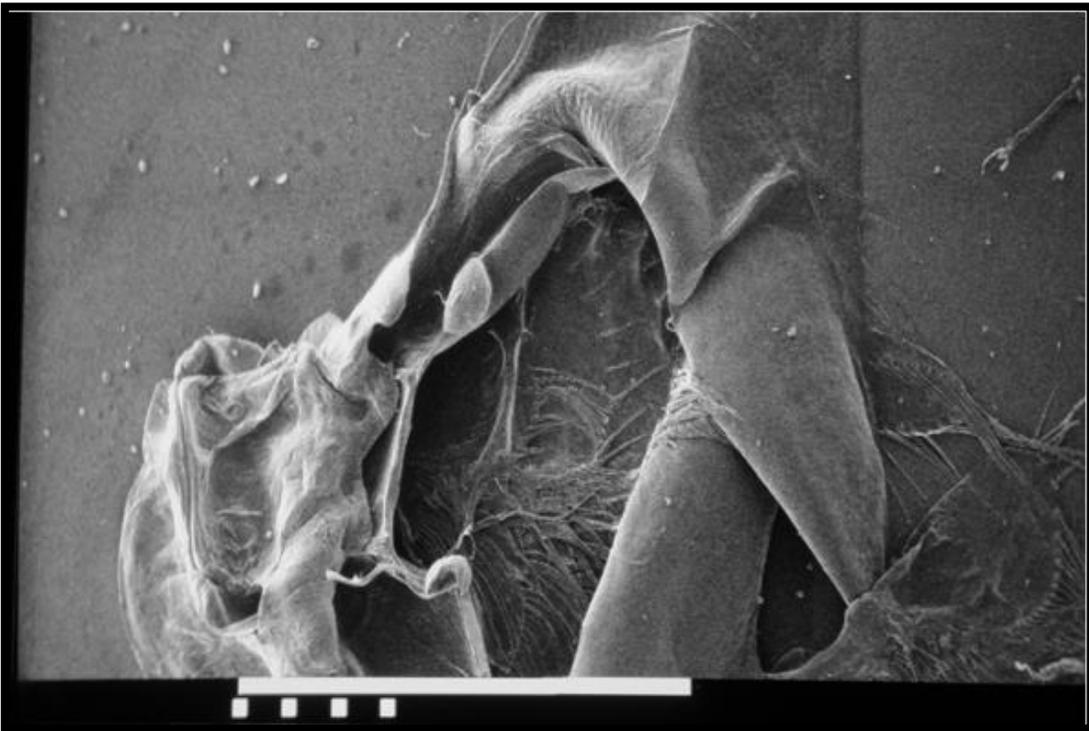
Micrografía 12. Metanaupli de Artemia 400x.



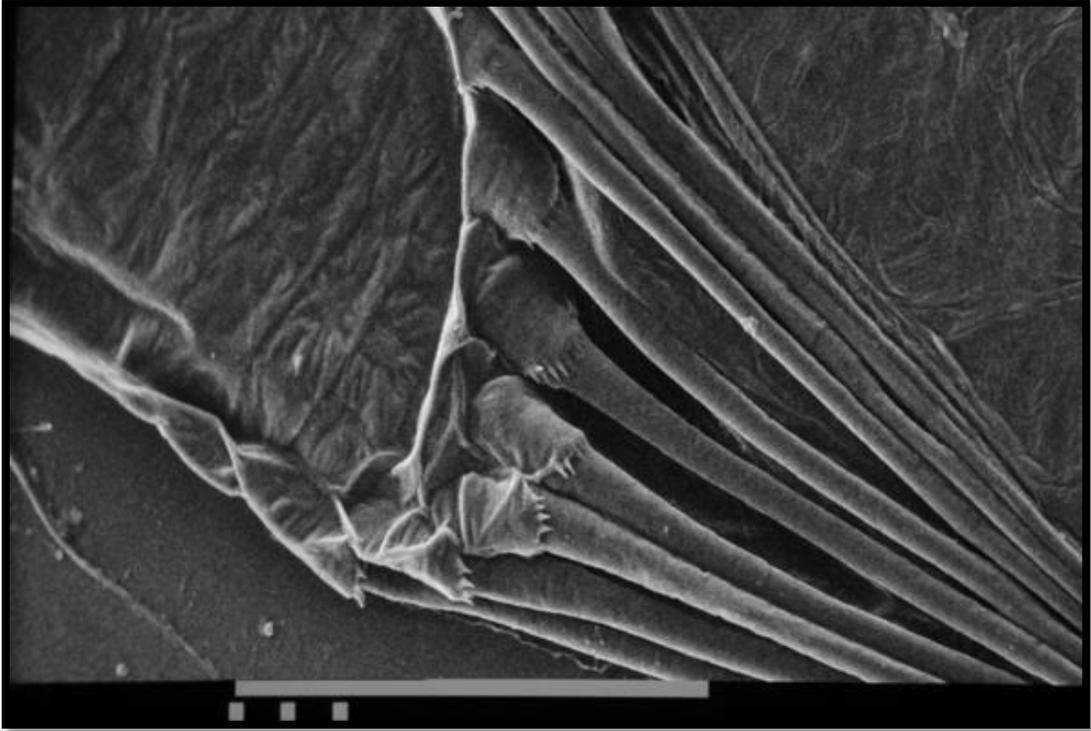
Micrografía 13. Metanaupli de Artemia 400x.



Micrografía 14. Ejemplar juvenil de Artemia 400x.



Micrografía 15. Parte de las tenazas de una Artemia macho 400x.



Micrografía 16. Parte de un toracópodo 400x.

10.2 ANEXO B

10.2.1 Ecuaciones utilizadas para obtener:

10.2.1.1 Porcentaje de humedad de los quistes:

$$\% \text{ de } H = \frac{(\text{pesa filtro} + \text{muestra no seca}) - (\text{pesa filtro} + \text{muestra seca})}{(\text{pesa filtro} + \text{materia seca}) - (\text{peso del pesa filtro solo})} \times 100$$

10.2.1.2 Eficiencia de eclosión de quistes:

$$EE = \frac{N \times V}{M \times C}$$

Donde:

N= promedio de los nauplis presentes en las cajas Petri

V= volumen total de eclosión

M= volumen de la muestra

C= cantidad de los quistes incubados

10.2.1.3 Porcentaje de eclosión

$$\%E = \frac{N}{N + E} \times 100$$

Donde:

N= promedio de los nauplis presentes en las cajas Petri

E= promedio de embriones presentes en las cajas Petri

10.2.1.4 Porcentaje de rendimiento de los AE:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{g \text{ obtenidos}}{g \text{ de materia prima}} \times 100$$

10.2.1.5 Densidad:

$$G_1 = M_1 - M; G_2 = M_2 - M$$

$$\delta_{20^\circ\text{C}} = \frac{G_1}{G_2}$$

Donde:

$\delta_{20^\circ\text{C}}$ = Densidad relativa temperatura T (°C) con respecto a la temperatura de referencia del agua.

M_1 = Masa del matraz con muestra

M_2 = Masa del matraz con agua

M = Masa del matraz vacío

G_1 = Masa neta del aceite esencial

G_2 = Masa neta del agua

10.2.1.6 Índice de refracción

$$n = n^1 + K(T^1 - T)$$

Donde:

n = Lectura de la temperatura de referencia.

n^1 = Lectura a la temperatura t^1 en K (°C).

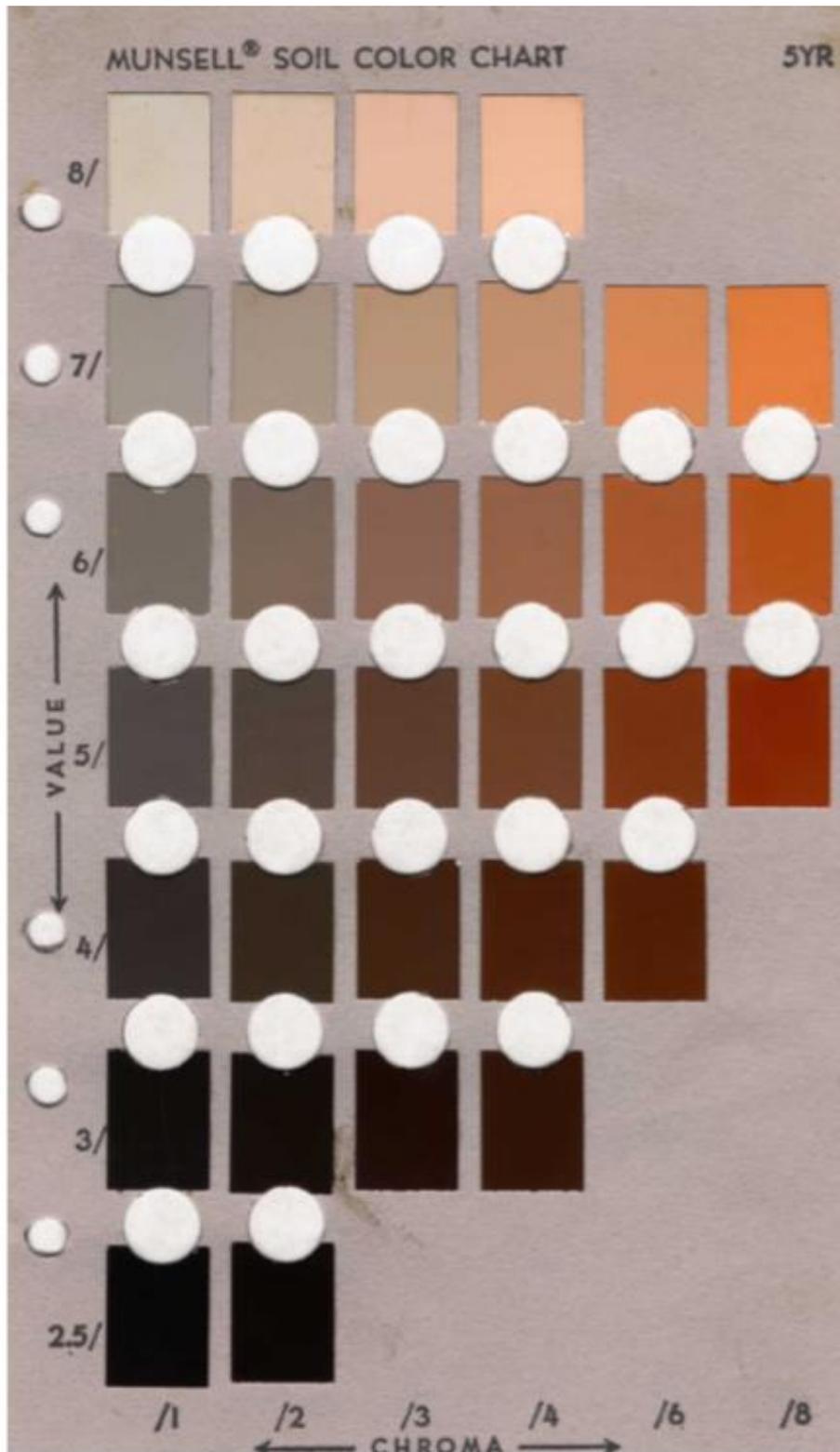
T = Temperatura de referencia.

