

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



DETERMINACION DE LA TOXICIDAD SUB CRONICA DEL EXTRACTO *n*-  
HEXANICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* (JUANISLAMA) EN  
RATONES NIH

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

GLENDAMAZZALLY GUILLEN LUNA  
ELIZABETH DINORA HERNANDEZ GUZMAN

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE, 2016

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR INTERINO**

LIC. JOSE LUIS ARGUETA ANTILLON

**SECRETARIA GENERAL INTERINA**

DRA. ANA LETICIA ZAVALETA DE AMAYA

**FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**

**DECANO**

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

**SECRETARIO**

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

## **COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION**

### **COORDINADORA GENERAL**

MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez

### **ASESORA DE AREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza

### **AREA DE INDUSTRIA DE ALIMENTOS Y TOXICOLOGIA**

MsD. Nancy Zuleyma González Sosa

### **DOCENTES ASESORES**

Dr. Marvin José Núñez Rivas

MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz

Licdo. Miguel Ángel Moreno Mendoza

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por la salud y la perseverancia que me brindo para concluir esta etapa de mi carrera.

A mi madre María Victoria Luna Ruedas y mi hermana Alejandra Nahielly Salazar Luna por su apoyo incondicional.

A Daniel Cruz por su ayuda incondicional en todo momento y por darme ánimos cuando más lo necesitaba.

Agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mis asesores: MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz, Dr. Marvin J. Núñez y Licdo. Miguel Moreno, por sobre todo su amistad y paciencia en el trayecto de esta investigación.

A las asesoras, MSc. Cecilia Gallardo de Velásquez, Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza y MSd. Nancy Zuleyma González Sosa que con su experiencia brindaron aportaciones importantes a la investigación.

A Licdo. Noel Avalos, Silvia Pérez Martínez, Daniel Alvarenga, Juan Pablo Sánchez por asesorarme a través de sus conocimientos y por su amistad.

Al Licdo. Mario Tolosa por su colaboración en esta investigación.

A mi compañera de tesis, Elizabeth Guzmán por su paciencia y comprensión en momentos críticos de la investigación y por su amistad.

Al equipo del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales y al equipo que labora en CENSALUD.

Al laboratorio Físicoquímico de Aguas: en especial a la Licda. Rosa Miriam Lara quien me ayudo con el manejo del equipo.

A todos mis amigos por confiar y creer en mí y haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidare.

Y a todas las personas que hicieron posible la culminación de este trabajo.

Glenda Mazzally Guillen Luna

“El camino, la verdad y la vida.”(Juan 14:6)

A Dios todopoderoso.

A mi madre Ana Elizabeth Guzmán de Hernández, por su apoyo en la toma de decisiones, por su aliento en cada paso de mi carrera.

A mi padre Carlos Francisco Hernández por ser una base fundamental en mi educación y toma de decisiones

A mi abuelita María Julia Quintanilla de Guzmán por su apoyo incondicional y sus palabras de aliento.

A mi abuelo José Antonio Guzmán (Q.D.D.G), quien en vida me brindo muchos consejos y que aún me cuida.

A mi hermano Carlos Francisco Hernández por su ánimo a seguir adelante.

A mi esposo Emmanuel Enrique Posada a quien Dios envió a mi vida como un rayo de esperanza para seguir adelante con su apoyo incondicional.

A mis docentes directores, MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz, Dr. Marvin J. Núñez y Licdo. Miguel Moreno, por brindarme su amistad y su apoyo, por su tiempo invertido en la investigación y sobre todo su paciencia.

A las asesoras MSc. Cecilia Gallardo de Velásquez, Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza y MSd. Nancy Zuleyma González Sosa por sus diferentes aportes a la investigación, su apoyo y comprensión.

A todas las personas que laboran en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, de la Facultad de Química y Farmacia; y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El

Salvador, por estar acompañándome en el desarrollo de esta investigación, por brindarme su amistad.

A Licdo. Noel Avalos, Silvia Pérez Martínez, Daniel Alvarenga, Juan Pablo Sánchez por brindarme su amistad y consejo.

A mi compañera Glenda Mazzally Guillen por brindarme su amistad, pero sobre todo por tener la mayor paciencia en la realización del proyecto.

A Lcdo. Armando Cerón por brindarme su apoyo incondicional en la realización de la investigación.

A mis amigos Licda. Iris López, Licda. Vanessa Rivera, Licda. Karla Acosta, Licda. Ingrid Calderón, Lic. Billy Barrillas, Lic. Carlos Carranza, Lic. Carlos López, Lic. Marlon Rivera, Guadalupe Amaya, Iris Gómez por su amistad, su apoyo y buen consejo.

A quienes directa e indirectamente me apoyaron en la realización de la presente investigación a todos gracias.

Elizabeth Dinora Hernández Guzmán.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por todas las bendiciones que me ha dado.

A mi madre María Victoria Luna Ruedas por apoyarme en todo momento y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por ser un ejemplo de vida a seguir.

A mi hermana Alejandra Nahielly Salazar Luna por ser parte importante de mi vida.

A mi abuela Zoila María Magdalena Ruedas(Q.D.D.G), que aunque no se encuentre físicamente con nosotros, siempre está presente en mi corazón.

Al amor de mi vida Daniel Cruz, que fue mi mayor apoyo en el transcurso de esta etapa, y por ser parte fundamental en mi vida.

A todos mis amigos por su apoyo y comprensión en todo momento.

A mis docentes directores, MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz, Dr. Marvin J. Núñez y Licdo. Miguel Moreno por haberme dado la oportunidad de crecer profesionalmente y aprender cosas nuevas.

A todas las personas que utilicen este trabajo para el bienestar de la población.

Glenda Mazzally Guillen Luna

A Dios como ser supremo en mi vida.

A mis padres por brindarme la mejor enseñanza de la perseverancia y darme el mejor regalo de la educación.

A toda mi familia y amigos por su apoyo y aliento en cada fase de mi vida.

A mi amado esposo por cada palabra de aliento y su comprensión.

A Amanda Nicole Posada para que con este ejemplo la inspire en su superación personal.

A mis docentes directores, MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz, Dr. Marvin J. Núñez y Licdo. Miguel Moreno, por su apoyo profesional y su inspiración.

A la población que será beneficiada por la presente investigación elaborada con objetividad que sea como una base para futuras investigaciones.

Elizabeth Dinora Hernández Guzmán

## INDICE

Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xxiii
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	28
3.1 Generalidades de la familia Asteraceae	28
3.2 Género <i>Calea</i>	30
3.2.1 Generalidades del genero <i>Calea</i>	30
3.3 Especie <i>Calea urticifolia</i>	31
3.3.1 Información taxonómica	31
3.3.2 Sinónimos	31
3.3.3. Nombres comunes de <i>Calea urticifolia</i>	31
3.3.4 Descripción Botánica	31
3.3.5 Distribución de <i>Calea urticifolia</i>	33
3.3.6 Usos etnobotánicos de <i>Calea urticifolia</i>	34
3.3.7 Sesquiterpenlactonas aisladas de <i>Calea urticifolia</i>	37
3.3.8 Actividades Biológicas de <i>Calea urticifolia</i>	41
3.3.8.1 Actividad citotóxica	41
3.3.8.2 Actividad antioxidante	44
3.3.8.3 Actividad antiadipogenesis	45
3.3.8.4 Actividad hipoglucemiante e hipolipemante	46
3.3.8.5 Actividad antiparasitario	47
3.4 Generalidades de los métodos de ensayo en toxicología	47
3.4.1 Uso de animales de Experimentación	48
3.4.2 Estudios Subcrónicos	51
3.4.3 Ratón de laboratorio	52

3.5 Generalidades de la actividad toxica de las sesquiterpenlactonas	56
3.5.1 Mecanismos generales de toxicidad	59
3.5.2 Mecanismos de toxicidad de las sesquiterpenlactonas	59
3.5.3 Efectos tóxicos de las sesquiterpenlactonas	59
3.5.3.1 Veneno en animales de ganado	61
3.5.3.2 Daños a nivel del sistema nervioso central	62
3.5.3.3 Sistema cardiovascular	63
3.5.3.4 Sistema renal	64
3.5.3.5 Hígado y tracto gastrointestinal	64
3.5.3.6 Dermatitis e irritación en la piel	65
Capítulo IV	
4.0 Diseño metodológico	67
4.1 Tipo de estudio	67
4.2 Investigación bibliográfica	67
4.3 Investigación de campo	68
4.3.1 Recolección del material vegetal	68
4.4 Parte experimental	68
4.4.1 Preparación de las muestras a investigar	68
4.4.2 Obtención del extracto <i>n</i> -hexánico de las hojas de <i>Calea urticifolia</i>	68
4.4.3 Identificación de sesquiterpenlactonas en el extracto <i>n</i> - hexánico por cromatografía en capa fina	69
4.4.4 Identificación de sesquiterpenlactonas en el extracto <i>n</i> - hexánico por espectroscopia ultravioleta	70
4.4.5 Espectroscopia por RMN <sup>1</sup> H	71
4.4.6 Cuantificación de sesquiterpenlactonas (STLs) totales mediante espectroscopia visible	71
4.4.7 Diseño estadístico	75

4.4.7.1 Desviación típica estándar	76
4.4.8 Determinación de toxicidad subcrónica del extracto <i>n</i> -hexánico de <i>Calea urticifolia</i>	76
4.4.8.1 Animales experimentales	77
4.4.8.2 Dosis y Vía de administración	77
4.4.8.3 Procedimiento experimental	78
4.4.8.4 Preparación y Administración de las dosis	79
4.4.8.5 Observaciones clínicas durante el estudio	80
4.4.8.6 Peso Corporal	81
4.4.8.7 Determinación del punto final	81
4.4.8.8 Exámenes Hematológicos	82
4.4.8.9 Bioquímica clínica	83
4.4.8.10 Sacrificio y Necropsias	83
4.4.8.11 Exámenes Histopatológicos	85
4.4.9 Análisis estadístico	85
Capítulo V	
5.0 Resultados y Discusión de Resultados	87
5.1 Identificación de la especie vegetal	87
5.2 Recolección y preparación del material vegetal	87
5.3 Preparación del extracto <i>n</i> -hexánico seco	88
5.4 Resultados de la identificación de sesquiterpenlactonas en el extracto <i>n</i> -hexánico por cromatografía en capa fina	90
5.5 Resultados de la identificación de sesquiterpenlactonas en el extracto <i>n</i> -hexánico por espectroscopia ultravioleta	91
5.6 Espectroscopia por RMN <sup>1</sup> H	95
5.7 Cantidad de sesquiterpenlactonas totales expresadas como mg de Juanislamina presentes en las alícuotas usadas para las lecturas en espectroscopia visible	98
5.8 Ensayo de toxicidad subcrónica por administración	109

continua (90 días) por vía oral

Capítulo VI

6.0 Conclusiones

126

Capítulo VII

7.0 Recomendaciones

129

Bibliografía

130

Anexos

141

## INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Documento que autentica la especie *Calea urticifolia*
2. Extracción de sangre de Seno-orbital
3. Procesamiento de tejidos para la realización de los bloques parafinados
4. Equipo automatizado Beckman Coulter-AU 680
5. Reactivo revelador para la identificación de sesquiterpenlactonas por cromatografía en capa fina

## INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág. N°
1. Usos etnobotánicos de <i>Calea urticifolia</i>	35
2. Ensayos de seguridad con fines reguladores	50
3. Usos y formas de administración de algunas sesquiterpenlactonas aisladas de diferentes plantas medicinales	53
4. Diferentes sesquiterpenlactonas divididas de acuerdo a su mecanismo de acción tóxico	56
5. Condiciones para realizar la cromatografía de capa fina	69
6. Descripción de parámetros de toxicidad en animales de experimentación	80
7. Códigos asignados a las muestras recolectadas	88
8. Porcentaje de rendimiento de extracción en base al peso de las hojas secas y del extracto <i>n</i> -hexánico seco de cada una de las tres colectas realizadas de <i>C.urticifolia</i> .	89
9. Resultados de R <sub>f</sub> obtenidos de la cromatografía en capa fina de los tres extractos	91
10. Absorbancias, peso y factor de dilución en las alícuotas de cada una de los extractos de <i>C. urticifolia</i> con 5 réplicas cada uno	99
11. Contenido de las sesquiterpenlactonas totales presentes en las alícuotas expresadas como mg de Juanislamina, promedios, desviaciones estándar, e intervalo de confianza 95%.	102
12. Cantidad de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto <i>n</i> -hexánico seco, promedios, desviaciones estándar, e intervalo de confianza 95%.	105

13. Porcentaje de sesquiterpenlactonas expresadas como Juanislamina presente en el extracto <i>n</i> -hexánico seco, promedios, desviaciones estándar, e intervalo de confianza 95%.	107
14. Resumen de los chequeos clínicos en los grupos control, tratamiento y centinela de ambos sexos observados durante los 90 días del estudio	113
15. Variación de los valores promedios de peso corporal (g) de grupos hembra experimentales a lo largo del ensayo y el grado de significancia (Sig. Bilateral) de los grupos tratamiento y centinela con respecto al aumento porcentual de peso corporal correlacionado con los grupos controles.	115
16. Variación de los valores promedios de peso corporal (g) de grupos machos experimentales a lo largo del ensayo y el grado de significancia (Sig. Bilateral) de los grupos tratamiento y centinela con respecto al aumento porcentual de peso corporal correlacionado con los grupos controles.	116
17. Valores de significancia de la diferencia entre los grupos tratamiento y centinela respecto a los grupos control, calculados a partir de los valores promedio de parámetros bioquímicos	118
18. Valores de significancia de la diferencia entre los grupos tratamiento y centinela respecto a los grupos control, calculados a partir de los valores promedio de cada parámetro hematológico	120
19. Valores promedio de peso de órganos en gramos de los grupos control, tratamiento y centinela con el grado de significación con un intervalo de confianza de 95%	122

## INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág. N°
1. Distribución geográfica de la Familia Asteraceae (en color rojo)	29
2. Arbusto de <i>Calea urticifolia</i> .	32
3. Órganos de <i>Calea urticifolia</i>	32
4. Distribución de <i>Calea urticifolia</i> desde México hasta Panamá (países con pinchos amarillos)	33
5. Distribución de <i>Calea urticifolia</i> en El Salvador presentes en los departamentos marcados con el fichero	34
6. Sesquiterpenlactonas aisladas de <i>Calea urticifolia</i> en 1979	37
7. Sesquiterpenlactonas aisladas de <i>Calea urticifolia</i> por Werner	38
8. Sesquiterpenlactonas procedentes de <i>Calea urticifolia</i> en 1980	38
9. Sesquiterpenlactonas aisladas de <i>Calea urticifolia</i> en 1989	39
10. Sesquiterpenlactonas aisladas de las partes aéreas de <i>Calea urticifolia</i>	40
11. Sesquiterpenlactona más activa evaluada frente a células U937	42
12. Metabolito más citotóxico frente a células SW480 y HL60	43
13. Sesquiterpenlactona más activa evaluada frente a células B16	44
14. Sesquiterpenlactona con mayor actividad potenciadora de ARE	45
15. Sesquiterpenlactona más activa en la inhibición de adipogénesis	46
16. Estructuras de STLs mencionadas en Tabla N°4	57

17. Toxicidad por los diferentes mecanismos de acción de las sesquiterpenlactonas	58
18. Sesquiterpenlactonas aisladas de <i>Hymenoxys odorata</i> y de <i>Helenium amarum</i> causantes del envenenamiento en animales	60
19. Sesquiterpenlactona Vernolepina, aislada de la planta <i>Veronaamigdalina</i>	64
20. Estructura química del marcador Juanislamina	71
21. Cascada de dilución de las muestras	72
22. Grupos experimentales utilizados en la investigación	79
23. Secado de hojas de <i>C.urticifolia</i>	87
24. Aparato Soxhlet	89
25. Cromatograma de cada uno de los tres extractos <i>n</i> -hexánicos de <i>C. urticifolia</i> usando reactivo de Baljet como revelador	90
26. Espectro del marcador Juanislamina	92
27. Espectro del extracto correspondiente a enero (E1)	93
28. Espectro del extracto correspondiente a febrero (E2)	93
29. Espectro del extracto correspondiente a marzo (E3)	94
30. Esquema de fraccionamiento y elución del extracto del extracto <i>n</i> -hexánico de las hojas de <i>C. urticifolia</i> con las sesquiterpenlactonas más abundantes del mismo	96
31. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la 2,3-Epoxijuanislamina	97
32. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la Juanislamina	98
33. Cantidad de sesquiterpenlactonas totales expresadas en mg de Juanislamina presentes en cada alícuota de muestra	103
34. Porcentaje de STLs totales en cada una de las tres colectas	109
35. Administración del extracto <i>n</i> -hexánico con la cánula intragástrica	112

36. Dilatación de las asas intestinales observadas en el macho centinela sacrificado durante el examen macroscópico de órganos	121
37. Órganos de los animales en estudio preservados en formalina al 10% con su respectiva codificación	123

## RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación fue la determinación de la toxicidad a 90 días del extracto *n*-hexánico de las hojas de *Calea urticifolia* en ratones de la cepa NIH y la cuantificación de sesquiterpenlactonas totales presentes en los extractos durante el periodo comprendido de enero a marzo de 2014.

La investigación se desarrolló en dos etapas, en primer lugar, el estudio fitoquímico que se inició con la identificación de la especie vegetal *C. urticifolia* por un experto botánico, seguida de la recolección de las hojas una vez por mes durante tres meses (enero a marzo). Posteriormente las hojas se secaron y se extrajeron con *n*-hexano por método Soxhlet; seguida por la eliminación del solvente que produjo el extracto seco. A partir de este, se procedió a la identificación de sesquiterpenlactonas, por medio de cromatografía en capa fina, utilizando el revelador de Baljet, y por espectroscopia Ultravioleta, comparando con el marcador analítico Juanislamina, que es la sesquiterpenlactona mayoritaria en este extracto. En ambas técnicas los resultados fueron positivos para los metabolitos secundarios activos (sesquiterpenlactonas).

Posteriormente se procedió a la cuantificación de sesquiterpenlactonas totales, utilizando el método de espectroscopia visible midiendo la absorbancia de las muestras por quintuplicado. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de sesquiterpenlactonas totales en el extracto seco y el porcentaje de sesquiterpenlactonas totales en material vegetal seco.

La segunda etapa del trabajo consistió en la evaluación de la toxicidad del extracto *n*-hexánico de hojas de *C. urticifolia* en ratones de la cepa NIH, durante un periodo de 90 días.

Los ratones fueron separados en 6 grupos de 5 ratones, dividiéndolos en machos y hembras, quedando distribuidos de la siguiente forma: dos grupos control a los cuales se les administró agua destilada como blanco, dos centinela y dos tratamiento, tratados con el extracto *n*-hexánico. Todos los ratones

fueron pesados semanalmente para tomar el peso como parámetro de toxicidad, y de acuerdo al peso promedio se realizaron las soluciones del extracto para administrarles durante los tres meses, y se evaluó el comportamiento con observaciones clínicas diarias por 90 días. Finalizado los 90 días, se procedió a la toma de muestras de sangre para las pruebas hematológicas y bioquímicas y luego la necropsias de los grupos tratamiento y control, dejando por un mes más a los grupos centinela con administración de agua destilada para observar si los daños producidos fueron reversibles con el tiempo. Después del mes de observación, se les realizaron las mismas pruebas de sangre y posteriormente las necropsias para el análisis macroscópico de órganos.

Los órganos se preservaron en formalina al 10% y luego fueron procesados por medio de la técnica histopatológica clásica para bloques parafinados, los cuales se conservan en almacenamiento mientras un patólogo pueda realizar los cortes y realice el respectivo examen histopatológico.

El análisis estadístico de los datos obtenidos en la cuantificación se les realizó la desviación típica estándar con un intervalo de confianza de 95% para concluir el mes donde se produce más cantidad de sesquiterpenlactonas; mientras que los datos de toxicidad, se evaluaron con el software SPSS para Windows y para contrastar la normalidad de estos se utilizó el Test de Shapiro–Wilk, y así demostrar mediante los resultados de diferencias significativas, si el extracto *n*-hexánico causaba daños tóxicos al organismo y si estos fueron reversibles con el tiempo, información que le será útil al patólogo en la realización del examen histopatológico.

Los resultados obtenidos demuestran que el extracto *n*-hexánico de *C. urticifolia* administrado a ratones NIH por un periodo de 90 días produce alteraciones en los datos clínicos de química sanguínea y hematológica, además se observa

una caída significativa del peso corporal en los animales de experimentación, tanto en los grupos macho y hembra, verificando que en los grupos centinela existe recuperación del peso al finalizar el estudio, que es mayor en el grupo de ratones macho, manifestando mayor susceptibilidad de las hembras a los efectos dañinos de esta especie vegetal. Y evidenciando la presencia de un moderado daño tóxico a nivel gastrointestinal.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 INTRODUCCION

En la medicina tradicional salvadoreña, *Calea urticifolia*(Juanislama) es una especie vegetal muy utilizada para padecimientos tales como: artritis, fiebre, cáncer, cólicos intestinales, diabetes, entre otros, en forma de infusiones, cocimientos, para administrarla ya sea en forma oral o tópica. En los mercados populares diariamente se venden considerables cantidades de las hojas de esta planta (entera o segmentada y fresca o desecada), la cual es prescrita por los curanderos o simplemente auto recetada. Por ser una especie de la Familia Asteraceae, quimio taxonómicamente posee sesquiterpenlactonas como metabolitos secundarios mayoritarios, con una concentración de estos que varía del 0.01 al 8% del peso seco de la planta, encontrando las concentraciones más altas en las hojas. (32, 47, 66)

Por tal razón, el presente trabajo tuvo como finalidad realizar parte de un estudio preclínico en el extracto *n*-hexánico de las hojas de esta especie con el propósito de detectar los posibles efectos tóxicos post administración, (7, 8) puesto que se ha reportado evidencia científica del daño a nivel renal que produce el extracto clorofórmico de las hojas de *Calea urticifolia*.(66)

La parte experimental se dividió en dos etapas:

La parte fitoquímica consistió en: la extracción selectiva por medio del método Soxhlet, la identificación de sesquiterpenlactonas por cromatografía en capa fina y espectroscopia ultravioleta y la cuantificación de sesquiterpenlactonas por medio de espectroscopia visible, determinando la desviación estándar y el intervalo de confianza de los datos obtenidos además de un análisis de varianza.

Y la parte toxicológica, que consistió en la administración del extracto *n*-hexánico de *Calea urticifolia* en ratones NIH durante un periodo de 90 días, chequeos clínicos diarios durante el estudio, control de peso de los animales,

evaluación de parámetros sanguíneos: pruebas hematológicas y bioquímicas, necropsias, examen macroscópico de órganos y la realización de cortes de los órganos mediante la técnica histopatológica clásica para bloques parafinados.

La obtención de extractos vegetales y la identificación por cromatografía en capa fina de las sesquiterpenlactonas se realizaron en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia.

La identificación y cuantificación de las sesquiterpenlactonas se realizó por espectroscopia UV-VIS en el Laboratorio Físico-Químico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia.

La parte toxicológica se realizó en el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) y el Laboratorio de Patología, ambos ubicados en el edificio de CENSALUD. Las determinaciones sanguíneas y bioquímicas se realizaron en el Laboratorio de Química Clínica del Hospital Nacional Rosales.

El estudio de 90 días se llevó a cabo desde enero a marzo del año 2014, con un mes para observación de los grupos centinela y dos meses más para procesamiento de los datos, lo cual la investigación tuvo un periodo de duración de seis meses aproximadamente.

**CAPITULO II**  
**OBJETIVOS**

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL:**

Determinar la toxicidad sub crónica del extracto *n*-hexánico de las hojas de *Calea urticifolia* (Juanislama) en ratones NIH.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

**2.2.1** Recolectar las hojas de *Calea urticifolia*(Juanislama) en el periodo de enero a marzo de 2014.

**2.2.2** Preparar el extracto *n*-hexánico de las hojas de *Calea urticifolia*(Juanislama) en el periodo de enero a marzo de 2014.

**2.2.3** Identificar y cuantificar las sesquiterpenlactonas en el extracto *n*-hexánico seco.

**2.2.4** Evaluar el efecto tóxico que se genera en un periodo de 90 días de administración del extracto *n*-hexánico de las hojas de *Calea urticifolia* (Juanislama) en ratones NIH.

**2.2.5** Realizar pruebas bioquímicas y hematológicas en sangre y suero de ratón para determinar el posible grado de toxicidad producido.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEORICO**

### 3.0 MARCO TEÓRICO

#### 3.1 GENERALIDADES DE LA FAMILIA Asteraceae.

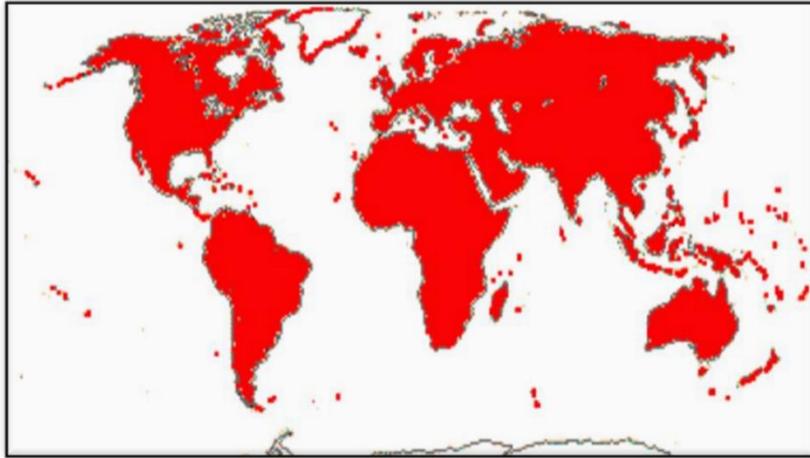
La Familia de las compuestas (Compositae o Asteraceae) está conformada por más de 1000 géneros y más de 20000 especies, es una de las familias de plantas más importantes, formadoras de semillas (espermatofitos), que presentan una variedad morfológica grande, así como su hábitat, sus formas vitales y la dispersión de sus frutos, se encuentran muy distribuidas tanto en zonas semidesérticas como tropicales, y hasta en países árticos, pero es más importante su distribución en zonas templadas o subtropicales que no están densamente pobladas de árboles.<sup>(31)</sup>

Las Asteráceas se encuentran en todos los continentes excepto la Antártida, su diversidad puede atribuirse, entre otras cosas, a sus excelentes mecanismos de dispersión y a su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ecológicas, muchas veces viéndose favorecidas por la perturbación.

Es la familia evolutivamente más exitosa dentro de las plantas con flores. La continua expansión de la familia ha sido acompañada por diversos cambios fitoquímicos que le han permitido desarrollar y explorar nuevos mecanismos defensivos, (alcaloides, conductos laticíferos, olores, etc.).<sup>(31)</sup>

Fitoquímicamente, almacenan carbohidratos como oligosacáridos, incluyendo a la inulina. Usualmente, en las especies de la Familia están presentes los poliacetilenos, los aceites aromáticos terpenoides y, quimiotaxonomicamente, su característica más importante, la presencia de sesquiterpenlactonas (STLs).

La familia incluye plantas alimenticias, medicinales, ornamentales e industriales, a la par de las malezas e incluso encontramos muchas plantas tóxicas.



**Figura N°1.** Distribución geográfica de la Familia Asteraceae (en color rojo) <sup>(2, 31)</sup>

Entre algunos de los géneros pertenecientes a la Familia Asteraceae encontramos. <sup>(2, 31)</sup>

- *Achillea*: comúnmente se les conoce como **milenrama**. Es un género de alrededor de 650 especies descritas y solo 150 aceptadas. Son naturales de Europa y regiones templadas de Asia. Algunas crecen en Norte américa sus hojas son peludas y aromáticas.
- *Ambrosia*: es un género amplio de plantas herbáceas o arbustivas, nativas de Norte y Sudamérica, y se han difundido hasta Europa. Comprende una treintena de especies de plantas anuales o perennes, que crecen en especial en regiones llanas, poco húmedas y arenosas.
- *Artemisia*: es un extenso género de plantas herbáceas o arbustivas que posee 1449 especies descritas, de las que se han aceptado 474 hasta la fecha.
- *Helenium*: es un género de plantas herbáceas nativo de Norteamérica y Centroamérica. Comprende 208 especies descritas y de estas, solo 39 aceptadas.