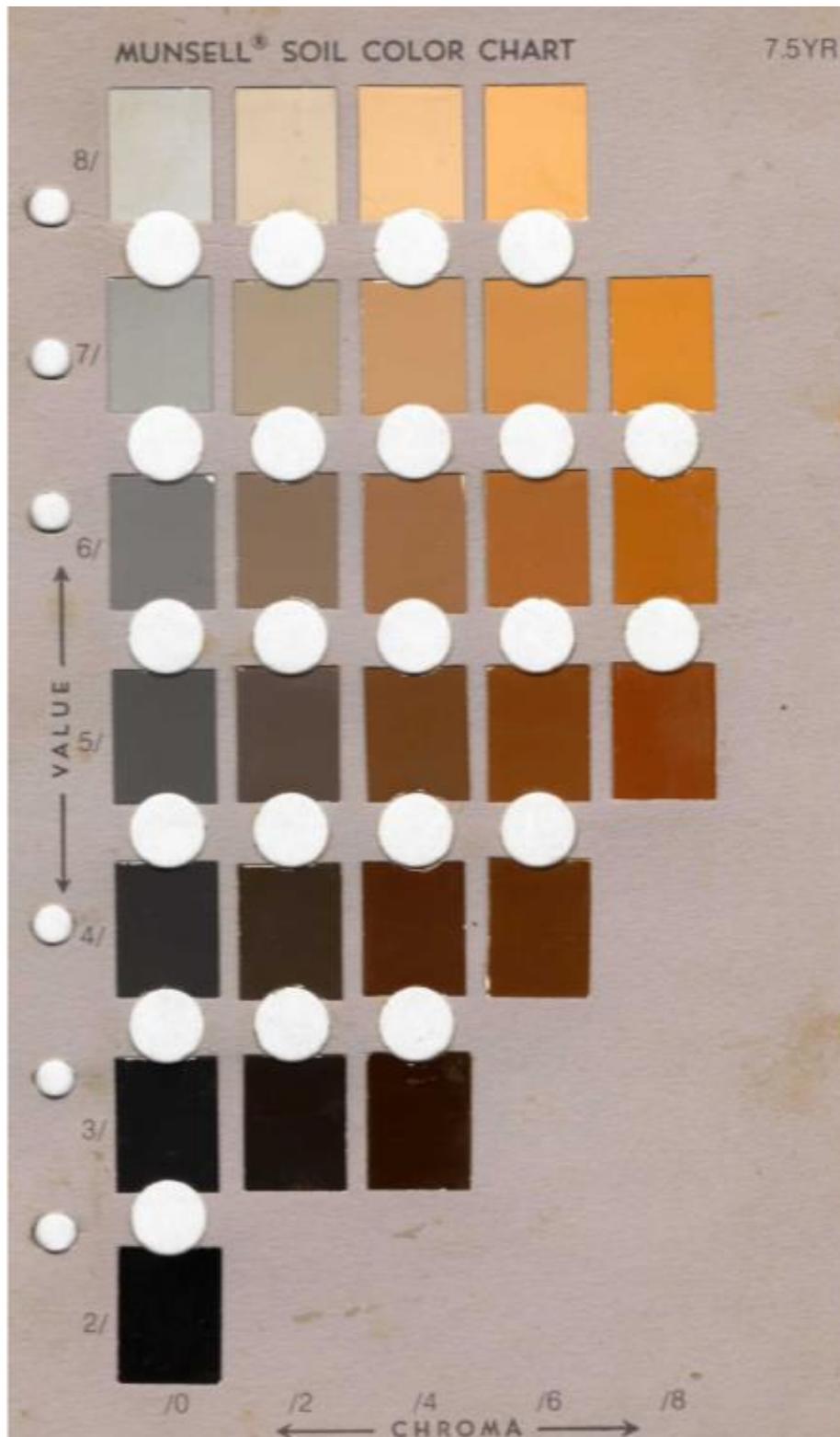
T^1 = Temperatura a la cual se hizo la lectura n^1

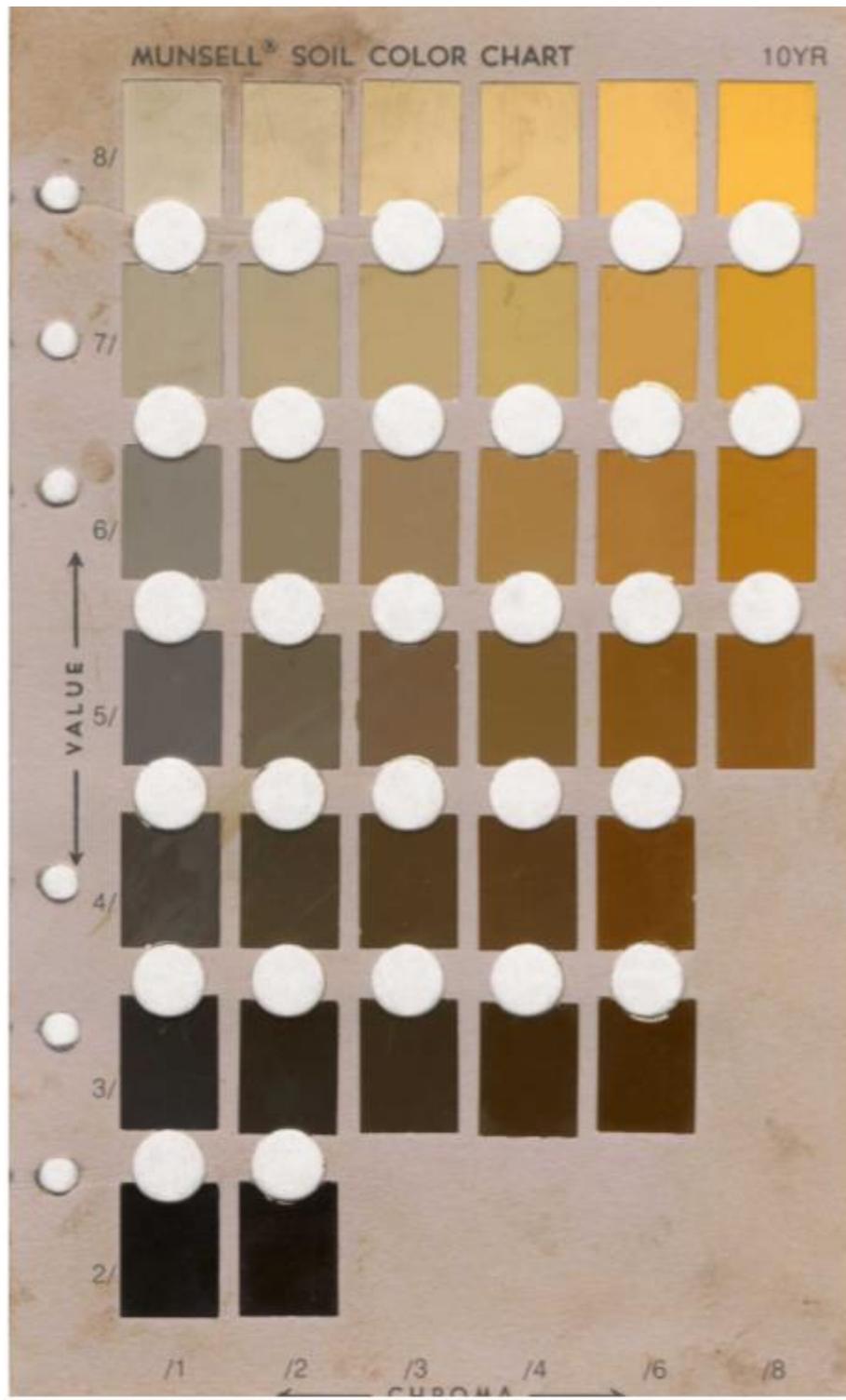
$K = 0.00045$ para aceites esenciales.

10.3 ANEXO C

10.3.1 Cartas Munsell







10.4 ANEXO D

10.4.1 Cálculos de concentraciones de los AE a evaluar

10.4.1.1 Aceite de Orégano

Datos

Densidad: 0.9570 g/mL

Rango de concentraciones de 100-1 ppm

$$\begin{aligned} & \left(\frac{0.9570 \text{ g}}{\text{mL}} \right) \times \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) \times \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \right) = 957000 \text{ ppm} \\ & \left(\frac{957000 \mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \times \left(\frac{0.058 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} \right) \times \left(\frac{9 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \right) = 99.9108 \text{ ppm} \\ & 99.9108 \text{ ppm} \times \left(\frac{9 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 89.9197 \text{ ppm} \\ & 99.9108 \text{ ppm} \times \left(\frac{8 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 79.9286 \text{ ppm} \\ & 99.9108 \text{ ppm} \times \left(\frac{7 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 69.9375 \text{ ppm} \\ & 99.9108 \text{ ppm} \times \left(\frac{6 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 59.9464 \text{ ppm} \\ & 99.9108 \text{ ppm} \times \left(\frac{5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 49.9554 \text{ ppm} \\ & 99.9108 \text{ ppm} \times \left(\frac{4 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 39.9643 \text{ ppm} \\ & 99.9108 \text{ ppm} \times \left(\frac{3 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 29.9732 \text{ ppm} \\ & 99.9108 \text{ ppm} \times \left(\frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 19.9821 \text{ ppm} \\ & 99.9108 \text{ ppm} \times \left(\frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 9.9910 \text{ ppm} \\ & 99.9108 \text{ ppm} \times \left(\frac{0.1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 0.9991 \text{ ppm} \end{aligned}$$

10.4.1.2 Aceite de clavo

Datos

Densidad: 1.0758 g/mL

Rango de concentraciones de 100-1 ppm

$$\begin{aligned} & \left(\frac{1.0758 \text{ g}}{\text{mL}}\right) \times \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}\right) \times \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}}\right) = 1075800 \text{ ppm} \\ & \left(\frac{1075800 \mu\text{g}}{\text{mL}}\right) \times \left(\frac{0.047 \text{ mL}}{50 \text{ mL}}\right) \times \left(\frac{10 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}\right) = 101.1252 \text{ ppm} \\ & 101.1252 \text{ ppm} \times \left(\frac{9 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 91.0126 \text{ ppm} \\ & 101.1252 \text{ ppm} \times \left(\frac{8 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 80.9001 \text{ ppm} \\ & 101.1252 \text{ ppm} \times \left(\frac{7 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 70.7876 \text{ ppm} \\ & 101.1252 \text{ ppm} \times \left(\frac{6 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 60.6751 \text{ ppm} \\ & 101.1252 \text{ ppm} \times \left(\frac{5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 50.5626 \text{ ppm} \\ & 101.1252 \text{ ppm} \times \left(\frac{4 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 40.4500 \text{ ppm} \\ & 101.1252 \text{ ppm} \times \left(\frac{3 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 30.3375 \text{ ppm} \\ & 101.1252 \text{ ppm} \times \left(\frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 20.2250 \text{ ppm} \\ & 101.1252 \text{ ppm} \times \left(\frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 10.1125 \text{ ppm} \\ & 101.1252 \text{ ppm} \times \left(\frac{0.1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 1.0112 \text{ ppm} \end{aligned}$$

10.4.1.3 Aceite de Laurel

Datos

Densidad: 0.9144 g/mL

Rango de concentraciones de 100-1 ppm

$$\begin{aligned}\left(\frac{0.9144 \text{ g}}{\text{mL}}\right) \times \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}\right) \times \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}}\right) &= 914400 \text{ ppm} \\ \left(\frac{914400 \mu\text{g}}{\text{mL}}\right) \times \left(\frac{0.061 \text{ mL}}{50 \text{ mL}}\right) \times \left(\frac{9 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}\right) &= 100.4011 \text{ ppm} \\ 100.4011 \text{ ppm} \times \left(\frac{9 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) &= 90.3609 \text{ ppm} \\ 100.4011 \text{ ppm} \times \left(\frac{8 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) &= 80.3208 \text{ ppm} \\ 100.4011 \text{ ppm} \times \left(\frac{7 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) &= 70.2807 \text{ ppm} \\ 100.4011 \text{ ppm} \times \left(\frac{6 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) &= 60.2406 \text{ ppm} \\ 100.4011 \text{ ppm} \times \left(\frac{5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) &= 50.2005 \text{ ppm} \\ 100.4011 \text{ ppm} \times \left(\frac{4 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) &= 40.1604 \text{ ppm} \\ 100.4011 \text{ ppm} \times \left(\frac{3 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) &= 30.1203 \text{ ppm} \\ 100.4011 \text{ ppm} \times \left(\frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) &= 20.0802 \text{ ppm} \\ 100.4011 \text{ ppm} \times \left(\frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) &= 10.0401 \text{ ppm} \\ 100.4011 \text{ ppm} \times \left(\frac{0.1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) &= 1.0040 \text{ ppm}\end{aligned}$$

Rango de concentraciones de 500-150 ppm

$$\begin{aligned}\left(\frac{0.9144 \text{ g}}{\text{mL}}\right) \times \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}\right) \times \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}}\right) &= 914400 \text{ ppm} \\ \left(\frac{914400 \mu\text{g}}{\text{mL}}\right) \times \left(\frac{0.274 \text{ mL}}{50 \text{ mL}}\right) \times \left(\frac{10 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}\right) &= 501.0912 \text{ ppm} \\ 501.0912 \text{ ppm} \times \left(\frac{9 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) &= 450.9820 \text{ ppm} \\ 501.0912 \text{ ppm} \times \left(\frac{8 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) &= 400.872 \text{ ppm} \\ 501.0912 \text{ ppm} \times \left(\frac{7 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) &= 350.763 \text{ ppm} \\ 501.0912 \text{ ppm} \times \left(\frac{6 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) &= 300.654 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$501.0912 \text{ ppm} \times \left(\frac{5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 250.545 \text{ ppm}$$

$$501.0912 \text{ ppm} \times \left(\frac{4 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 200.436 \text{ ppm}$$

$$501.0912 \text{ ppm} \times \left(\frac{3 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 150.327 \text{ ppm}$$

Rango de concentraciones de 640-32 ppm

$$\left(\frac{0.9144 \text{ g}}{\text{mL}} \right) \times \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) \times \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \right) = 914400 \text{ ppm}$$

$$\left(\frac{914400 \mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \times \left(\frac{0.35 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} \right) \times \left(\frac{10 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \right) = 640.08 \text{ ppm}$$

$$640.08 \text{ ppm} \times \left(\frac{9 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 576.072 \text{ ppm}$$

$$640.08 \text{ ppm} \times \left(\frac{8 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 512.064 \text{ ppm}$$

$$640.08 \text{ ppm} \times \left(\frac{7 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 448.056 \text{ ppm}$$

$$640.08 \text{ ppm} \times \left(\frac{6 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 384.048 \text{ ppm}$$

$$640.08 \text{ ppm} \times \left(\frac{5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 320.04 \text{ ppm}$$

$$640.08 \text{ ppm} \times \left(\frac{4 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 256.032 \text{ ppm}$$

$$640.08 \text{ ppm} \times \left(\frac{3 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 192.024 \text{ ppm}$$

$$640.08 \text{ ppm} \times \left(\frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 128.016 \text{ ppm}$$

$$640.08 \text{ ppm} \times \left(\frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 64.008 \text{ ppm}$$

$$640.08 \text{ ppm} \times \left(\frac{0.5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 32.004 \text{ ppm}$$

10.4.1.4 Aceite de Romero

Datos

Densidad: 0.7959 g/mL

Rango de concentraciones de 100-1 ppm

$$\left(\frac{0.7959 \text{ g}}{\text{mL}}\right) \times \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}\right) \times \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}}\right) = 795900 \text{ ppm}$$
$$\left(\frac{795900 \mu\text{g}}{\text{mL}}\right) \times \left(\frac{0.064 \text{ mL}}{50 \text{ mL}}\right) \times \left(\frac{10 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}\right) = 101.8752 \text{ ppm}$$
$$101.8752 \text{ ppm} \times \left(\frac{9 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 91.6876 \text{ ppm}$$
$$101.8752 \text{ ppm} \times \left(\frac{8 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 81.5001 \text{ ppm}$$
$$101.8752 \text{ ppm} \times \left(\frac{7 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 71.3126 \text{ ppm}$$
$$101.8752 \text{ ppm} \times \left(\frac{6 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 61.1251 \text{ ppm}$$
$$101.8752 \text{ ppm} \times \left(\frac{5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 50.9376 \text{ ppm}$$
$$101.8752 \text{ ppm} \times \left(\frac{4 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 40.7500 \text{ ppm}$$
$$101.8752 \text{ ppm} \times \left(\frac{3 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 30.5626 \text{ ppm}$$
$$101.8752 \text{ ppm} \times \left(\frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 20.3750 \text{ ppm}$$
$$101.8752 \text{ ppm} \times \left(\frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 10.1875 \text{ ppm}$$
$$101.8752 \text{ ppm} \times \left(\frac{0.1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 1.0187 \text{ ppm}$$