- *Lactuca*: conocido generalmente como **lechuga**, es un género de fanerógamas que abarca más de 100 especies aceptadas, de las casi 580 descritas.
- *Tanacetum*: nativo de las temperaturas templadas del Hemisferio Norte. Comprende 479 especies descritas y de estas son 132 aceptadas.
- *Hymenoxys*: género de plantas fanerógamas perteneciente a la familia de las asteráceas. Comprende 70 especies descritas y solo 26 aceptadas.
- *Smallanthus*: es un género de plantas que puede encontrarse tanto en América del Sur y del Norte, no se han descrito muchas especies hasta el día de hoy, pero probablemente la especie más famosa es conocida como Yacón.
- *Calea*: género que reporta especies muy distribuidas en todo el mundo que crecen en diferentes pisos climáticos de zonas tropicales del continente americano.

### 3.2 GENERO *Calea*.

#### 3.2.1 GENERALIDADES DEL GENERO *Calea*.

El género *Calea* es un género botánico de la Familia de las Asteráceas que comprende 148 especies. Tiene una distribución neotropical (esta ecozona incluye Sur y América Central, las tierras bajas de México, el Caribe, las islas y el sur de Florida). <sup>(60, 66)</sup>

Algunas de las especies pertenecientes a este género son:

- *Calea glomerata* Klatt.
- *Calea granítica* Pruski.
- *Calea jamaicensis* (L.) L.
- *Calea uniflora* Less.

- *Calea venosa* Pruski.
- *Calea zacatechichi* Schltld.
- *Calea urticifolia* (Miller) DC.

### 3.3 ESPECIE *Calea urticifolia* (Miller) DC.

#### 3.3.1 INFORMACION TAXONOMICA.

- **Reino:** *Plantae*
- **Filo:** *Tracheophyta*
- **Clase:** *Magnoliopsida*
- **Orden:** *Asterales*
- **Familia:** *Asteraceae*
- **Género:** *Calea*
- **Especie:** *Calea urticifolia*.

#### 3.3.2 SINONIMOS.

*Solidago urticifolia* Miller. <sup>(25, 66, 73)</sup>

#### 3.3.3 NOMBRES COMUNES DE *Calea urticifolia*.

Juanislama (El Salvador y Ecuador); Amargón, Calea, Hoja de empacho (El Salvador); Chirivito (Honduras); Jalacate, Jaral (Costa Rica); Murupo, Murupo de perro (Nicaragua); Jaral de castilla, Chilchaca, Jarilla, Tacote, Hierba del negro, Hierba del perro, Negro, Negrito chichiquizo, Matacucuyuchi (México).<sup>(25, 66, 73)</sup>

#### 3.3.4 DESCRIPCION BOTANICA.

Es un arbusto de 1 a 3 m de altura, que llega a medir hasta 3.5 m de alto, algunas veces leñoso en la base del tallo, con ramas opuestas; hojas sencillas

estrechas o ampliamente ovadas, rara vez lanceoladas, agudas o semiagudas, redondeadas en la base, de textura membranacea a cartacea, verde oscura, por lo general rasposa y rugosa en el haz, trinerviadas, a menudo lustrosas en ambas caras, flores amarillo brillantes a veces de color crema, reunidas en capítulos dispuestos en inflorescencias umbeliformes.<sup>(64)</sup>



**Figura N°2.** Arbusto de *Calea urticifolia*.



Tallos



Fruto



Hojas

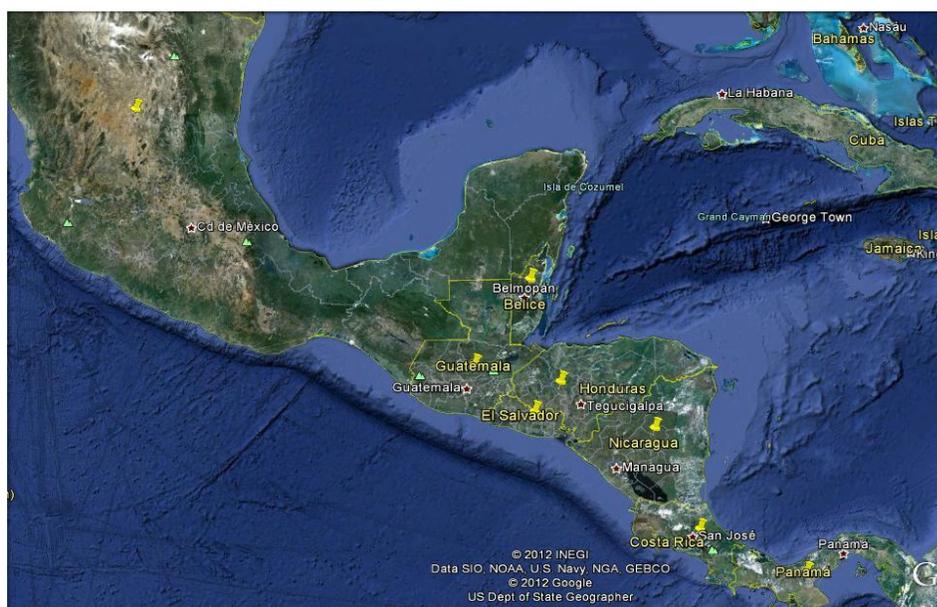


Flores

**Figura N°3.** Órganos de *Calea urticifolia*<sup>(64)</sup>

### 3.3.5 DISTRIBUCION DE *Calea urticifolia*.

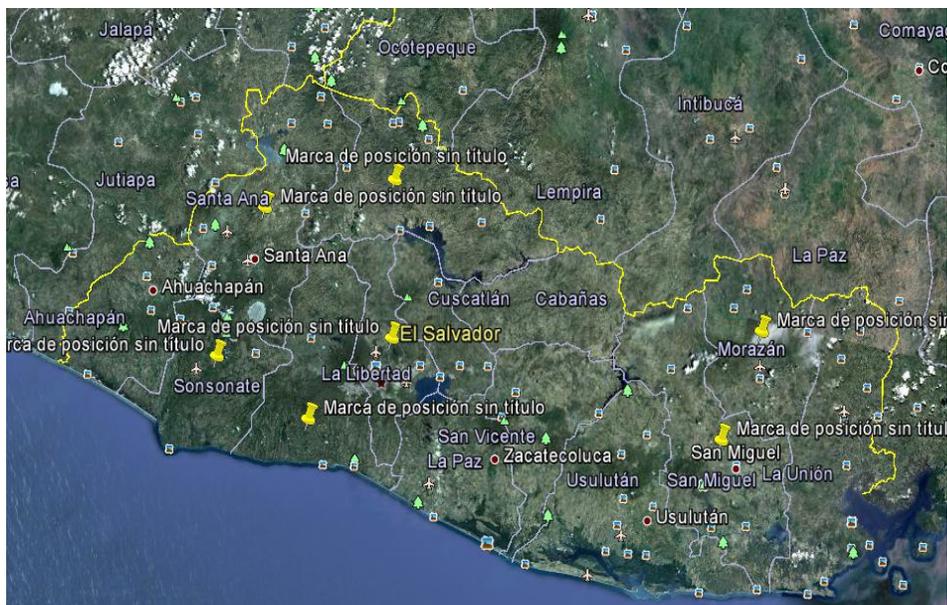
Es una planta de clima cálido y semicálido <sup>(42)</sup> ampliamente distribuida por todo el mundo, se encuentra mejor representada en regiones semiáridas, tropicales y subtropicales; podemos encontrarla desde Panamá, Centroamérica hasta el norte de México.



**Figura N°4.** Distribución de *Calea urticifolia* desde México hasta Panamá (países con pinchos amarillos) <sup>(60, 66)</sup>

A nivel nacional, no existe una distribución específica, pero existen reportes de colectas reportadas por botánicos expertos en Sonsonate, Santa Ana, La libertad, Chalatenango, San Salvador, Morazán y San Miguel (Ver **Figura N°5**).

(27)



**Figura N°5.** Distribución de *Calea urticifolia* en El Salvador presentes en los departamentos marcados con el fichero. (42)

### 3.3.6 USOS ETNOBOTANICOS DE *Calea urticifolia*.

Popularmente, las plantas medicinales en El Salvador se han utilizado en la curación de muchas enfermedades comunes por la población mediante una amplia variedad de remedios caseros que se han transmitido por generaciones desde tiempos remotos. Así, *C. urticifolia*, es una de las plantas medicinales más utilizadas por los salvadoreños para el alivio de ciertos padecimientos, los cuales se enlistan en la **Tabla N°1**.

**Tabla N°1.** Usos etnobotánicos de *Calea urticifolia*<sub>(28, 31, 36)</sub>

Enfermedad	Órgano vegetal utilizado	Procedimiento para la elaboración	Vía de administración	Posología
Artritis	Hojas secas	Cocimiento de unas 9 hojas	Oral Baños locales calientes y fomentos	3 taza/día 3-4 veces/día
Fiebres	Hojas secas	Cocimiento de 6 hojas y 2 cucharadas de manzanilla picada ( o medio manojo)	Oral	1 taza
Cáncer	Hojas secas	Cocimiento de 7-10 hojas; no usar más para que seasoportable lo amargo	Oral	
Coloradías (ácaros)	Hojas secas o frescas	Extractos de varias hojas bien deshechas porqueson carrasposas	Restregamiento	1-2 veces/día
Diabetes	Hojas secas o frescas	Unas 7-10 hojas enteras	Oral	2-3 taza/día
Dismenorrea	Hojas secas o frescas	Cocimiento, usar 1 a 2 hojas	Oral, ¡Cuidado si se toma mucho arde el estómago!	

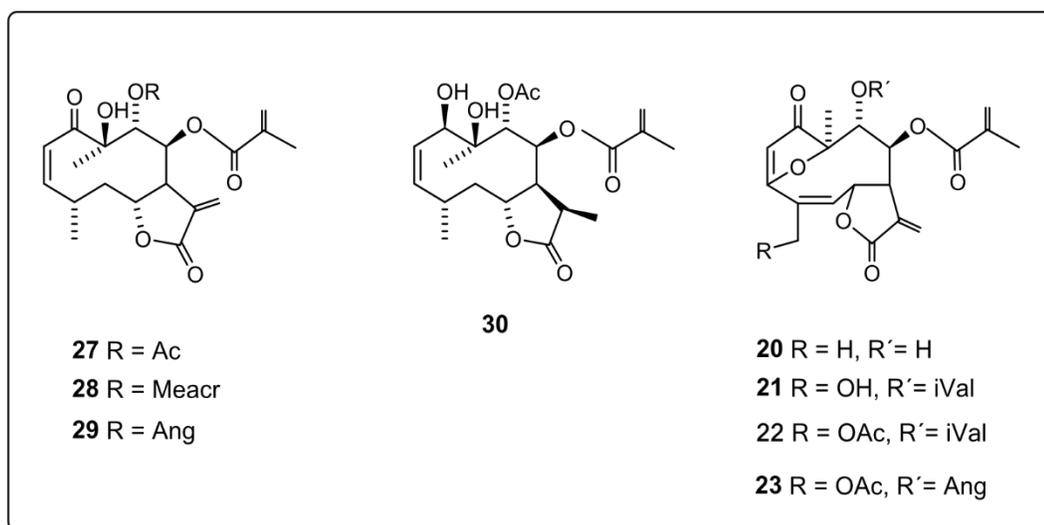
**Tabla N°1** Continuación

Leucorrea	Hojas secas	Cocimiento de unas 2-3 hojas por botella; no ocupar más porque es muy amarga	Oral, cuidado	3-4 taza/día
Mazamorra	Hojas secas o frescas	Picar unas 20 hojas sanas; agregar unos 3-5 chiles rojos y ¼ penca de sábila; mezclar con manteca de cuche o vaselina simple y freír	Tópico	1-2 veces/día
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cólicos</li> <li>- Dolor de estomago</li> <li>- Ulceraciones</li> <li>- Heridas infectadas</li> <li>- Hiperacidez</li> <li>- Cáncer</li> <li>- Diabetes</li> <li>- Artritis</li> <li>- Enfermedades hepáticas y de riñones</li> <li>- Diarreas</li> <li>- Anginas</li> <li>- Bronquitis</li> <li>- Empacho</li> <li>- Náuseas</li> </ul>	Hojas secas o frescas	7 hojas se colocan en media botella de agua y se macera	Oral	Se toma como agua de tiempo

### 3.3.7 SESQUITERPENLACTONAS AISLADAS DE *Calea urticifolia*.

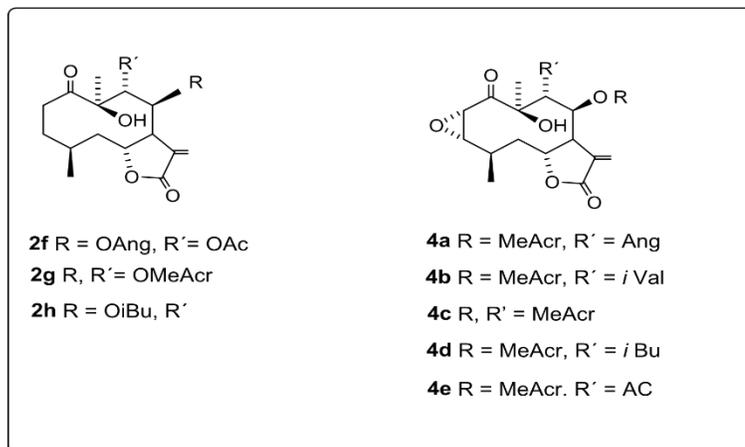
Las sesquiterpenlactonas se han reportado como marcadores quimiotaxonómicos para la Familia Asteraceae y se han elucidado con la ayuda de muchas técnicas analíticas. Como por ejemplo RMN 1D y 2 D, espectroscopía UV, IR y rayos X, entre otras.

En 1979, se publica el aislamiento ocho germacranólidos, que fueron elucidados por medio de diferentes técnicas espectroscópicas y se denominaron como germacranólidos 20-23 y 27-30 (Ver **Figura N°6**).<sup>(9)</sup>



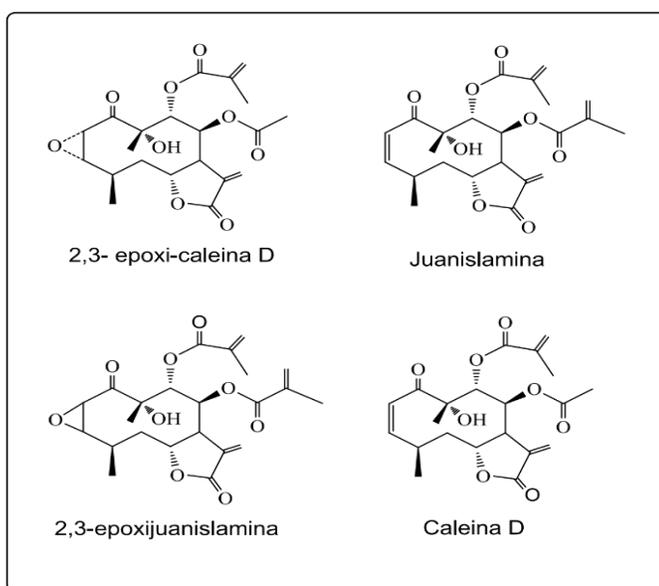
**Figura N°6.** Sesquiterpenlactonas aisladas de *Calea urticifolia* en 1979.