Rango de concentraciones de 668-66 ppm

$$\begin{aligned} & \left(\frac{0.7959 \text{ g}}{\text{mL}} \right) \times \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) \times \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \right) = 795900 \text{ ppm} \\ & \left(\frac{795900 \mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \times \left(\frac{0.42 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} \right) \times \left(\frac{10 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \right) = 668.556 \text{ ppm} \\ & 668.556 \text{ ppm} \times \left(\frac{9 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 601.7004 \text{ ppm} \\ & 668.556 \text{ ppm} \times \left(\frac{8 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 534.8448 \text{ ppm} \\ & 668.556 \text{ ppm} \times \left(\frac{7 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 467.9892 \text{ ppm} \\ & 668.556 \text{ ppm} \times \left(\frac{6 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 401.1336 \text{ ppm} \\ & 668.556 \text{ ppm} \times \left(\frac{5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 334.278 \text{ ppm} \\ & 668.556 \text{ ppm} \times \left(\frac{4 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 267.4224 \text{ ppm} \\ & 668.556 \text{ ppm} \times \left(\frac{3 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 200.5668 \text{ ppm} \\ & 668.556 \text{ ppm} \times \left(\frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 133.7172 \text{ ppm} \\ & 668.556 \text{ ppm} \times \left(\frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 66.8556 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Rango de concentraciones de 206-124 ppm

$$\begin{aligned} & \left(\frac{0.7959 \text{ g}}{\text{mL}} \right) \times \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) \times \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \right) = 795900 \text{ ppm} \\ & \left(\frac{795900 \mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \times \left(\frac{0.13 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} \right) \times \left(\frac{10 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \right) = 206.934 \text{ ppm} \\ & 206.934 \text{ ppm} \times \left(\frac{9 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 186.2406 \text{ ppm} \\ & 206.934 \text{ ppm} \times \left(\frac{8 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 165.547 \text{ ppm} \\ & 206.934 \text{ ppm} \times \left(\frac{7 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 144.8528 \text{ ppm} \\ & 206.934 \text{ ppm} \times \left(\frac{6 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 124.1604 \text{ ppm} \end{aligned}$$

10.4.1.5 Aceite de epazote

Datos

Densidad: 0.9134 g/mL

$$\left(\frac{0.9134 \text{ g}}{\text{mL}}\right) \times \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}\right) \times \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}}\right) = 913400 \text{ ppm}$$

$$\left(\frac{913400 \mu\text{g}}{\text{mL}}\right) \times \left(\frac{0.055 \text{ mL}}{50 \text{ mL}}\right) \times \left(\frac{10 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}\right) = 100.474 \text{ ppm}$$

$$100.474 \text{ ppm} \times \left(\frac{9 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 90.4266 \text{ ppm}$$

$$100.474 \text{ ppm} \times \left(\frac{8 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 80.3792 \text{ ppm}$$

$$100.474 \text{ ppm} \times \left(\frac{7 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 70.3318 \text{ ppm}$$

$$100.474 \text{ ppm} \times \left(\frac{6 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 60.2844 \text{ ppm}$$

$$100.474 \text{ ppm} \times \left(\frac{5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 50.237 \text{ ppm}$$

$$100.474 \text{ ppm} \times \left(\frac{4 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 40.1896 \text{ ppm}$$

$$100.474 \text{ ppm} \times \left(\frac{3 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 30.1422 \text{ ppm}$$

$$100.474 \text{ ppm} \times \left(\frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 20.0948 \text{ ppm}$$

$$100.474 \text{ ppm} \times \left(\frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 10.0474 \text{ ppm}$$

$$100.474 \text{ ppm} \times \left(\frac{0.1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right) = 1.0047 \text{ ppm}$$

10.5 ANEXO E

10.5.1 Control de calidad de los quistes y nauplis de 24hrs. de eclosión

Tabla 33. Tamaño promedio de los quistes

# de individuo	Tamaño en μm .
1	230
2	200
3	210
4	220
5	220
6	240
7	240
8	230
9	230
10	240
11	230
12	230
13	210
14	240
15	230
16	230
17	250
18	240
19	220
20	230
21	250
22	230
23	220
24	260
25	240
26	240
27	240
28	230
29	230
30	230
31	240
32	240

33	250
34	200
35	210
36	250
37	230
38	230
39	230
40	230
41	230
42	230
43	230
44	230
45	230
46	240
47	220
48	220
49	220
50	230
51	240
52	240
53	230
54	250
55	240
56	260
57	230
58	230
59	230
60	230
61	240
62	230
63	230
64	240
65	230
66	220
67	230

68	230
69	220
70	220
71	230
72	220
73	210
74	210
75	240
76	220
77	230
78	240
79	230
80	230
81	240
82	230
83	210
84	220
85	230
86	230
87	220
88	240
89	220
90	230
91	240
92	250
93	240
94	230
95	240
96	220
97	230
98	240
99	220
100	230
Suma	23070
Promedio	230.7mm

Tabla 34. Tamaño promedio de los nauplis

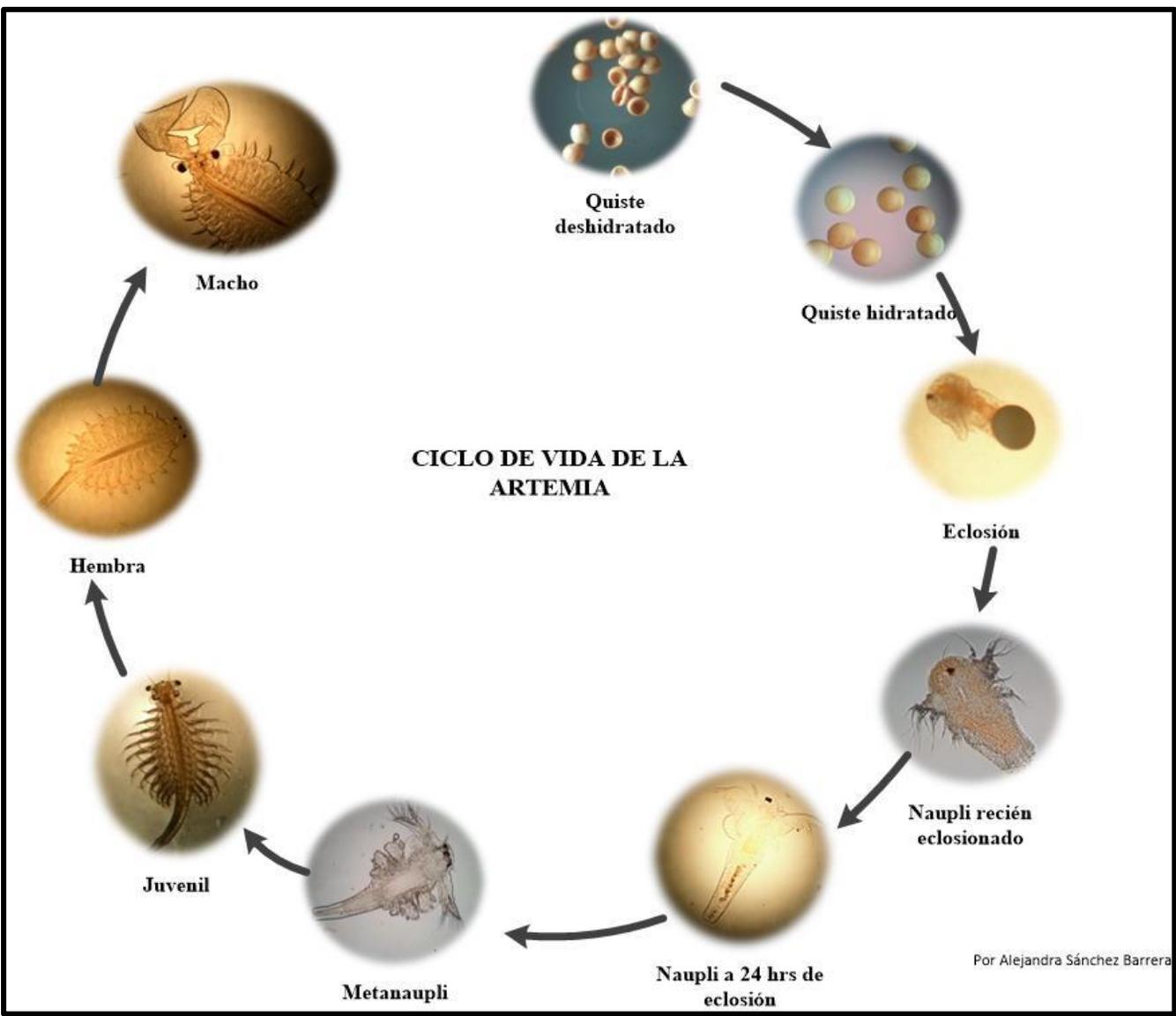
# de individuo	Tamaño en μm
1	780
2	820
3	700
4	550
5	720
6	770
7	900
8	820
9	550
10	760
11	810
12	610
13	500
14	930
15	450
16	910
17	760
18	880
19	820
20	860
21	550
22	770
23	810
24	820
25	830
26	800
27	690
28	860
29	810
30	700
31	710
32	570
33	500
34	600

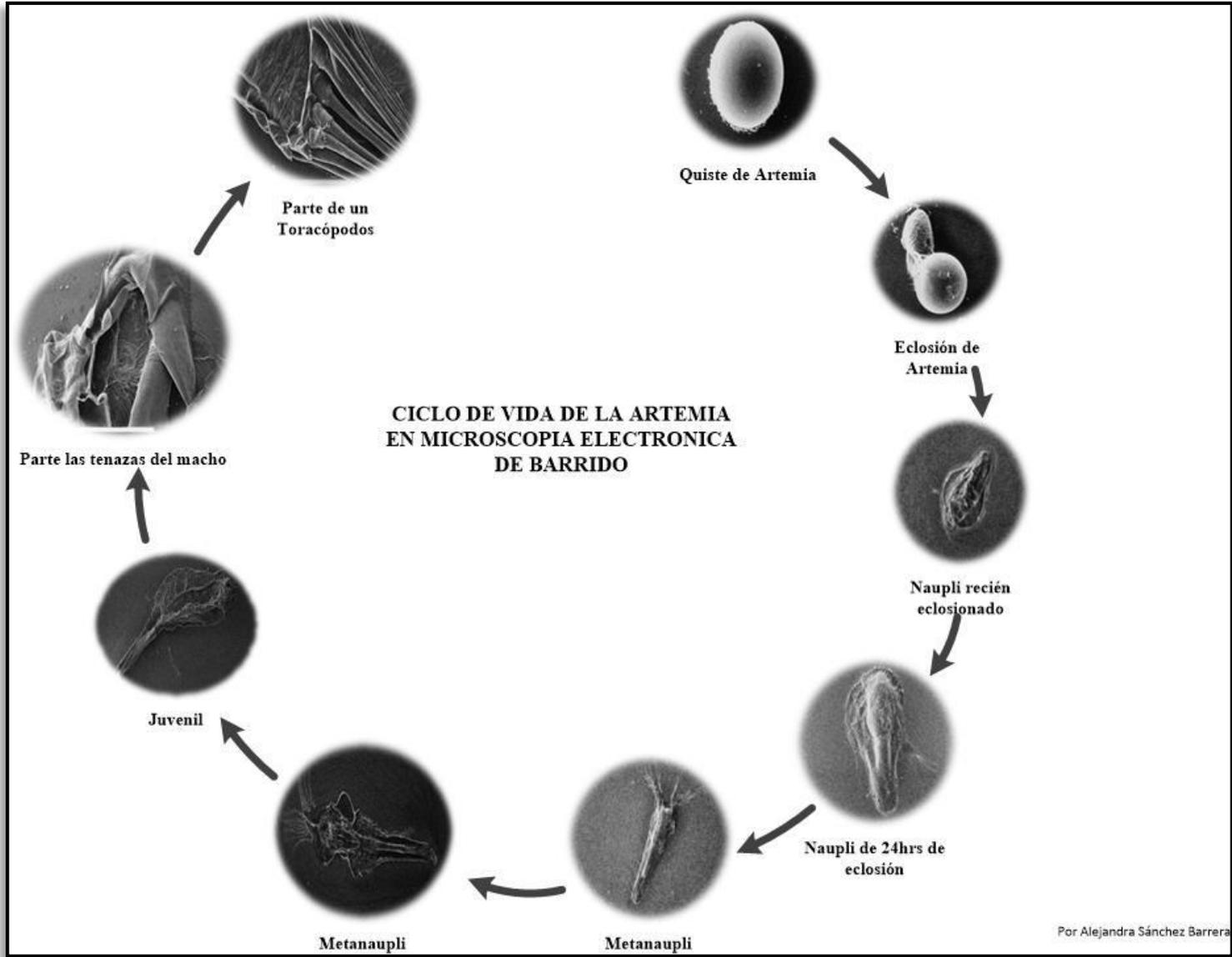
35	460
36	800
37	900
38	540
39	510
40	740
41	610
42	680
43	710
44	660
45	520
46	600
47	810
48	880
49	860
50	840
51	840
52	840
53	850
54	570
55	850
56	700
57	840
58	840
59	840
60	810
61	840
62	420
63	510
64	860
65	700
66	750
67	810
68	700
69	610
70	750
71	850

72	660
73	540
74	770
75	800
76	790
77	810
78	820
79	860
80	690
81	800
82	860
83	790
84	710
85	740
86	870
87	790
88	690
89	910
90	810
91	600
92	910
93	810
94	850
95	730
96	710
97	760
98	670
99	850
100	950
Suma	74370
Promedio	743.7mm

10.6 ANEXO F

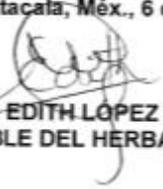
10.6.1 Series fotográficas





10.7 ANEXO G

10.7.1 Certificados y fotografías de identificación de las plantas utilizadas

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA HERBARIO IZTACALA		
		FESI/IZTA/006/2012	
 A. JANNINE PÉREZ SANTIAGO, ANA LUISA SILVA CASTAÑEDA Y ALEJANDRA SÁNCHEZ BARRERA, FES-CUAUTITLÁN, UNAM P R E S E N T E S .			
 Por este conducto me permito entregar a ustedes la identificación taxonómica del material botánico de respaldo del Proyecto de Tesis intitulado: " Aceites esenciales como inhibidores de radicales libres ", realizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Sección de Tecnología Farmacéutica del Departamento de Ingeniería y Tecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM (Campo 1) y bajo la dirección de la Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enriquez. Así mismo, les informo que las plantas y muestras de mercado han sido integradas en la Colección Etnobotánica del Herbario Iztacala con los siguientes números de registro (se anexa listado).			
Sin otro particular, les envío un cordial saludo.			
 ATENTAMENTE "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU" Los Reyes Iztacala, Méx., 6 de marzo de 2012			
			
M. EN C. MA. EDITH LÓPEZ VILAFRANCO RESPONSABLE DEL HERBARIO IZTACALA			
Ccp: Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enriquez, Presente.			
 <small>Air De los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlaxtepec, Edo. de México. C.P. 54090, A.P. 514, Tel/Fax: 5023-1378. herbario_izta@compus.iztacala.unam.mx</small>			



Listado de identificación de plantas y muestras de mercado:
Proyecto de Tesis "Aceites esenciales como inhibidores de radicales libres"

NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	NOMBRE POPULAR	NO. REGISTRO
<i>Artemisia absinthium</i> L.	ASTERACEAE/ COMPOSITAE	"Ajenjo" (planta)	2057 IZTA
<i>Schinus molle</i> L.	ANACARDIACEAE	"Pirul" (planta)	2058 IZTA
<i>Tagetes lucida</i> Cav.	ASTERACEAE/ COMPOSITAE	"Pericón" (planta)	2059 IZTA
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	RUTACEAE	"Limón" (planta)	2060 IZTA
<i>Agastache mexicana</i> (Kunth.) Lint. & Epling ssp. <i>xolocotzi</i>	LAMIACEAE/LABIATAE	"Toronjil blanco" (planta)	2061 IZTA
<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh.	MYRTACEAE	"Eucalipto" (planta)	2062 IZTA
<i>Agastache mexicana</i> (Kunth.) Lint. & Epling	LAMIACEAE/LABIATAE	"Toronjil morado" (planta)	2063 IZTA
<i>Citrus x paradisi</i> Macfady	RUTACEAE	"Toronja" (planta)	2064 IZTA
<i>Citrus reticulata</i> Blanco	RUTACEAE	"Mandarina" (planta)	2065 IZTA
<i>Myristica fragans</i> Hoult	MYRISTICACEAE	"Nuez moscada" (muestra de mercado)	2066 IZTA
<i>Coriandrum sativum</i> L.	APIACEAE/ UMBELLIFERAE	"Semilla de cilantro" (muestra de mercado)	2067 IZTA
<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merrill	MYRTACEAE	"Pimienta" (muestra de mercado)	2068 IZTA
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merril & L.M. Perry	MYRTACEAE	"Clavo" (muestra de Mercado)	2069 IZTA
<i>Elettaria cardamomum</i> (L.) Maton	ZINGEBERACEAE	"Semilla de Cardamomo" (muestra de mercado)	2070 IZTA
<i>Juniperus</i> sp	CUPRESSACEAE	"Enebro" (muestra de mercado)	2071 IZTA
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	VERBENACEAE	"Orégano" (muestra de mercado)	2072 IZTA
<i>Illicium verum</i> Hooker	ILLIACIACEAE	"Anís estrella" (muestra de mercado)	2073 IZTA



FESI/HI/32/2013

ALEJANDRA SÁNCHEZ BARRERA,
 AMÉRICA JANNINE PÉREZ SANTIAGO Y
 ANA LUISA SILVA CASTAÑEDA,
 Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM
 Presente.

Por este conducto me permito proporcionar a usted la identificación taxonómica del material botánico de respaldo de trabajo de tesis: "Toxicidad aguda en *Artemia franciscana* Kellogg de aceites esenciales aislados de cinco especies", que se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales de la Sección de Tecnología Farmacéutica del Departamento de Ingeniería y Tecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Campo 1) y bajo la dirección de la QFB Brígida del Carmen Camacho Enríquez.

Así mismo, les informo que las plantas han sido integradas en la Colección Etnobotánica del Herbario Iztacala con los siguientes números de registro:

NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	NOMBRE POPULAR	NO. DE REGISTRO
<i>Litsea glaucescens</i> H.B.K.	Lauraceae	"Laurel"	2189 IZTA
<i>Teloxys ambrosioides</i> (L.) W.A. Weber Sin: <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Chenopodiaceae	"Epazote"	2190 IZTA
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC. ex Nees) Stapf	Poaceae/Graminae	"Té limón"	2191 IZTA
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae/Labiatae	"Romero"	2192 IZTA

Sin otro particular, les envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 Los Reyes Iztacala, Edo. de México., 26 de junio de 2013

M. EN C. MA. EDITH LÓPEZ VILLAFRANCO
 RESPONSABLE DEL HERBARIO IZTACALA



Ccp: QFB Brígida del Carmen Camacho Enríquez, Directora de Tesis, FESI, Presente



Edificio de gobierno, primer piso
 Tel: 5623-1147 - 5623-1145
 Fax: 5623-1145
 Av. de los Reyes 571, Los Reyes Iztacala,
 Toluquense, CP 54090,
 Estado de México, México.

Herbario IZTA
 Edificio I.A. Planta baja
 Av. de los Reyes No. 1
 Los Reyes Iztacala, Toluquense
 Estado de México, CP 54090 México
 Tel/Fax: 5623-1275
 herbario_izta@campus.cinvestav.mx





Fotografía 33. *Syzygium aromaticum*.