En 1980, se aislaron ocho sesquiterpenlactonas del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *C. urticifolia* denominadas como: 2f, 2g, 2h, 4a, 4b, 4c, 4d y 4e, sus estructuras fueron determinadas por medio de técnicas espectroscópicas (Ver **Figura N°7**).<sup>(38)</sup>



**Figura N°7.** Sesquiterpenlactonas aisladas de *Calea urticifolia* por Werner.

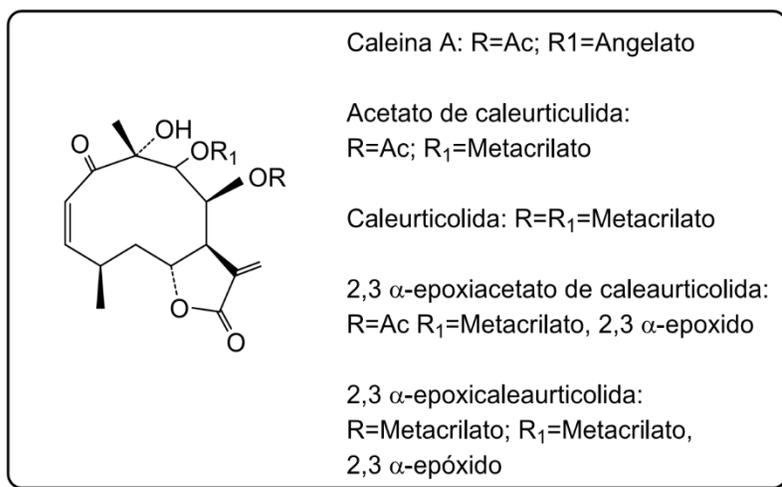
A nivel nacional, se aislaron y elucidaron, también en 1980 cuatro germacranólidos (Juanislamina, 2,3-epoxijuanislamina, Caleína D y 2,3 epoxicaleina D) de las hojas de *C. urticifolia* (Ver **Figura N°8**).<sup>(50)</sup>



**Figura N°8.** Sesquiterpenlactonas procedentes de *Calea urticifolia* en 1980.

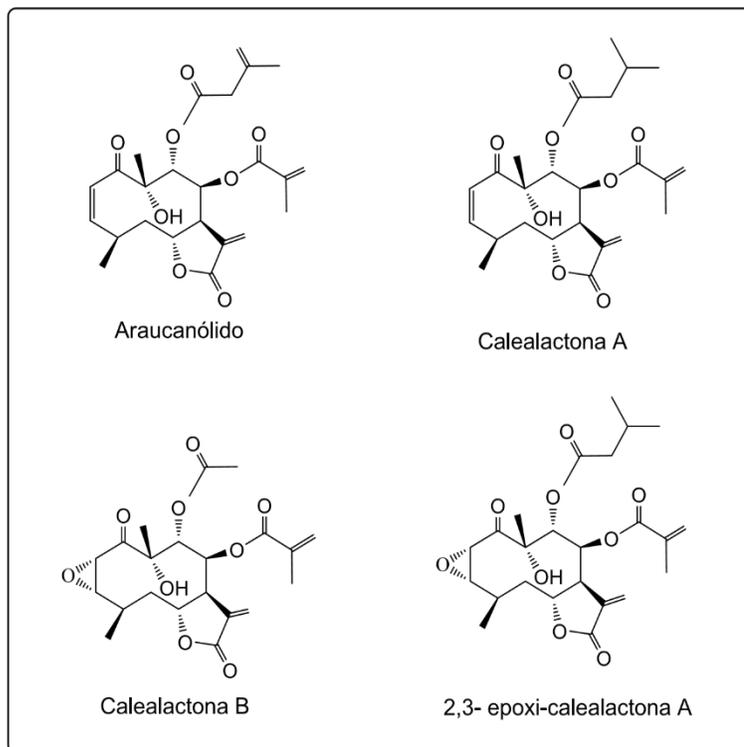
En 1981 se estudiaron las hojas de *C. urticifolia*, aislando y elucidando dos sesquiterpenlactonas las cuales se identificaron por medio de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , y se les denominaron Caleína D y 2,3-epoxi-caleina D (Ver **Figura N°8**).<sup>(11)</sup>

En 1989, se aislaron cinco sesquiterpenlactonas de *C. urticifolia* de tres poblaciones (dos de México y una de Costa Rica) y nombradas como: Caleína A, Acetato de caleurticulida, Caleurticolida, 2,3  $\alpha$ -epoxiacetato de caleurticulida y 2,3  $\alpha$ -epoxicaleaurticulida, elucidadas espectroscópicamente (Ver **Figura N°9**).<sup>(72)</sup>



**Figura N°9.** Sesquiterpenlactonas aisladas de *Calea urticifolia* en 1989.

Del extracto acetónico de las partes aéreas de *C. urticifolia*, recolectada en El Salvador, se obtuvieron las siguientes sesquiterpenlactonas: Arucanólido, Calealactona A, 2,3-epoxi-calealactona A, Calealactona B, Juanislamina, 2,3 epoxi-juanislamina, siendo los primeros cuatro novedosos. (Ver **Figuras N°8 y N°10**).<sup>(53)</sup>



**Figura N°10.** Sesquiterpenlactonas aisladas de las partes aéreas de *Calea urticifolia*.

En otro estudio usando el extracto acetónico de hojas de *C. urticifolia* colectadas en El Salvador en 2004, permitió que se aislaran siete sesquiterpenlactonas denominadas como: Calealactona A-C, 2,3-epoxicalcalactona A, Caleína D, Juanislamina y 2,3-epoxijuanislamina, las cuales se identificaron por medio de RMN 2D y espectrofotometría de masas (Ver **Figuras N° 8 y N°10**)<sup>(75)</sup>

En 2005, se estudiaron las partes aéreas de *C. urticifolia*, aislando siete sesquiterpenlactonas las cuales al elucidarlas con diferentes técnicas analíticas resultaron ser Calealactona A, Calealactona B, Calealactona C, 2,3-epoxicalcalactona A, Caleína D, Juanislamina y 2,3-epoxijuanislamina (Ver **Figuras N°8 y N°10**)<sup>.(66, 73)</sup>

En 2008, se investigó el extracto acetónico de *C. urticifolia* y de *Ambrosia cumanensis* colectadas ambas en El Salvador, y se reportó el aislamiento de seis sesquiterpenlactonas; cinco de estas procedían de *C. urticifolia* (Arucanólido, Calealactona A, 2,3-epoxi-calealactona A, Calealactona B y 2,3-epoxi-juanislamina) y una se aisló de *A. cumanensis* (Partenólida). Todas las sesquiterpenlactonas presentaron esqueleto germacranólido. <sup>(70)</sup> (Ver **Figuras N°8 y N°10**).

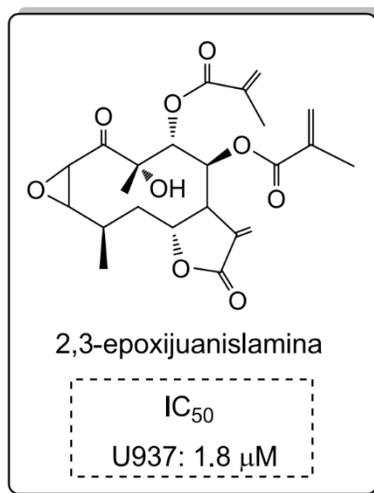
En el 2009 se aislaron de las hojas de *C. urticifolia*, cinco sesquiterpenlactonas (Calealactona B, Arucanólido, 2,3-epoxi-juanislamina, 2,3-epoxi-calealactona A, y Calealactona A) anteriormente descritas. (Ver **Figuras N°8 y N°10**)<sup>(57)</sup>

### **3.3.8 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Calea urticifolia*.**

#### **3.3.8.1 ACTIVIDAD CITOTÓXICA**

El cáncer es un problema relevante dentro de nuestra población por lo cual la actividad citotóxica en nuestros tiempos es una de las líneas de investigación más importantes, ya que nos conducen a estudios previos en la búsqueda de anticancerígenos.

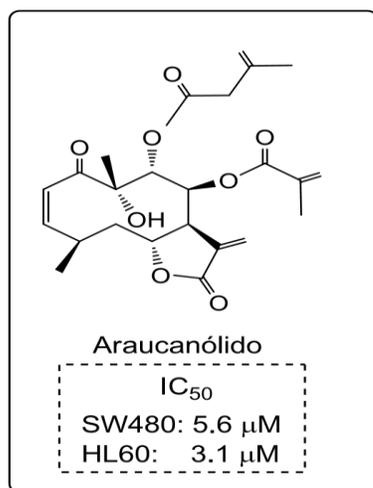
En el 2004 se ensayaron siete sesquiterpenlactonas provenientes del extracto acetónico de las hojas de *C. urticifolia* frente a células U937 (células humanas con leucemia) por medio del método del MTT, se evaluó hasta obtener el 50% de viabilidad de las células tratadas obteniéndose los resultados de cada compuesto ( $IC_{50}$ ) 3.5, >5, >5, 1.0, >5, 3.0 y 1.8  $\mu M$ ., utilizando como control positivo el Partenólida que presentó un valor de  $IC_{50} = 1.9 \mu M$ , obteniendo resultados que confirman su potente actividad citotóxica sobre las células tratadas principalmente de la sesquiterpenlactonas 2,3-epoxi-juanislamina (Ver **Figura N°11**). <sup>(75)</sup>



**Figura N°11.** Sesquiterpenlactona más activa evaluada frente a células U937.

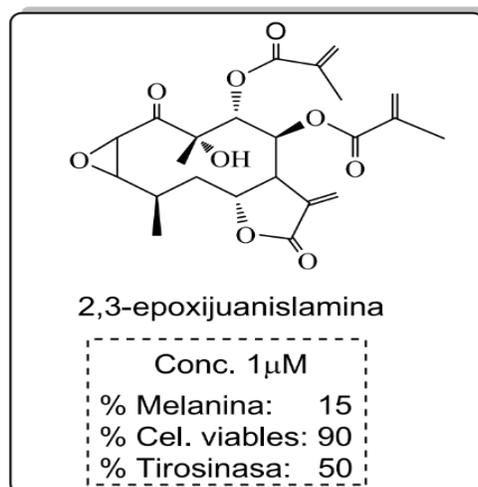
En 2005 del extracto acetónico de las partes aéreas de *C. urticifoliase* obtuvieron seis sesquiterpenlactonas, las cuales fueron evaluadas frente a dos líneas celulares SW480 (células de adenocarcinoma de colon) y HL60 (células de leucemia promielocítica), de las cuales, Arucanólido ejerció un efecto citotóxico marcado a menos de 10 μM frente a ambas líneas celulares y su actividad citotóxica fue mayor que Partenólida utilizada como control positivo (Ver **Figura N°12**).

Además se demostró una potente actividad inductora de apoptosis de todas las sesquiterpenlactonas aisladas teniendo un rol crucial en el factor inductor de apoptosis (factor nuclear-*kB*).<sup>(53)</sup>



**Figura N°12.** Metabolito más citotóxico frente a células SW480 y HL60.

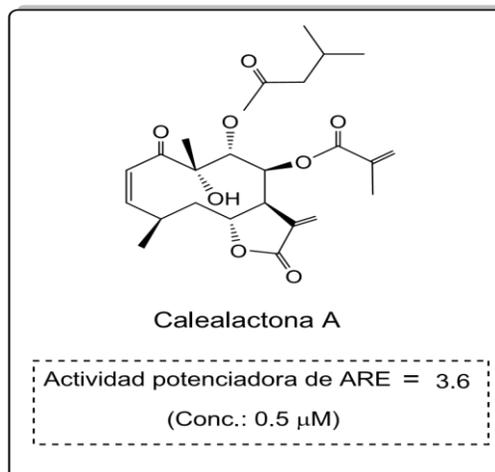
También se aislaron de las hojas de *C. urticifolia*, colectada en El Salvador, cinco sesquiterpenlactonas, todas estas fueron evaluadas frente a células de melanoma de ratón B16 (4A5), a concentraciones de (0.2, 0.5, 1, 2 μM y un blanco), a estas concentraciones se evaluaron para determinar el contenido de melanina, actividad de tirosina y células viables. Se demostró un efecto antimelanogénesis potente en células de melanoma B16, además provocó una disminución significativa en la enzima tirosinasa, obteniendo los mejores resultados con la 2,3-epoxijuanislamina a concentraciones menores de 1μM (Ver**Figura N°13**).<sup>(66, 73)</sup>



**Figura N° 13.** Sesquiterpenlactona más activa evaluada frente a células B16.

### 3.3.8.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

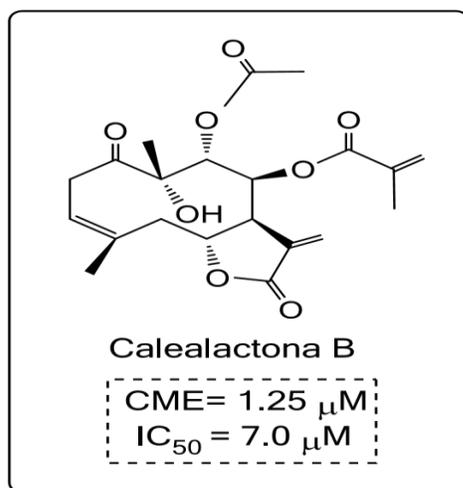
Los antioxidantes hoy en día son objeto de muchos estudios, debido a la búsqueda de nuevos y más eficientes factores antioxidantes. Un estudio realizado en 2008 con sesquiterpenlactonas procedentes de este extracto acetónico de *C. urticifolia*, evaluándose su actividad antioxidante en la ruta Nrf2/ARE. Se midió la actividad del Elemento Responsable Antioxidante (ARE) a través del ensayo de transfección y luciferasa, mostrando la sesquiterpenlactona Calealactona A como el metabolito secundario aislado más activa frente a la potenciación de la ARE<sub>(70)</sub> (Ver **Figura N° 14**).



**Figura N° 14.** Sesquiterpenlactona con mayor actividad potenciadora de ARE.

### 3.3.8.3 ACTIVIDAD ANTIADIPOGENESIS.

Las enfermedades relacionadas con la obesidad son hoy en día un problema de salud muy grave a nivel mundial. Por todo esto, se aislaron siete sesquiterpenlactonas del extracto etanólico de las partes aéreas de *C. urticifolia*, estudio realizado por Nobuyasu y colaboradores, las cuales fueron evaluadas frente a la inhibición de la adipogénesis a concentraciones entre 1.25-5  $\mu$ M, resultando ser la más activa la Calealactona B, con valores de inhibición de lípidos de CME de 1.25  $\mu$ M y  $IC_{50}$  de 7.0  $\mu$ M, en células 3T3-L1 (células de fibroblasto de embrión de ratón) y ninguna actividad de unión no específica a proteína. Estos resultados indican que estos germacranólidos son inhibidores específicos de diferenciación de preadipocitos.<sup>(66, 73)</sup> (Ver **Figura N° 15**)



**Figura N°15.** Sesquiterpenolactona más activa en la inhibición de adipogénesis.

#### 3.3.8.4 ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE E HIPOLIPEMIANTE.

Los problemas de diabetes y enfermedades relacionadas a la obesidad, son dos de las enfermedades más comunes en la actualidad, que tienen como consecuencia un gasto significativo a los gobiernos y que cobran muchas vidas humanas cada día. Recientemente en una Tesis de Maestría en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí se administraron una vez día/6 meses, macerados etanólicos de la hojas de *C. urticifolia*, a ratones de experimentación y fueron analizados los parámetros bioquímicos por métodos enzimáticos colorimétricos. El extracto etanólico de *C. urticifolia*, mostró efecto hipoglucemiante, hipolipemiante y antiinflamatorio en el proceso inflamatorio derivado del tejido adiposo, a través de la inhibición de la secreción de TNF- $\alpha$ . Adicionalmente el extracto incrementó los niveles de insulina circulante, lo cual puede interpretarse como que el extracto funciona como secretagogo, es decir, que presenta la capacidad de inducir la secreción de la hormona en la célula  $\beta$  pancreática.<sup>(60)</sup>

### **3.3.8.5 ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA.**

Los parásitos representan un serio problema en los índices de mortalidad infantil en los países en vía de desarrollo, como el nuestro. Recientemente se investigó el extracto acuoso de las hojas y raíz de *C. urticifolia*, evaluándolos a diferentes concentraciones (blanco, 50% y 100%) y diferentes tiempos de exposición del extracto (0, 24, 48 y 72 horas) frente a una especie de nematodos que constituyen una importante y abundante plaga en la mayoría de los cultivos, el nematodo *Meloidogyne incognita* (nematodo de las agallas). El efecto que presentaron los extractos de diferentes partes de la *C. urticifolia* resultaron ser activos principalmente a concentración de 100% en tiempos de 24 y 48 horas, pero también se observó que a las 72 horas el extracto preparado perdía su actividad nematostática.<sup>(37)</sup>

### **3.4 GENERALIDADES DE LOS METODOS DE ENSAYO EN TOXICOLOGIA.**

El desarrollo de nuevos medicamentos impone la necesidad de evaluar su potencial tóxico en modelos experimentales. Esto es posible a través de la realización de un conjunto de estudios toxicológicos en diferentes especies de animales que permiten identificar la toxicidad intrínseca, así como los órganos y tejidos diana de la toxicidad relacionada con el compuesto en evaluación. El tipo y diseño de estos estudios estará en dependencia de las características y destino final del producto, pero en la generalidad de los casos, el objetivo debe ser la demostración de las potencialidades tóxicas por administración única (toxicología aguda), administraciones repetidas (subcrónica y crónica) y estudio especiales de genotoxicidad, toxicología de la reproducción y la fertilidad, llegando incluso en muchos casos a ser necesario la evaluación de su potencial carcinogénico.<sup>(8, 9)</sup>

Esta evaluación constituye un aspecto esencial de la valoración de la razón riesgo/beneficio que la entidad reguladora de medicamentos tiene en cuenta antes de autorizar el desarrollo de estudios clínicos en humanos, y posteriormente para la aprobación de su uso en el mercado, en función de la indicación propuesta. En general, solo la interpretación de los resultados de los estudios realizados, en armónica integración, permite llegar a conclusiones más abarcadoras sobre el potencial tóxico de la sustancia evaluada.<sup>(8)</sup>

Con el objetivo de garantizar la adecuada conducción e interpretación de los estudios toxicológicos y armonizar internacionalmente los requisitos de registro sanitario, se han desarrollado Conferencias Internacionales de Armonización (ICH), donde se han definido criterios para ser considerados en el diseño de los diferentes estudios toxicológicos, con base en la evidencia aportada por años de investigación en el campo de la toxicología, de forma tal que se garanticen resultados confiables y reproducibles.<sup>(1, 8, 29)</sup>

### **3.4.1 USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION.**

Desde la pasada década, como resultado de los avances científicos y por razones éticas y prácticas, se han introducido cada vez más los denominados métodos alternativos en la evaluación toxicológica. <sup>(1)</sup>El término “alternativa a la experimentación animal” puede llevar a confusión y sugerir que se refiere solo a aquellos métodos que los sustituyen en la investigación, como, por ejemplo, los métodos *in vitro*. <sup>(1)</sup>En realidad, se consideran bajo este concepto todos aquellos que cumplen con alguno de los postulados del principio de las tres R. Este principio surgió en 1959, cuando Russell y Burch publicaron el libro **The Principles of Humane Experimental Technique**.<sup>(8, 29)</sup>

Las tres R se refieren a *reemplazar* los animales de experimentación por otros métodos que no impliquen su uso, *reducir* su número cuando sea necesario utilizarlos y *refinar* las técnicas para aminorar su sufrimiento. La estructura de las ciencias médicas sería inconcebible sin el empleo de animales y sin su sometimiento a condiciones que la conciencia moral prohíbe imponer a seres humanos.<sup>(14)</sup>

El animal de laboratorio es aquel que es engendrado y producido en condiciones controladas, además es mantenido en un entorno controlado, posee claros antecedentes genéticos y microbiológicos. También es definido como cualquier especie animal que, mantenido bajo determinadas condiciones controladas es utilizado como instrumento de medida en experimentación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y docencia, para la generación de datos, los cuales son utilizados como información. Ejemplo de estas especies son: el ratón, la rata, el hámster, el conejo, el perro, el mono y otros.<sup>(10)</sup>

El empleo de animales de experimentación ha de estar respaldado por un protocolo de ensayo, que debe confeccionarse cumplimentando las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y los protocolos específicos del estudio, de acuerdo con los criterios de la **Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)**.<sup>(10)</sup>

La selección de los diferentes ensayos toxicológicos a emplear, especies, tiempo y vía de exposición, así como de los niveles de dosis a emplear en los mismos, estarán en dependencia de las características propias de la sustancia a ensayar, así como de los objetivos de su posible uso en humanos.<sup>(29)</sup>

La armonización de los protocolos utilizados en todo el mundo ha reducido en forma significativa el uso de animales con estos fines. Desde 1982 la OECD fue

la primera organización internacional en establecer unos criterios de armonización de los ensayos realizados en animales, siendo aceptados por todos los países miembros de dicha organización. De manera similar, existe desde 1990 una armonización en los ensayos de seguridad realizados con fármacos. <sup>(29)</sup>

Desde mediados de los años 60, los estudios de toxicidad se han desarrollado en numerosos laboratorios de todo el mundo y existe obligación de realizar ensayos con los productos nuevos que salen en el mercado (ver **Tabla N°2**).

**Tabla N° 2.**Ensayos de seguridad con fines reguladores <sup>(29)</sup>

Toxicidad aguda sistémica (oral, dérmica, inhalación)
Irritación y corrosión ocular
Irritación y corrosión dérmicas
Sensibilización dérmica
Penetración dérmica
Toxicidad sub aguda
Toxicidad sub crónica
Toxicidad crónica
Toxico cinética
Teratogenia y embriotoxicidad
Toxicidad reproductiva
Genotoxicidad
Carcinogénesis
Neurotoxicidad

### 3.4.2 ESTUDIOS SUBCRONICOS.

Al determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia química, el estudio de la toxicidad oral subcrónica por administración continuada puede estar indicado cuando los ensayos de toxicidad aguda o por administración continuada durante 28 días hayan proporcionado información relativa a la toxicidad.<sup>(21)</sup>

La definición de toxicidad subcrónica resulta a veces confusa. La Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos define los estudios de toxicidad subcrónica, como los efectos adversos por toxicidad acumulativa de la sustancia administrada o sus metabolitos, los cuales ocurren por la administración del agente durante un período de tiempo que representa, aproximadamente, el 10 % de la vida del animal. <sup>(21)</sup>

El estudio de 90 días aporta información sobre los peligros que puede presentar para la salud una exposición continuada durante un período prolongado, que abarque la maduración posterior al destete y el crecimiento hasta la edad adulta. <sup>(6)</sup>

La información obtenida se refiere a los efectos tóxicos principales, los órganos diana y la posibilidad de acumulación, así como la tolerancia fisiológica y metabólica del compuesto en diferentes dosis y tiempo de exposición prolongado, mediante el seguimiento de diferentes parámetros, que incluyen evaluación histopatológica <sup>(61)</sup>, se pueden detectar una amplia variedad de efectos adversos y puede proporcionar una estimación de la dosis de exposición sin efectos adversos observados, que puede emplearse para seleccionar las dosis de los estudios de toxicidad crónica y establecer los criterios de inocuidad de la exposición humana. Los estudios subcrónicos son también valiosos para establecer niveles de dosis a los cuales no haya efectos toxicológicos evidentes.<sup>(6, 29, 61)</sup>

Para los estudios de toxicología subcrónicos se debe seleccionar la ruta de administración del producto, basándonos en el propósito con que vaya a ser utilizado éste, sus propiedades físicas y químicas, el número de animales utilizados en este tipo de estudio varía entre 10-20 de cada sexo.<sup>(6)</sup>

### **3.4.3 RATON DE LABORATORIO.**

El ratón de laboratorio es un roedor usualmente de la especie *Mus musculus* que se utiliza para la investigación científica con frecuencia los ratones de laboratorio son blancos los cuales deben pertenecer a una cepa pura o endogámica. Los individuos de una misma cepa llevan los mismos genes, por lo cual se facilita la comparación de los efectos de los diferentes tratamientos sin que produzca confusión debido a las diferencias genéticas.<sup>(10, 51)</sup>

Las características que han hecho del ratón de laboratorio el modelo biológico y biomédico más utilizado en las investigaciones científicas son:

- 1) Fácil manejo.
- 2) Tamaño apropiado para la crianza y manipulación.
- 3) No requieren demasiados cuidados.
- 4) Tienen un sistema inmune similar al de los seres humanos.
- 5) Tienen un alto nivel de crías.
- 6) Poseen un breve periodo de gestación y rápido destete.
- 7) Las hembras producen un número de óvulos los cuales al ser fecundados son muy resistentes.
- 8) Al ser mamíferos euterios al igual que el hombre tienen un genoma muy similar a los humanos diploide <sup>(10, 51)</sup>

### 3.5 GENERALIDADES DE LA ACTIVIDAD TOXICA DE LAS SESQUITERPENLACTONAS.

Los estudios sobre los beneficios de salud de lactonas sesquiterpénicas tienden a centrarse en su potencial antitumoral <sup>(16)</sup>, en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares <sup>(14)</sup> y su uso como antimaláricos; son las responsables de una gama de otros efectos tales como la prevención de la neurodegeneración, la actividad contra la migraña, analgésico y actividades sedantes, para el tratamiento de enfermedades como la diarrea, la gripe y las quemaduras <sup>(14)</sup> en su mayoría se han aislado de numerosas plantas pertenecientes a la Familia Asteraceae y han sido descritas como los componentes activos de uso tradicional para el tratamiento de enfermedades antiinflamatorias.<sup>(15)</sup>

**Tabla N°3.** Usos y formas de administración de algunas sesquiterpenlactonas aisladas de diferentes plantas medicinales <sup>(2)</sup>

Nombre de la planta	Órgano vegetal utilizado	STLs constituyentes	Uso común	Forma de administración
<i>Achillea millefolium</i>	Flores y hojas	Leucodina	Pérdida del apetito, náuseas, dispepsia, gastritis, disquinesia hepatobiliar, hemorroides y venas varicosas	Infusión, tintura, extracto seco y el jugo de las hojas
<i>Arnica montana</i>	Flores	11,13-dihidro Helenalina	El edema, hematoma y equimosis	Uso externo: infusión, tinturas y solución de aceite

Tabla N°3 Continuación

<i>Artemisia vulgaris</i>	Flores	Yomogina	Vermífugo, dispepsia y estimula las secreciones gastrointestinales	Infusión, líquidos y extracto seco y aceite esencial
<i>Artemisia absinthium</i>	Flores y hojas	Absintina, Matricina	Pérdida del apetito, dispepsia y disquinesia biliar	Infusión, tintura, polvo y jarabe
<i>Chamomilla nobilis</i>	Flores	Nobilina y Epinobilina	Digestivo, antiinflamatorio, antiespasmódico y febrífugo	Infusión, aceite esencial y en polvo
<i>Chamomilla recutita</i>	Flores	Matricina y Matricaria	Dispepsia, digestión deficiente y flatulencia, insomnio, cutánea y las inflamaciones e irritaciones orales	Cabezuelas secas, extracto líquido y en tinturas
<i>Cichorium intybus</i>	Raíces	Lactucina y Lactupicrina	Pérdida del apetito, dispepsia, disquinesia hepatobiliar, diurético y depurativo	Infusión
<i>Cnicus benedictus</i>	Flores	Cnicina	Pérdida del apetito, dispepsia, diabetes y diurético	Infusión
<i>Cynara scolymus</i>	Hojas	Cinaropicrina	Enfermedades digestivas y hepáticas, diuréticas y prevención de la arteriosclerosis	Infusión, extracto seco y extracto líquido

Tabla N°3 Continuación

<i>Inula helenium</i>	Raíces y rizomas	Eudesmano	Respiratorias y enfermedades de las vías urinarias; utilizado externamente como antiséptico	Polvo y tinturas
<i>Lactuca virosa</i>	Hojas y látex	Lactucopicrina y Lactucina	Tos sedante, antiespasmódico e irritante	<i>Lactucarium</i> (el líquido lechoso secretado: látex)
<i>Tanacetum parthenium</i>	Flores	Partenólida y Costunolide	Dispepsia, migraña, artritis y febrífugo	Infusión y polvo
<i>Tanacetum vulgare</i>	Flores	Partenólida	Pérdida del apetito, vermífugo, disquinesia biliar y dismenorrea	Infusión y polvo

Las poblaciones humanas y animales están expuestos a las sesquiterpenlactonas en varios aspectos, y sobre todo a través del contacto directo con plantas y administración de agentes medicinales que contiene sesquiterpenlactonas o remedios a base de hierbas que las contienen.