HERBARIO IZTA	FLORA ÚTIL DE MEXICO	FES-IZTACALA
Nº REG. 2069	FAM.: MYRTACEAE	
N.C.: <i>Syzygium</i>	<i>aromaticum</i>	(L.) Merril & L.M. Perry
N.P.: "Clavo" (muestra de mercado).		
EDO. Distrito Federal	MPIO.	
LOC.: Mercado de Sonora		
TIPO DE VEG.:		
COORD. 19°25'20.93"	y 99°07'35.35"	ALT.: 2230 m.s.n.m
OBS.: Tesis QFB (FES-Cuautitlán, UNAM): "Aceites esenciales como inhibidores de radicales libres".		
COL. A.Jannine Pérez Santiago, Ana Luisa Silva Castañeda, Alejandra Sánchez Barrera.		
Nº DE COL:	FECHA: 5 / Octubre / 2011	
DET.: Patricia Jácquez Ríos		
USOS:		

Figura 39. Ficha de identidad del clavo.



Fotografía 34. *Teloxys ambrosioides*.

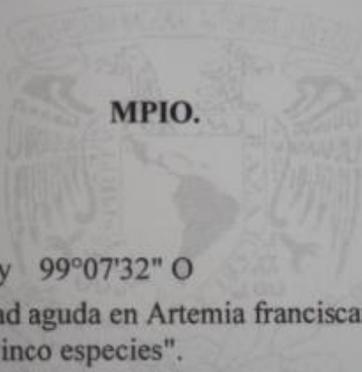
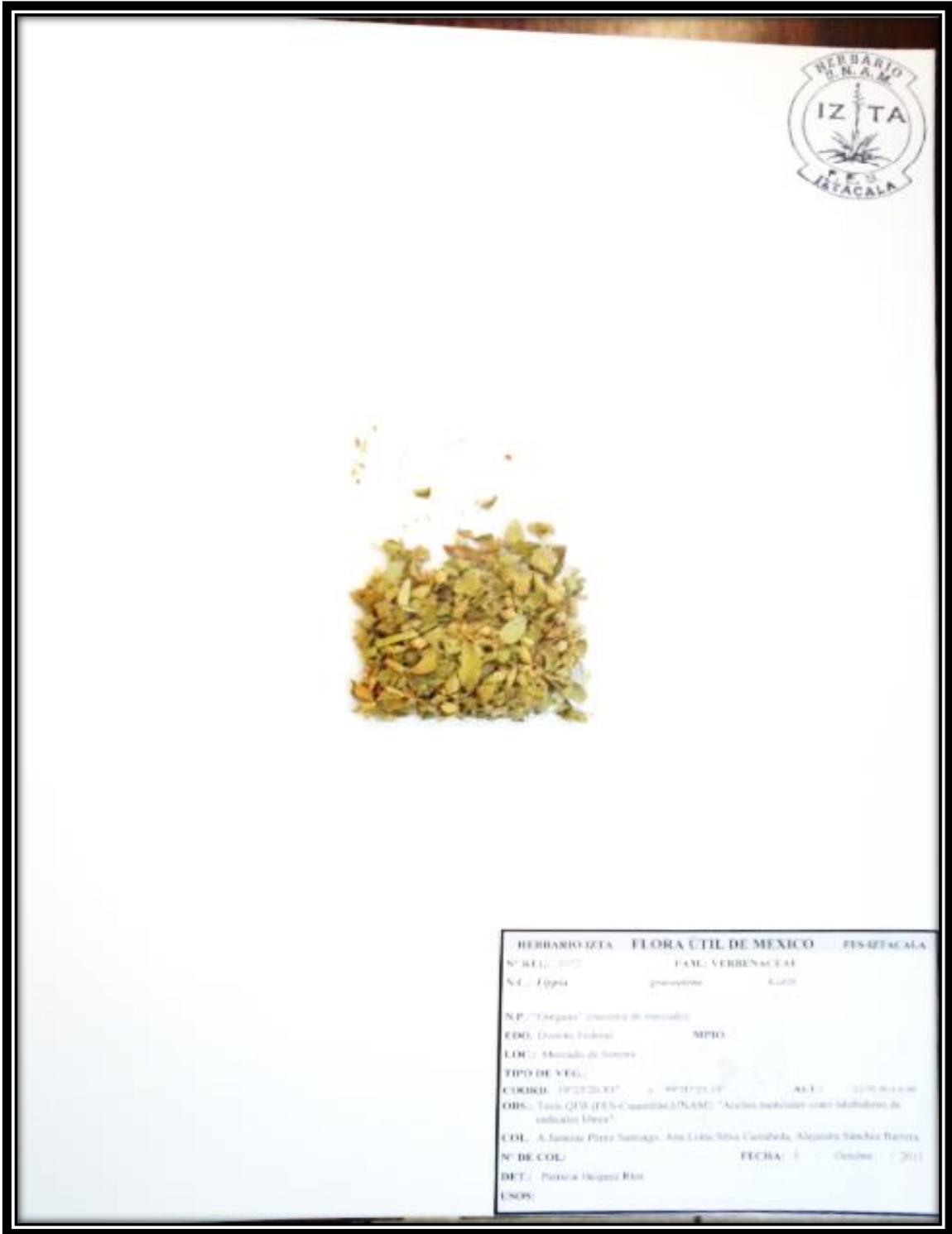
HERBARIO IZTA	FLORA ÚTIL DE MEXICO	FES-IZTACALA
Nº REG. 2190	FAM.: CHENOPODIACEAE	
N.C.: <i>Teloxys</i>	<i>ambrosioides</i>	(L.) W.A. Weber
N.P.: Epazote		
EDO. Distrito Federal		
LOC.: Mercado Sonora	MPIO.	
TIPO DE VEG.:		
COORD. 19°25'29" N	y 99°07'32" O	ALT.: 2228 m.s.n.m
OBS.: Tesis FES-C: "Toxicidad aguda en Artemia franciscana Kellogg de aceites esenciales aislados de cinco especies".		
COL. Alejandra Sánchez Barrera, América J. Pérez Santiago y Ana Luisa Castañeda Silva		
Nº DE COL: s.n.	FECHA:	/ Marzo / 2013
DET.: Patricia Jácquez Ríos		
USOS: Medicinal		

Figura 40. Ficha de identidad del epazote.

HERBARIO IZTA	FLORA ÚTIL DE MEXICO	FES-IZTACALA
N° REG. 2189	FAM.: LAURACEAE	
N.C.: <i>Litsea</i>	<i>glaucescens</i>	H.B.K.
N.P.: Laurel	MPIO.	
EDO. Distrito Federal		
LOC.: Mercado Sonora		
TIPO DE VEG.:		
COORD. 19°25'29" N	y 99°07'32" O	ALT.: 2228 m.s.n.m
OBS.: Tesis FES-C: "Toxicidad aguda en Artemia franciscana Kellogg de aceites esenciales aislados de cinco especies".		
COL. Alejandra Sánchez Barrera, América Jannine Pérez Santiago y Ana Luisa Castañe		
N° DE COL: s.n.	FECHA:	/ Marzo / 2013
DET.: Patricia Jácquez Ríos		
USOS: Medicinal		

Figura 41. Ficha de identidad del laurel.



Fotografía 36. *Lippia graveolens*.

HERBARIO IZTA	FLORA ÚTIL DE MEXICO	FES-IZTACALA
N° REG. 2072	FAM.: VERBENACEAE	
N.C.: <i>Lippia</i>	<i>graveolens</i>	Kunth
N.P.: "Orégano" (muestra de mercado).		
EDO. Distrito Federal	MPIO.	
LOC.: Mercado de Sonora		
TIPO DE VEG.:		
COORD. 19°25'20.93"	y 99°07'35.35"	ALT.: 2230 m.s.n.m
OBS.: Tesis QFB (FES-Cuautitlán, UNAM): "Aceites esenciales como inhibidores de radicales libres".		
COL. A.Jannine Pérez Santiago, Ana Luisa Silva Castañeda, Alejandra Sánchez Barrera.		
N° DE COL:	FECHA: 5 / Octubre / 2011	
DET.: Patricia Jácquez Ríos		
USOS:		

Figura 42. Ficha de identidad del orégano.



Fotografía 37. *Rosmarinus officinalis*.

HERBARIO IZTA	FLORA ÚTIL DE MEXICO	FES-IZTACALA
N° REG. 2192	FAM.: LAMIACEAE	
N.C.: <i>Rosmarinus</i>	<i>officinalis</i>	L.
N.P.: Romero	MPIO.	
EDO. Distrito Federal		
LOC.: Mercado Sonora		
TIPO DE VEG.:		
COORD. 19°25'29" N	y 99°07'32" O	ALT.: 2228 m.s.n.m
OBS.: Tesis FES-C: "Toxicidad aguda en Artemia franciscana Kellogg de aceites esenciales aislados de cinco especies".		
COL. Alejandra Sánchez Barrera, América Jannine Pérez Santiago y Ana Luisa Castañe		
N° DE COL: s.n.	FECHA:	/ Marzo / 2013
DET.: Patricia Jáquez Ríos		
USOS: Medicinal		

Figura 43. Ficha de identidad del romero.

10.8 ANEXO H

10.8.1 Análisis probit

10.8.1.1 Aceite esencial de clavo

Tabla 35. Estimaciones de los parámetros (AEC).

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a	Dosis(ppm)	2.627	.328	8.014	.000	1.984	3.269
	Intersección	-4.401	.626	-7.036	.000	-5.027	-3.776

a. Modelo PROBIT: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + \text{BX}$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

Tabla 36. Covarianzas y correlaciones de estimaciones de los parámetros (AEC).

		Dosis(ppm)	Respuesta natural
PROBIT	Dosis(ppm)	.107	.475
	Respuesta natural	.013	.007

Covarianzas (abajo) y correlaciones (arriba).