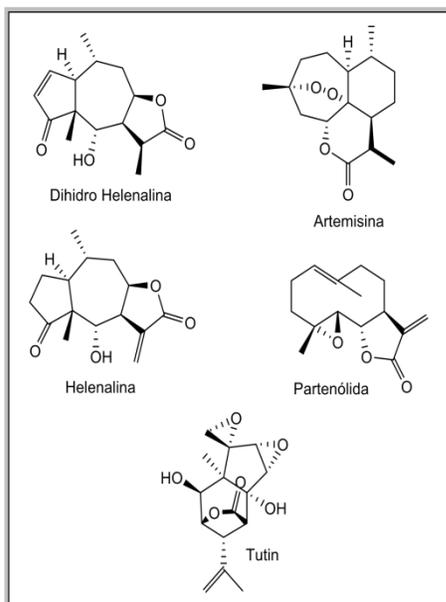
El uso empírico y etnobotánico generalizado de plantas ricas en sesquiterpenlactonas ha llevado al reconocimiento de su valor terapéutico amplio, sino también a la aparición de una toxicidad significativa. <sup>(34)</sup>

### 3.5.1 MECANISMOS GENERALES DE TOXICIDAD.

En términos mecanicistas generales, existen tres grupos principales de sesquiterpenlactonas que pueden considerarse: sesquiterpenlactonas alquilantes, no alquilantes y neurotoxinas (**Tabla N°4**), ejerciendo sus efectos tóxicos a través de diferentes mecanismos: alquilación de proteínas, la alquilación y daño oxidativo al ADN, el antagonismo de los receptores de GABA y glicina, la inhibición de la bomba SERCA, la inducción de reacciones de hipersensibilidad y la desregulación de los mecanismos epigenéticos. <sup>(2, 67)</sup>

**Tabla N°4.** Diferentes sesquiterpenlactonas divididas de acuerdo a su mecanismo de acción tóxico <sup>(2, 67)</sup>

Compuesto	Alquilantes	No alquilantes	Neurotoxinas
Dihidro Helenalina	X		
Tutin			X
Helenalina	X		
Artemisinina		X	
Partenólida	X		



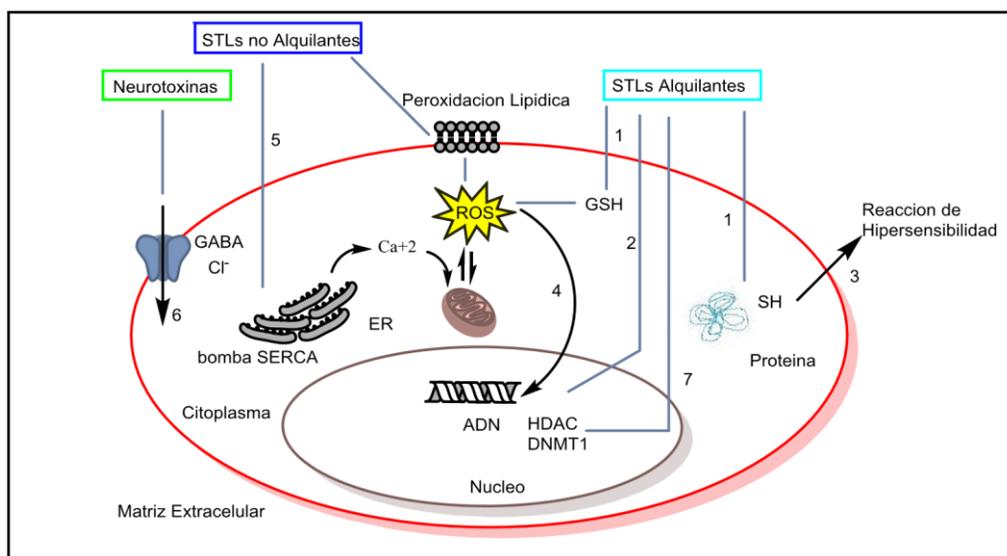
**Figura N°16.** Estructuras de sesquiterpenlactonas mencionadas en Tabla N°4 <sup>(2)</sup>

Las **sesquiterpenlactonas alquilantes** (que son la gran mayoría) actúan como electrófilos, que reacciona con los residuos proteicos de SH (grupos tiol) en las proteínas. Tales sesquiterpenlactonas pueden comportarse como haptenos que, al reaccionar con proteínas, originan un complejo hapteno-portador que es reconocido por el sistema inmune y provoca no deseado (hipersensibilidad) reacciones inmunes. <sup>(2, 67)</sup> También alteran las funciones de numerosas proteínas que contienen cisteína causando una variedad de lesiones en diferentes sistemas de órganos e inducen la acumulación de las ROS (especies reactivas derivadas del oxígeno).<sup>(2)</sup>

Las **sesquiterpenlactonas no alquilantes** actúan a través de la inhibición de una clase de enzimas que transportan  $\text{Ca}^{2+}$  (bomba SERCA). El calcio es liberado del retículo endoplásmico (ER) se aumenta los niveles de calcio citosólico.

El aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  a continuación, conducen a la alteración de numerosas funciones celulares, por ejemplo, causando estrés mitocondrial y aumento de la liberación de ROS de las mitocondrias. (2, 12)

Por último, las **sesquiterpenlactonas categorizadas como neurotoxinas**, estas sustancias actúan como antagonistas competitivos alostéricos de los canales de cloruro de los receptores acoplados de GABA y de glicina, que son estructuralmente similar a los canales GABA-A, mediante la unión a un sitio en su dominio extracelular específico, la reducción de  $\text{Cl}^-$  inducida por GABA afluencia a las neuronas postsinápticas, que se vuelven más susceptibles a la despolarización de los impulsos excitatorios, dando lugar a convulsiones, dañando el sistema nervioso central. (2, 58)



**Figura N°17.** Toxicidad por los diferentes mecanismos de acción de las sesquiterpenlactonas (2)

### **3.5.2 MECANISMOS DE TOXICIDAD DE LAS SESQUITERPENLACTONAS.**

- 1) El glutatión y la alquilación de proteínas, resultando en un aumento del estrés oxidativo y en los cambios funcionales de las proteínas alquiladas.
- 2) La alquilación del ADN, que puede conducir a mutaciones genéticas.
- 3) Las proteínas alquiladas son reconocidas por el sistema inmune y provocan reacciones de hipersensibilidad.
- 4) El estrés oxidativo se ve aumentado y lleva al daño oxidativo del ADN.
- 5) La inhibición de la bomba SERCA, lo que resulta en la acumulación de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico, lo cual interrumpe la homeostasis mitocondrial. La mitocondria es una importante fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS). La acumulación de ROS provoca más daños mitocondrial, lo que aumenta la liberación mitocondrial de ROS.
- 6) El antagonismo alostérico no competitivo de los receptores GABA en la entrada de  $\text{Cl}^-$  en la célula.
- 7) La desregulación de la maquinaria epigenética (HDAC1 y la inhibición DNMT1), lo que resulta en cambios epigenéticos tales como la hipometilación del ADN.<sup>(2)</sup>

### **3.5.3 EFECTOS TOXICOS DE LAS SESQUITERPENLACTONAS.**

#### **3.5.3.1 VENENO EN ANIMALES DE GANADO.**

Diferentes estudios comprueban que las sesquiterpenlactonas son altamente irritantes en los animales que consumen plantas ricas en este tipo de metabolitos secundarios, en especial las pertenecientes a la Familia Asteraceae, principalmente irritan la nariz, los ojos y el aparato gastrointestinal.<sup>(34)</sup>

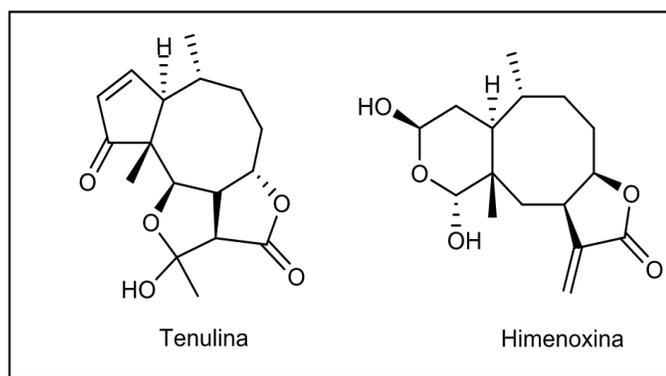
De hecho, las sesquiterpenlactonas son responsables de varios efectos tóxicos diferentes en mamíferos, con pérdidas de ganado que se presenta especialmente en ovejas y caballos, ya que estas especies son más

comúnmente expuestos a las plantas que contienen sesquiterpenlactonas debido a sus hábitos de pastoreo. <sup>(31)</sup>

El envenenamiento se refiere a menudo como “enfermedad que arroja” debido a que provoca vómito. Las ovejas afectadas pueden tener una mancha verde alrededor de la boca. El material vomitado es inhalado a menudo hacia los pulmones, causando la muerte por que provoca el daño en el pulmón de carácter permanente acompañado de tos crónica. Las lesiones primarias son irritación del aparato gastrointestinal, congestión del hígado y del riñón y daño pulmonar. <sup>(33) (59)</sup>

La formación de derivados clorados en el estómago se señaló como el mecanismo más probable toxicidad subyacente.

Entre tales compuestos causantes de este envenenamiento tenemos la **Tenulina** y la **Himenoxina** que proporciona sabor amargo a la leche de las vacas que ingieren la planta. <sup>(2, 48)</sup>



**Figura N°18.** Sesquiterpenlactonas aisladas de *Hymenoxys odorata* y de *Helenium amarum* causantes del envenenamiento en animales <sup>(2)</sup>

La toxicidad de Himenoxina hacia las ovejas se describe desde 1931. <sup>(20)</sup> con una LD<sub>50</sub> de 7mg/Kg y DL<sub>50</sub> de 75 mg/Kg por vía oral <sup>(68)</sup>, y puede ocurrir como una enfermedad aguda, subaguda o crónica. <sup>(2)</sup>

El envenenamiento subagudo fue reproducido experimentalmente en un grupo de siete ovejas por la alimentación diaria forzada de 1g/Kg de la planta durante 15 días. Después de 4-5 días, los síntomas incluyen pérdida de apetito, daños a nivel del sistema nervioso central (SNC), rinorrea mucoide y debilidad; dentro de 5-9 días, una oveja murió y cuatro estaban moribundas. <sup>(2, 74)</sup> Después de 15 días, cinco de los siete animales fueron muertos y dos estaban moribundos.

Se encontró en todos los ovinos expuestos una Glomerulonefrosis con glomérulos hinchados, y necrosis renal cortico-medular, lo cual concuerda con los síntomas de la oliguria y acidosis metabólica reportados en casos de subaguda a la intoxicación crónica. <sup>(2, 74)</sup>

Los suplementos dietéticos se propusieron como una opción para la prevención de la intoxicación crónica de ovejas, a saber, una combinación de sulfato de sodio de la comida de soja <sup>(63)</sup>, posiblemente debido a una alquilación preferencial de la soja rica en proteínas.

### **3.5.3.2 DAÑOS A NIVEL DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.**

En el sistema nervioso central los síntomas se presentan como la enfermedad de Parkinson e incluyen una alimentación alterada, hipertonia de labios y lengua, trastornos del movimiento facial, masticación innecesaria, depresión, debilidad, hipocinesia, hiperquinesia y, finalmente, la muerte. <sup>(2)</sup> Diferentes estudios realizados indican que la toxicidad a nivel de SNC es selectiva hacia los caballos más que para cabras y ovejas, ya que están no se ven afectadas a nivel de este sistema a pesar que pastan en las mismas plantas.

No se ha especificado con exactitud pero es posible que algunos procesos de desintoxicación que se producen en los compartimentos gástricos de los rumiantes, les permite evitar la enfermedad, mientras que los caballos, que son monogástricos, siguen en peligro. <sup>(2)</sup>

La utilización de ratones y ratas es una gran elección para este tipo de estudios, debido a que tienen un sistema digestivo monogástrico con una gran semejanza a la de los caballos. En las necropsias de los caballos, el cerebro muestra una necrosis por licuefacción bilateral del globo pálido y la zona reticulada de la sustancia negra. Los animales afectados no muestran signos de gastritis, enteritis o incluso daños en el hígado. <sup>(2)</sup>

### **3.5.3.3 SISTEMA CARDIOVASCULAR.**

A nivel cardiovascular, los efectos tóxicos se han mostrado en el músculo liso del corazón y en el miocardio. Así, distintas preparaciones vegetales ricas en sesquiterpenlactonas han sido evaluadas en conejos y cerdos de guinea para determinar el daño tóxico generado.

La sesquiterpenlactona Partenólida, aislada de *Tanacetum parthenium* en 1993 fue la causante del efecto inhibitorio de la contractilidad del músculo liso en aorta de conejos.<sup>(2, 5)</sup> La *Eupatorium rugosum* (nombre común: Serpentaria blanca; Familia: Asteraceae), en un estudio llevado a cabo en 1997, fue consumida por caballos, provocando necrosis del músculo del corazón.<sup>(41)</sup> La Helenalina (ver **Figura N°16**) ejerce una actividad inotrópica positiva en preparaciones de miocardio de cerdo de guinea y, cuando se administra en dosis más altas, ejerce un irreversible actividad inotrópica negativa.<sup>(2, 10)</sup>

### **3.5.3.4 SISTEMA RENAL.**

La toxicidad de los dos extractos de hojas de una hierba nativa de los Andes conocida como Yacón (*Smallanthus sonchifolius*; Familia: Asteraceae) rica en sesquiterpenlactonas, fue evaluada recientemente en un estudio de dosis repetidas en ratas Wistar durante 90 días.<sup>(2)</sup>

En varios países alrededor del mundo, entre ellos Brasil, sus raíces son utilizadas como alimentos dietéticos, y las hojas son útiles en la medicina popular para el tratamiento de trastornos hiperglucémicos de la diabetes mellitus.

Los investigadores informaron de los parámetros bioquímicos alterados en muestras de sangre periférica que sugieren daño renal.<sup>(2)</sup>

Las características histológicas de los riñones de las ratas tratadas mostraron una reacción inflamatoria con células polimorfas nucleares y lesiones compatibles con una glomerulonefrosis crónica, similar a un síndrome típico de toxicidad por la ingestión de Tenulina e Himenoxina.<sup>(2)</sup>

También las ratas tratadas mostraron signos de toxicidad como hipoactividad y astenia en comparación con las ratas control. Los análisis bioquímicos demostraron mayores niveles de AST (aspartato aminotransferasa), triglicéridos, albúmina, proteínas totales, creatinina, la cual presente en suero es un indicador de un daño, y la glucosa, que en casos de enfermedad crónica tiende a aumentar.<sup>(2)</sup>

Las alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos se han relacionado en los pacientes con enfermedad renal crónica. Estas alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos, se mostró a ser caracterizado por el aumento de los niveles de colesterol total y triglicéridos.<sup>(2)</sup>

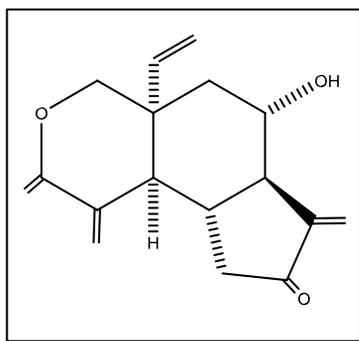
Las alteraciones morfológicas observadas en el estudio, las alteraciones bioquímicas encontradas en la sangre, en conjunto, confirman que las dosis repetidas de hojas de yacón muestran daño renal grave caracterizado por la degeneración de los glomérulos y material amorfo depositado en la parte interior de los túbulos renales, debido a la variedad in vivo de efectos tóxicos mostradas por las sesquiterpenlactonas presentes en el extracto se debe tener

especial cuidado si se administra por vía oral, incluso en dosis pequeñas, aunque no se recomienda el uso oral de hojas de yacón.<sup>(2)</sup>

### 3.5.3.5 HIGADO Y TRACTO GASTROINTESTINAL.

De las vías gastrointestinales y del hígado, las sesquiterpenlactonas son irritantes de las mucosas y se cree generalmente que la mayoría de los tienen una actividad gastro irritante. <sup>(2, 39, 67)</sup> La sesquiterpenlactona Vernolepina (Ver **Figura N°19**) aislada de *Vernonia amygdalina*, un miembro de la Familia Asteraceae <sup>(24)</sup>, en un estudio fue administrada a conejillos de indias presenta efectos potenciadores e inhibitorios sobre la contractilidad del músculo liso intestinal. <sup>(2, 44)</sup>

La Helenalina se administró a ratones de la cepa BDF y fue la causante de generar obstrucción intestinal, además de otros efectos tóxicos.



**Figura N°19.** Sesquiterpenlactona Vernolepina, aislada de la planta *Verona amygdalina* <sup>(2)</sup>

### 3.5.3.6 DERMATITIS E IRRITACION EN LA PIEL.

Varias sesquiterpenlactonas (no alquilantes) aumentaron las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico, dando lugar a una amplia degranulación de los mastocitos y la liberación de histamina, que resulta en irritación de la piel.<sup>(2, 62, 65, 67)</sup>

Además de inducir directamente la degranulación de mastocitos, algunas sesquiterpenlactonas como por ejemplo, Partenólida, la cual ha demostrado ser un hapteno, es capaz de causar una llamada dermatitis de contacto alérgica en los seres humanos.<sup>(2)</sup>

Existe evidencia de que no sólo el contacto directo con partes de plantas genera la alergia, sino también en contacto con los alérgenos transportados por el aire pueden desencadenar la enfermedad. Las STLs parecen ser los principales alérgenos de plantas, pero también hay evidencia de que algunos monoterpenos emitidos pueden estar involucrados en la dermatitis de las Asteráceas.

**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLOGICO**

## 4.0 DISEÑO METODOLOGICO

### 4.1 TIPO DE ESTUDIO

La presente investigación se catalogó como un **estudio retrospectivo** porque tuvo como base diferentes estudios anteriores realizados acerca de la actividad tóxica de las sesquiterpenlactonas y de la familia Asteraceae, así como de *Calea urticifolia*. También se catalogó como un **estudio experimental** porque con los resultados que se obtuvieron utilizando animales de experimentación, se determinó el efecto tóxico que origino en ellos el extracto *n*-hexánico de las hojas de *Calea urticifolia*.

### 4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se realizaron consultas en publicaciones científicas, libros, trabajos de graduación, en las siguientes bibliotecas:

- Universidad de El Salvador: en la Biblioteca “Dr. Benjamín Orozco” de la Facultad de Química y Farmacia, Biblioteca Central, y Biblioteca de la Escuela de Biología.
- Revistas científicas.
- Internet

### **4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO**

#### **4.3.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

La recolección de las hojas de *C. urticifolia* se realizó a un costado del parqueo de la Facultad de Química y Farmacia, en el campus central de la Universidad de El Salvador una vez por mes.

Las colectas fueron codificadas de la siguiente manera:

- E1 para el mes de enero
- E2 para el mes de febrero
- E3 para el mes de marzo

### **4.4 PARTE EXPERIMENTAL**

#### **4.4.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS A INVESTIGAR**

A continuación de la recolección de las hojas, estas fueron colocadas en bandejas metálicas cubiertas con papel filtro, posteriormente fueron secadas a temperatura ambiente, es decir, a 25 grados centígrados a claridad. Después, el material vegetal fue molido y almacenado en un lugar fresco y seco con su debida identificación.

#### **4.4.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO *n*-HEXÁNICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia***

Se pesaron aproximadamente 150 g del material vegetal de cada una de las muestras recolectadas, las cuales se extrajeron con 500 mL de *n*-hexano como solvente selectivo hasta agotamiento de la muestra haciendo uso del método Soxhlet, obteniendo un extracto fluido el cual, fue colocado en un vaso de precipitado de 600 mL previamente pesado y se llevó a una cámara extractora

de gases y se eliminó el *n*-hexano, a partir de los cuales se obtuvieron tres extractos secos madre, uno por cada mes recolectado, estos fueron pesados para el cálculo del porcentaje de rendimiento, para ello los extractos se codificaron como:

**E1:** enero

**E2:** febrero

**E3:** marzo

#### 4.4.3 IDENTIFICACIÓN DE SESQUITERPENLACTONAS EN EL EXTRACTO *n*-HEXÁNICO POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Se desarrolló la cromatografía de las 3 muestras, una de cada mes recolectado, en placas de cromatografía de capa fina que fueron aplicadas por medio de tubo capilar sobre gel de sílice como fase estacionaria, de 0.25 mm de espesor del tipo Sílica gel POLYGRAM®SILG/UV 254, 20 x 10 cm. La Tabla N°5 recoge las condiciones para la realización de la capa fina.

**Tabla N°5.** Condiciones para realizar la cromatografía de capa fina <sup>(66)</sup>

<b>Fase estacionaria</b>	Sílica gel POLYGRAM®SILG/UV 254
<b>Fase móvil</b>	Benceno-Acetato de etilo (2:8).
<b>Muestras</b>	Extractos <i>n</i> -hexánicos de <i>Calea urticifoliade</i> las diferentes colectas (E1, E2 y E3)

**Tabla N°5.**Continuación

<b>Marcador</b>	Datos de referencia teórico de Juanislamina
<b>Revelador</b>	Reactivo de Baljet
<b>Evidencia</b>	Manchas color naranja

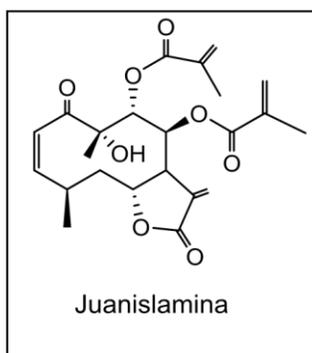
Las muestras fueron comparadas con el valor teórico de  $R_f$  del marcador (Juanislamina), la estructura química del marcador fue obtenida previamente de *Calea urticifolia* a través de un Proyecto de Cooperación Interuniversitaria con la Universidad de La Laguna España 2013.<sup>(55)</sup>(Ver **Figura N°20**)

Luego, se determinó el  $R_f$  de cada mancha revelada, por medio de la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia de la muestra desde el origen}}{\text{Distancia del eluyente desde el origen}}$$

#### 4.4.4 IDENTIFICACIÓN DE SESQUITERPENLACTONAS EN EL EXTRACTO *n*-HEXÁNICO POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA <sup>(66)</sup>

- Se pesaron 10 mg de extracto *n*-hexánico seco
- Se disolvió lo anteriormente pesado en 10.0 mL de alcohol etílico absoluto.
- Las lecturas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-Vis (**marca:** Shimadzu, **modelo:** UV-1800) haciendo un barrido de 190 a 400 nm.
- Los espectros obtenidos se compararon con el del marcador obtenido previamente de esta especie vegetal. (Ver **Figura N°20**)



**Figura N°20.** Estructura química del marcador Juanislamina <sup>(55)</sup>

#### 4.4.5 ESPECTROSCOPIA POR RMN <sup>1</sup>H

Por medio del Proyecto de Cooperación Interuniversitaria con la Universidad de La Laguna, España 2013 <sup>(55)</sup> el extracto *n*-hexánico fue eluido y fraccionado para obtener las sesquiterpenlactonas puras por medio Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN <sup>1</sup>H), de la cual se obtuvo el metabolito Juanislamina que fue utilizado como marcador analítico en la identificación espectroscópica ultravioleta visible.

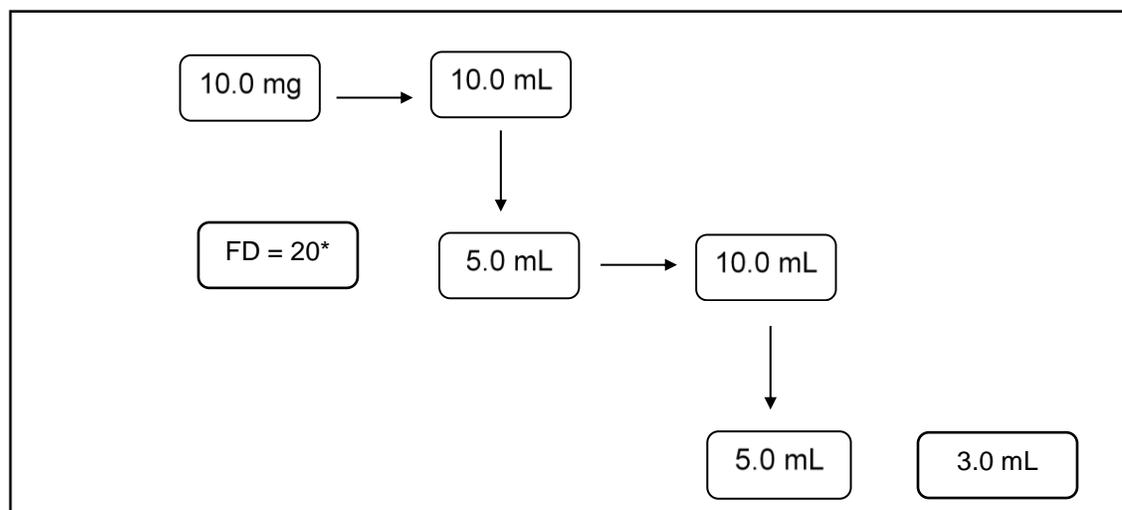
#### 4.4.6 CUANTIFICACIÓN DE SESQUITERPENLACTONAS (STLs) TOTALES MEDIANTE ESPECTROSCOPIA VISIBLE <sup>(27)</sup>

- Se pesaron 10.0 mg de extracto seco.
- Se disolvió la muestra en alcohol etílico absoluto y llevándola a volumen de 10.0 mL con el mismo alcohol absoluto, Se agregaron 3 gotas de Tween 80 para facilitar la disolución del extracto.
- Se tomó una alícuota de 5.0 mL y se llevó a volumen de 10.0 mL con alcohol etílico absoluto. (Ver **Figura N°21**)
- A 5.0 mL de la solución anterior se agregó 3.0 mL de solución alcalina de picrato de sodio.

- Se dejó reposar por 30 minutos protegiéndolas de la luz y se determinó la máxima absorbancia de cada solución a 495 nm.
- Se utilizó como blanco una mezcla de 5.0 mL de alcohol etílico absoluto, 3.0 mL de solución alcalina de picrato de sodio <sup>(66, 71)</sup> y tres gotas de Tween 80.
- Se realizó por quintuplicado para cada uno de los tres extractos
- Se llevó a cabo las lecturas de las muestras en espectrofotómetro UV-VIS
- Se utilizó Juanislamina como marcador analítico.

NOTA: la concentración y la absorbancia del marcador se obtuvo de una investigación previa de medicina tradicional. <sup>(71)</sup>

La **Figura N°21** muestra la cascada de dilución del tratamiento de las muestras para la cuantificación de STLs totales, al realizar los cálculos para determinar el factor de dilución, cuyo resultado fue de 4.



**Figura N°21.** Cascada de dilución de las muestras

El método de cuantificación desarrollado en el presente trabajo es una adaptación de la Monografía de Digoxina publicada en la Farmacopea italiana<sup>(27)</sup> en el cual para desarrollar los cálculos del factor de dilución donde la fórmula

nos específica: volúmenes hechos entre alícuotas tomadas, es importante mencionar que tomamos en cuenta los 5 mL tomados en la última alícuota que se lee en el espectrofotómetro, \*basándonos en el hecho de que es una investigación fitoquímica, lo que implica que la composición del extracto contiene una matriz compleja formada por metabolitos secundarios que pueden enmascarar o incrementar la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro, revelando una concentración diferente, por lo tanto se tuvo que ajustar el valor del Factor de dilución de 20, dividiéndolo entre 5, que considera el valor de la dilución final, lo que también se hizo en investigaciones previas del estudio de sesquiterpenlactonas en extractos vegetales, empleándose para los cálculo de concentración en el presente trabajo un factor de dilución de 4.