Tabla 37. Contrastes de chi-cuadrado (AEC).

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	6.312	8	.612 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que .050, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Tabla 38. Residuos y frecuencias de casillas (AEC).

	Número	Dosis(ppm)	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT	1	.000	40	0	.000	.000	.000
	2	1.000	40	0	1.519	-1.519	.038
	3	1.301	40	5	6.503	-1.503	.163
	4	1.477	40	14	12.041	1.959	.301
	5	1.602	40	21	16.934	4.066	.423
	6	1.699	40	24	20.977	3.023	.524
	7	1.778	40	25	24.245	.755	.606
	8	1.845	40	26	26.874	-.874	.672
	9	1.903	40	27	28.995	-1.995	.725
	10	1.954	40	29	30.713	-1.713	.768
	11	2.000	40	31	32.115	-1.115	.803

Tabla 39. Límites de confianza (AEC).

	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis(ppm)			Límites de confianza al 95% para log(Dosis(ppm)) ^a		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	.010	6.165	2.658	10.412	.790	.425	1.018
	.020	7.829	3.634	12.659	.894	.560	1.102
	.030	9.111	4.431	14.335	.960	.647	1.156
	.040	10.212	5.142	15.744	1.009	.711	1.197
	.050	11.205	5.803	16.995	1.049	.764	1.230
	.060	12.126	6.432	18.140	1.084	.808	1.259
	.070	12.995	7.037	19.209	1.114	.847	1.284
	.080	13.826	7.627	20.222	1.141	.882	1.306
	.090	14.628	8.206	21.191	1.165	.914	1.326
	.100	15.407	8.777	22.126	1.188	.943	1.345
	.150	19.101	11.583	26.482	1.281	1.064	1.423
	.200	22.658	14.420	30.591	1.355	1.159	1.486
	.250	26.233	17.378	34.666	1.419	1.240	1.540
	.300	29.923	20.521	38.839	1.476	1.312	1.589
	.350	33.803	23.903	43.217	1.529	1.378	1.636
	.400	37.949	27.582	47.903	1.579	1.441	1.680
	.450	42.444	31.622	53.018	1.628	1.500	1.724
	.500	47.387	36.095	58.713	1.676	1.557	1.769
	.550	52.905	41.096	65.187	1.723	1.614	1.814
	.600	59.172	46.742	72.721	1.772	1.670	1.862
.650	66.429	53.196	81.729	1.822	1.726	1.912	
.700	75.043	60.693	92.846	1.875	1.783	1.968	
.750	85.596	69.605	107.108	1.932	1.843	2.030	
.800	99.103	80.578	126.359	1.996	1.906	2.102	
.850	117.560	94.886	154.312	2.070	1.977	2.188	
.900	145.742	115.551	200.150	2.164	2.063	2.301	
.910	153.506	121.046	213.367	2.186	2.083	2.329	
.920	162.409	127.260	228.811	2.211	2.105	2.359	
.930	172.797	134.402	247.195	2.238	2.128	2.393	
.940	185.186	142.783	269.610	2.268	2.155	2.431	
.950	200.403	152.897	297.832	2.302	2.184	2.474	
.960	219.886	165.591	335.004	2.342	2.219	2.525	
.970	246.453	182.499	387.436	2.392	2.261	2.588	
.980	286.803	207.444	470.588	2.458	2.317	2.673	
.990	364.226	253.352	640.617	2.561	2.404	2.807	

a. Base del logaritmo = 10.

10.8.1.2 Aceite esencial de Epazote

Tabla 40. Estimaciones de los parámetros (AEE).

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a	Dosis(ppm)	4.434	.710	6.245	.000	3.042	5.826
	Intersección	-8.377	1.386	-6.045	.000	-9.763	-6.992

a. Modelo PROBIT: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

Tabla 41. Covarianzas y correlaciones de estimaciones de los parámetros (AEE).

		Dosis(ppm)	Respuesta natural
PROBIT	Dosis(ppm)	.504	.663
	Respuesta natural	.030	.004

Covarianzas (abajo) y correlaciones (arriba).

Tabla 42. Contrastes de chi-cuadrado (AEE).

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	5.204	8	.736 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que .050, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Tabla 43. Residuos y frecuencias de casillas (AEE).

	Número	Dosis(ppm)	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT	1	.000	40	0	.000	.000	.000
	2	1.000	40	0	.002	-.002	.000
	3	1.301	40	0	.182	-.182	.005
	4	1.477	40	0	1.351	-1.351	.034
	5	1.602	40	7	4.054	2.946	.101
	6	1.699	40	9	7.972	1.028	.199
	7	1.778	40	10	12.440	-2.440	.311
	8	1.845	40	17	16.889	.111	.422
	9	1.903	40	22	20.972	1.028	.524
	10	1.954	40	23	24.529	-1.529	.613
	11	2.000	40	28	27.526	.474	.688

Tabla 44. Límites de confianza (AEE).

	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis(ppm)			Límites de confianza al 95% para log(Dosis(ppm)) ^a		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	.010	23.158	12.349	32.443	1.365	1.092	1.511
	.020	26.679	15.147	36.210	1.426	1.180	1.559
	.030	29.186	17.238	38.834	1.465	1.236	1.589
	.040	31.226	18.996	40.938	1.495	1.279	1.612
	.050	32.990	20.555	42.740	1.518	1.313	1.631
	.060	34.570	21.980	44.340	1.539	1.342	1.647
	.070	36.018	23.308	45.796	1.557	1.368	1.661
	.080	37.365	24.564	47.144	1.572	1.390	1.673
	.090	38.634	25.762	48.408	1.587	1.411	1.685
	.100	39.840	26.915	49.605	1.600	1.430	1.696
	.150	45.248	32.238	54.929	1.656	1.508	1.740
	.200	50.066	37.162	59.640	1.700	1.570	1.776
	.250	54.605	41.927	64.087	1.737	1.622	1.807
	.300	59.031	46.658	68.459	1.771	1.669	1.835
	.350	63.452	51.433	72.896	1.802	1.711	1.863
	.400	67.953	56.306	77.521	1.832	1.751	1.889
	.450	72.612	61.318	82.466	1.861	1.788	1.916
	.500	77.508	66.499	87.886	1.889	1.823	1.944
	.550	82.735	71.878	93.975	1.918	1.857	1.973
	.600	88.406	77.493	100.979	1.946	1.889	2.004
.650	94.678	83.407	109.225	1.976	1.921	2.038	
.700	101.769	89.736	119.164	2.008	1.953	2.076	
.750	110.018	96.688	131.473	2.041	1.985	2.119	
.800	119.993	104.628	147.293	2.079	2.020	2.168	
.850	132.767	114.253	168.824	2.123	2.058	2.227	
.900	150.790	127.112	201.261	2.178	2.104	2.304	
.910	155.498	130.365	210.090	2.192	2.115	2.322	
.920	160.779	133.972	220.158	2.206	2.127	2.343	
.930	166.793	138.028	231.827	2.222	2.140	2.365	
.940	173.776	142.676	245.639	2.240	2.154	2.390	
.950	182.098	148.137	262.456	2.260	2.171	2.419	
.960	192.386	154.781	283.763	2.284	2.190	2.453	
.970	205.834	163.307	312.439	2.314	2.213	2.495	
.980	225.176	175.297	355.248	2.353	2.244	2.551	
.990	259.419	195.858	435.268	2.414	2.292	2.639	

a. Base del logaritmo = 10.

10.8.1.3 Aceite esencial de Laurel

Tabla 45. Estimaciones de los parámetros (AEL).

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT	Dosis (ppm)	7.065	1.131	6.248	.000	4.849	9.282
	Intersección	-17.939	2.972	-6.037	.000	-20.910	-14.967

a. Modelo PROBIT: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + \text{BX}$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

Tabla 46. Covarianzas y correlaciones de estimaciones de los parámetros (AEL).

		Dosis (ppm)	Respuesta natural
PROBIT	Dosis (ppm)	1.279	.610
	Respuesta natural	.017	.001

Tabla 47. Contrastes de chi-cuadrado (AEL).

		Chi-cuadrado	gl	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	18.715	8	.016

Tabla 48. Residuos y frecuencias de casillas (AEL).

	Número	Dosis (ppm)	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT	1	1.505	40	0	2.064	-2.064	.052
	2	1.806	40	0	2.064	-2.064	.052
	3	2.107	40	5	2.107	2.893	.053
	4	2.283	40	6	3.407	2.593	.085
	5	2.408	40	11	8.808	2.192	.220
	6	2.505	40	12	17.446	-5.446	.436
	7	2.584	40	25	25.797	-.797	.645
	8	2.651	40	32	31.889	.111	.797
	9	2.709	40	34	35.657	-1.657	.891
	10	2.760	40	40	37.767	2.233	.944
	11	2.806	40	40	38.880	1.120	.972

Tabla 49. Límites de confianza (AEL).

	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis (ppm)			Límites de confianza al 95% para log(Dosis (ppm))		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	.010	162.084	46.134	232.180	2.210	1.664	2.366
	.020	177.142	56.498	246.074	2.248	1.752	2.391
	.030	187.414	64.241	255.354	2.273	1.808	2.407
	.040	195.532	70.751	262.590	2.291	1.850	2.419
	.050	202.393	76.524	268.644	2.306	1.884	2.429
	.060	208.423	81.804	273.923	2.319	1.913	2.438
	.070	213.858	86.728	278.650	2.330	1.938	2.445
	.080	218.844	91.383	282.963	2.340	1.961	2.452
	.090	223.479	95.831	286.954	2.349	1.982	2.458
	.100	227.833	100.112	290.687	2.358	2.000	2.463
	.150	246.780	119.922	306.799	2.392	2.079	2.487
	.200	262.956	138.337	320.442	2.420	2.141	2.506
	.250	277.676	156.275	332.840	2.444	2.194	2.522
	.300	291.596	174.239	344.617	2.465	2.241	2.537
	.350	305.117	192.570	356.184	2.484	2.285	2.552
	.400	318.526	211.542	367.872	2.503	2.325	2.566
	.450	332.061	231.391	380.010	2.521	2.364	2.580
	.500	345.942	252.329	392.991	2.539	2.402	2.594
	.550	360.403	274.534	407.344	2.557	2.439	2.610
	.600	375.717	298.109	423.867	2.575	2.474	2.627
	.650	392.229	323.009	443.834	2.594	2.509	2.647
	.700	410.416	348.939	469.319	2.613	2.543	2.671
	.750	430.991	375.393	503.602	2.634	2.574	2.702
	.800	455.117	402.073	551.703	2.658	2.604	2.742
	.850	484.949	429.720	621.959	2.686	2.633	2.794
	.900	525.278	461.199	732.650	2.720	2.664	2.865
	.910	535.511	468.502	763.255	2.729	2.671	2.883
	.920	546.854	476.365	798.294	2.738	2.678	2.902
.930	559.604	484.954	839.041	2.748	2.686	2.924	
.940	574.196	494.509	887.408	2.759	2.694	2.948	
.950	591.302	505.399	946.429	2.772	2.704	2.976	
.960	612.053	518.231	1021.335	2.787	2.715	3.009	
.970	638.563	534.130	1122.275	2.805	2.728	3.050	
.980	675.590	555.588	1273.062	2.830	2.745	3.105	
.990	738.356	590.422	1554.870	2.868	2.771	3.192	

10.8.1.4 Aceite esencial de orégano

Tabla 50. Estimaciones de los parámetros (AEO).

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a	Dosis(ppm)	6.032	.791	7.627	.000	4.482	7.582
	Intersección	-9.215	1.350	-6.823	.000	-10.565	-7.864

a. Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

Tabla 51. Covarianzas y correlaciones de estimaciones de los parámetros (AEO).

		Dosis(ppm)	Respuesta natural
PROBIT	Dosis(ppm)	.626	.688
	Respuesta natural	.041	.006

Covarianzas (abajo) y correlaciones (arriba).

Tabla 52. Contrastes de chi-cuadrado (AEO).

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	6.819	8	.556 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que .050, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Tabla 53. Residuos y frecuencias de casillas (AEO).

	Número	Dosis(ppm)	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT	1	.000	40	0	.000	.000	.000
	2	1.000	40	0	.029	-.029	.001
	3	1.301	40	3	3.432	-.432	.086
	4	1.477	40	19	15.208	3.792	.380
	5	1.602	40	24	26.926	-2.926	.673
	6	1.699	40	34	33.970	.030	.849
	7	1.778	40	35	37.383	-2.383	.935
	8	1.845	40	40	38.889	1.111	.972
	9	1.903	40	40	39.529	.471	.988
	10	1.954	40	40	39.798	.202	.995
	11	2.000	40	40	39.912	.088	.998

Tabla 54. Límites de confianza (AEO).

	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis(ppm)			Límites de confianza al 95% para log(Dosis(ppm)) ^a		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	.010	13.867	8.771	18.284	1.142	.943	1.262
	.020	15.388	10.078	19.886	1.187	1.003	1.299
	.030	16.439	11.005	20.976	1.216	1.042	1.322
	.040	17.276	11.757	21.837	1.237	1.070	1.339
	.050	17.988	12.406	22.565	1.255	1.094	1.353
	.060	18.617	12.987	23.204	1.270	1.114	1.366
	.070	19.187	13.517	23.780	1.283	1.131	1.376
	.080	19.712	14.011	24.308	1.295	1.146	1.386
	.090	20.202	14.474	24.799	1.305	1.161	1.394
	.100	20.664	14.915	25.261	1.315	1.174	1.402
	.150	22.691	16.880	27.271	1.356	1.227	1.436
	.200	24.443	18.619	28.993	1.388	1.270	1.462
	.250	26.053	20.247	30.565	1.416	1.306	1.485
	.300	27.589	21.822	32.060	1.441	1.339	1.506
	.350	29.094	23.385	33.520	1.464	1.369	1.525
	.400	30.597	24.962	34.980	1.486	1.397	1.544
	.450	32.125	26.579	36.466	1.507	1.425	1.562
	.500	33.704	28.260	38.008	1.528	1.451	1.580
	.550	35.360	30.031	39.636	1.549	1.478	1.598
	.600	37.126	31.922	41.390	1.570	1.504	1.617
.650	39.045	33.972	43.323	1.592	1.531	1.637	
.700	41.174	36.233	45.510	1.615	1.559	1.658	
.750	43.602	38.779	48.074	1.640	1.589	1.682	
.800	46.474	41.724	51.221	1.667	1.620	1.709	
.850	50.062	45.277	55.352	1.700	1.656	1.743	
.900	54.972	49.886	61.383	1.740	1.698	1.788	
.910	56.229	51.021	62.994	1.750	1.708	1.799	
.920	57.627	52.263	64.817	1.761	1.718	1.812	
.930	59.204	53.640	66.911	1.772	1.729	1.825	
.940	61.016	55.195	69.363	1.785	1.742	1.841	
.950	63.150	56.991	72.310	1.800	1.756	1.859	
.960	65.754	59.136	75.985	1.818	1.772	1.881	
.970	69.102	61.830	80.830	1.839	1.791	1.908	
.980	73.819	65.525	87.855	1.868	1.816	1.944	
.990	81.914	71.654	100.395	1.913	1.855	2.002	

a. Base del logaritmo = 10.

10.8.1.5 Aceite esencial de Romero

Tabla 55. Estimaciones de los parámetros (AER).

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a	Dosis (ppm)	5.250	1.101	4.769	.000	3.092	7.408
	Intersección	-11.531	2.520	-4.576	.000	-14.051	-9.011

a. Modelo PROBIT: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

Tabla 56. Covarianzas y correlaciones de estimaciones de los parámetros (AER).

		Dosis (ppm)	Respuesta natural
PROBIT	Dosis (ppm)	1.212	.907
	Respuesta natural	.058	.003

Covarianzas (abajo) y correlaciones (arriba).

Tabla 57. Contrastes de chi-cuadrado (AER).

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	11.817	8	.160 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que .050, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Tabla 58. Residuos y frecuencias de casillas (AER).

	Número	Dosis (ppm)	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT	1	1.778	40	0	.682	-.682	.017
	2	1.845	40	2	1.421	.579	.036
	3	1.903	40	3	2.588	.412	.065
	4	1.954	40	6	4.186	1.814	.105
	5	2.000	40	9	6.160	2.840	.154
	6	2.093	40	10	11.872	-1.872	.297
	7	2.158	40	13	16.918	-3.918	.423
	8	2.217	40	21	21.832	-.832	.546
	9	2.270	40	23	26.034	-3.034	.651
	10	2.314	40	28	29.296	-1.296	.732
	11	2.427	40	40	35.481	4.519	.887

Tabla 59. Límites de confianza (AER).

	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis (ppm)			Límites de confianza al 95% para log(Dosis (ppm)) ^a		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	.010	56.642	23.834	81.659	1.753	1.377	1.912
	.020	63.835	29.174	88.952	1.805	1.465	1.949
	.030	68.866	33.163	93.922	1.838	1.521	1.973
	.040	72.910	36.518	97.849	1.863	1.563	1.991
	.050	76.373	39.493	101.168	1.883	1.597	2.005
	.060	79.451	42.215	104.086	1.900	1.625	2.017
	.070	82.251	44.753	106.717	1.915	1.651	2.028
	.080	84.842	47.154	109.132	1.929	1.674	2.038
	.090	87.269	49.448	111.379	1.941	1.694	2.047
	.100	89.565	51.657	113.491	1.952	1.713	2.055
	.150	99.730	61.884	122.706	1.999	1.792	2.089
	.200	108.625	71.405	130.621	2.036	1.854	2.116
	.250	116.886	80.693	137.883	2.068	1.907	2.140
	.300	124.839	90.010	144.827	2.096	1.954	2.161
	.350	132.691	99.535	151.674	2.123	1.998	2.181
	.400	140.597	109.412	158.604	2.148	2.039	2.200
	.450	148.695	119.761	165.801	2.172	2.078	2.220
	.500	157.120	130.686	173.489	2.196	2.116	2.239
	.550	166.022	142.254	181.984	2.220	2.153	2.260
	.600	175.584	154.461	191.781	2.244	2.189	2.283
.650	186.047	167.180	203.673	2.270	2.223	2.309	
.700	197.748	180.182	218.854	2.296	2.256	2.340	
.750	211.203	193.384	238.913	2.325	2.286	2.378	
.800	227.265	207.210	265.984	2.357	2.316	2.425	
.850	247.535	222.808	303.829	2.394	2.348	2.483	
.900	275.628	242.577	361.461	2.440	2.385	2.558	
.910	282.879	247.458	377.179	2.452	2.394	2.577	
.920	290.972	252.824	395.103	2.464	2.403	2.597	
.930	300.137	258.810	415.874	2.477	2.413	2.619	
.940	310.716	265.612	440.452	2.492	2.424	2.644	
.950	323.237	273.531	470.357	2.510	2.437	2.672	
.960	338.593	283.073	508.212	2.530	2.452	2.706	
.970	358.476	295.183	559.099	2.554	2.470	2.747	
.980	386.725	311.977	634.939	2.587	2.494	2.803	
.990	435.836	340.215	776.336	2.639	2.532	2.890	

a. Base del logaritmo = 10.