El cálculo de la cantidad de mg de sesquiterpenlactonas presentes en las alícuotas de las muestras, se realizó utilizando la siguiente fórmula de la Ley de Beer:

$$C_{mx} = \frac{(C_{marc.})(A_{mx})}{A_{marc.}} \times FD$$

Donde:

$C_{mx}$  = Concentración de la alícuota de la muestra

$C_{marc}$  = Concentración del marcador analítico

$A_{marc.}$  = Absorbancia del marcador analítico

$A_{mx}$  = Absorbancia de la alícuota de la muestra

FD = Factor de dilución

Las lecturas de las muestras se realizaron en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (Shimadzu UV-1880). A las concentraciones obtenidas en el proceso de cuantificación se les determinó la desviación estándar. (27)

Y se determinaron además los porcentajes de sesquiterpenlactonas totales expresadas como el marcador mayoritario (Juanislamina) en el extracto *n*-hexánico seco así:

#### **- CANTIDAD DE SESQUITERPENLACTONAS (STLs) EN EXTRACTO *n*-HEXÁNICO SECO**

Antes de calcular porcentajes de sesquiterpenlactonas, era necesario conocer la cantidad en gramos de ellas que está presente en el extracto *n*-hexánico seco para luego establecer las relaciones respectivas. Para esto se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto } n\text{-hexánico seco} = \frac{\left( \text{Cantidad de STLs totales en alicuota de la muestra} \right) \left( \text{Peso extracto seco (g)} \right)}{\text{Peso mx (g)}}$$

#### **- PORCENTAJE DE SESQUITERPENLACTONAS TOTALES (STLs) EXPRESADAS COMO JUANISLAMINA PRESENTES EN EXTRACTO *n*-HEXÁNICO SECO**

Es el porcentaje que establece la cantidad en gramos de STLs presentes por cada cien gramos de extracto *n*-hexánico seco. El porcentaje de STLs totales expresadas como Juanislamina en el extracto *n*-hexánico seco, se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto } n\text{-hexánico seco} = \frac{\text{Peso de sesquiterpenlactonas en la mx expresadas como Juanislamina (g)}}{\text{Peso del extracto } n\text{-hexánico seco (g)}} \times 100$$

#### 4.4.7 DISEÑO ESTADÍSTICO

En el diseño estadístico se analizaron los datos, utilizando la desviación típica estándar y sus respectivos intervalos de confianza para obtener los resultados de cantidad de STLs totales expresadas como mg de Juanislamina en alícuota de la muestra.

##### 4.4.7.1 DESVIACIÓN TÍPICA ESTÁNDAR

Es la más importante de las medidas de dispersión; puede definirse como la raíz cuadrada de la media aritmética del cuadrado de las desviaciones de cada valor de la variable con respecto a la media. Es útil para obtener el intervalo de confianza.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

**Donde:**

**S** =Desviación típica estándar.

**X<sub>i</sub>** =Muestra individual.

$\bar{X}$  =Promedio de muestras.

**n** =Numero de muestras.

$\sum_{i=1}^n$  = Sumatoria desde muestra 1 a *n* número de muestras.

La desviación típica estándar fue calculada mediante Microsoft Office Excel 2010.

##### 4.4.7.2 INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%

Es un rango de valores (calculado en una muestra) en el cual se encuentra el verdadero valor del parámetro, con una probabilidad determinada. Este valor nos mostró que tan confiable son los resultados ya que se hicieron por quintuplicado.

**Dónde:**

**IC** ( $\mu$ ) = intervalo de confianza

**X** = Promedio de muestras

**t** = *t* de student

**n-1** = Grados de libertad

**S** = Desviación típica estándar

**n** = número de muestras

Tanto la desviación estándar como los intervalos de confianza, permitieron evidenciar que tan dispersos se encuentran los datos de los valores promedios. Las mismas fueron calculadas mediante Microsoft Office Excel 2010.

#### **4.4.8 DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA DEL EXTRACTO *n*-HEXÁNICO DE *C. urticifolia***

Según el protocolo de la *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) en su Guideline for Testing of Chemical N° 423, numerales 19, 22 y 23 <sup>(30)</sup>; cuando la mortalidad es poco probable sugiere iniciar con un ensayo a una dosis límite de 2000 mg/Kg, puesto que no hay datos reportados de toxicidad a dosis bajas del género *Calea*; se determinó realizar el ensayo de toxicidad crónica oral, avanzando a la siguiente etapa según el diseño metodológico: la toxicidad subcrónica a dosis repetidas de 90 días.

#### 4.4.8.1 ANIMALES EXPERIMENTALES

Para el ensayo se emplearon 30 ratones menores a 6 semanas de vida, sanos, que no habían sido sometidos a experimentos previos, de la cepa NIH de ambos sexos, 15 hembras y 15 machos, con peso corporal entre 20 y 30 g, todos procedentes del Laboratorio de Experimentación Animal del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), donde se mantuvieron a una temperatura de  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , una humedad relativa entre 50 y 70% y con un ciclo luz-oscuridad de 12/12 horas. <sup>(10)</sup>

Se formaron 6 grupos de 5 ratones cada uno del mismo sexo, se marcaron con ácido pícrico para su identificación individual de 1 a 5 en cada grupo. La alimentación consistía en una dieta estándar a base de concentrado peletizado para roedor y agua a voluntad. Todos los animales fueron pesados una vez por semana y examinados clínicamente antes del ensayo para certificar su estado de salud. <sup>(10, 18, 19)</sup>

#### 4.4.8.2 DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN

La sustancia de ensayo se disolvió en agua destilada, formando una disolución acuosa y para la preparación de ésta se fue ajustando en base al peso promedio de cada grupo de ratones registrado semanalmente, La dosis administrada a los animales en estudio, se determinó por medio de pruebas de solubilidad del extracto *n*-hexánico seco a concentraciones de 150 mg/kg, 200 mg/kg y 300 mg/kg, ya que por la naturaleza no polar del solvente de extracción (*n*-hexano) la solubilidad del extracto seco en agua para la preparación de las soluciones es muy baja.

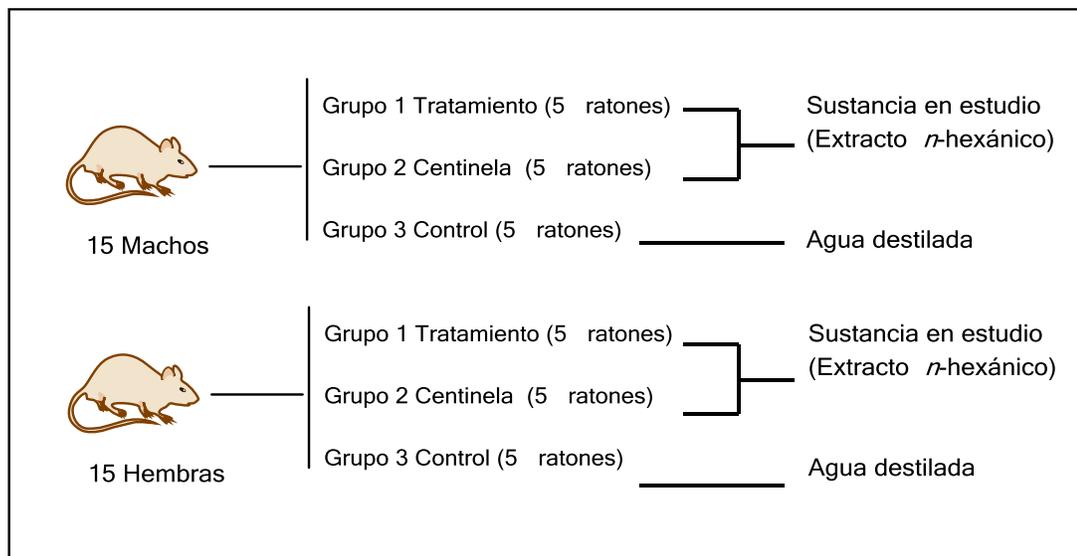
La administración de la solución del extracto se realizó vía oral, diariamente por 90 días, empleando una cánula intragástrica rígida 19 G cada 24 h, el volumen

administrado fue en relación con su peso corporal, sin exceder el volumen máximo de 0.2 mL. <sup>(10)</sup>

#### 4.4.8.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

De un total de 30 animales, tanto hembra como machos, se formaron 2 grupos experimentales 15 hembras y 15 machos, dentro de los 15 animales hembra se agruparon 5 animales en cada subgrupo con un total de 3 subgrupos; de los cuales se denominó: tratamiento (5 animales), centinela (5 animales) y control (5 animales). De igual manera se realizó la misma división para machos. Los grupos: **tratamiento** y **centinela** fueron tratados con la sustancia en estudio (extracto *n*-hexánico seco de las hojas de *C. urticifolia*) y los grupos **control** a los que se les administró agua destilada, fueron manipulados de la misma forma que los grupos tratados con la sustancia en estudio. Todo esto siguiendo los lineamientos de protocolos de toxicidad<sup>(19)</sup>(Ver **Figura N°22**)

La norma OECD 408 (toxicidad a dosis repetidas de 90 días) en su párrafo 12 menciona la necesidad de utilizar ambos sexos. Esto se explica por las diferencias en cuanto a la respuesta biológica diferenciada entre machos y hembras, lo que ofrece información más detallada del potencial tóxico de una sustancia en estudio. Al trabajar los grupos homogéneos del mismo sexo se obtuvo una mejor apreciación de la susceptibilidad y el potencial tóxico, basados en la norma. <sup>(18, 19)</sup>



**Figura N°22.** Grupos experimentales utilizados en la investigación

#### 4.4.8.4 PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE LAS DOSIS

La sustancia de ensayo se pesó dos veces por semana y luego se disolvió en agua destilada, utilizando un sonicador para agilizar el proceso de disolución y agregando tres gotas de Tween 80, llevando a volumen la solución en un balón volumétrico de 10.0 mL, posteriormente se llevó a un congelador donde permaneció cada día después de su uso a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La sustancia de ensayo se administró a los grupos tratamiento y centinela a la dosis que se determinó en base al peso corporal, calculando una media de los pesos de cada grupo, en condiciones óptimas, seis días por semana durante un período de 90 días. Los animales de los lotes centinela previstos para las observaciones complementarias se conservaron en observación durante 30 días más, sin tratamiento, con el fin de descubrir la recuperación o la persistencia de los posibles efectos tóxicos. <sup>(19)</sup>

#### 4.4.8.5 OBSERVACIONES CLÍNICAS DURANTE EL ESTUDIO

Se realizó una revisión clínica detallada antes de la primera exposición (para poder realizar comparaciones al mismo individuo), y a partir de entonces la observación clínica se realizó en todos los animales diariamente. <sup>(10, 18, 19)</sup>

Estas observaciones se hicieron fuera de la jaula de alojamiento en un ambiente normal (especificado anteriormente), y a la misma hora, en donde se registraron sistemáticamente los signos clínicos de los principales sistemas de órganos que pueden evaluarse macroscópicamente y que incluyen: piel, ojos y membranas mucosas, sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, actividad somatomotora y patrones de comportamiento. (Ver **Tabla N° 6**) <sup>(10, 18, 19)</sup>

**Tabla N°6.** Descripción de parámetros de toxicidad en animales de experimentación <sup>(19)</sup>

Parámetros de Toxicidad	Observaciones Clínicas
Apariencia del pelo	Textura, color, caída.
Apariencia de la piel	Enrojecimiento, sequedad, exudación.
Ojos y membranas mucosas	Enrojecimiento, sequedad, secreción anormal.
Ataxia	Pérdida del equilibrio, caminata errática
Parálisis	Pérdida de respuesta en cualquier extremidad
Reacción a estímulos	Respuesta al tacto o al ruido
Vasoconstricción periférica	Palidez
Vasodilatación periférica	Enrojecimiento
Pilo-erección	Pelaje erizo

**Tabla N°6** Continuación

Salivación	Exceso de secreción bucal
Actividad Motora	Aumento o disminución de la actividad normal, refleja o no.
Tremores y Convulsiones	Contracción muscular anormal espontánea. Contracción o estiramiento muscular descontrolado.
Respiración	Aumento o disminución en la frecuencia respiratoria.
Deshidratación	Prueba de Robinou: pellizco de la piel, sin el retorno de esta a su posición normal.
Diarrea	Heces blandas o deposición acuosa.

Los animales deben observarse cuidadosamente después de la canulación al menos durante los primeros 30 minutos y periódicamente durante las primeras 24 horas con especial énfasis durante las primeras 4 horas. (10, 18, 19)

#### **4.4.8.6 PESO CORPORAL**

Los animales se pesaron una vez por semana y al final del ensayo a los 90 días se pesaron antes del sacrificio, para grupos centinelas de ambos sexos se volvió a tomar el peso al terminar el mes de observación complementaria. El control de peso se tomó como parámetro de toxicidad.

#### **4.4.8.7 DETERMINACIÓN DEL PUNTO FINAL**

Los animales no deben ser sometidos a dolor o un sobre estrés innecesariamente, el diseño experimental permite definir todas las salvaguardias posibles, para lo cual, el punto final debe tomarse en cuenta basado en los cinco aspectos:

- Cambio en el peso corporal (y cambios relacionados con el consumo de agua y alimento)
- Apariencia física exterior
- Signos clínicos medibles. Por ejemplo: cambios en la frecuencia cardiaca, respiratoria y su naturaleza.
- Cambios en la conducta espontánea
- Respuestas conductuales a estímulos externos.

Dichos parámetros se determinan mediante la realización de las observaciones apropiadas a los animales. <sup>(10, 18, 19)</sup>

#### 4.4.8.8 EXÁMENES HEMATOLÓGICOS

Se tomaron muestras de sangre de cada uno de los 30 animales experimentales previo a su sacrificio al finalizar el ensayo de los 90 días para grupos control y tratamiento, tomando las muestras de sangre para grupos centinela después del mes de observación complementario, mediante la técnica de extracción de sangre de seno retro-orbital sujetando al ratón estirando la piel del cuello hacia atrás asegurándose de no dificultar la respiración, inmediatamente se introduce un capilar heparinizado en el ángulo externo del ojo (2 mm aproximadamente) y se giró suavemente hasta que la sangre fluyera por el mismo (ver **anexo N°2**).<sup>(10, 21)</sup> Con la muestra obtenida mediante la técnica descrita anteriormente se determinaron los indicadores hematológicos:

- Hemoglobina (Hb)
- Hematocrito (Hto)
- Glóbulos rojos (GR)
- Glóbulos blancos (GB)
- Neutrófilos (N)
- Linfocitos (L) <sup>(10, 18, 19, 21)</sup>

#### **4.4.8.9 BIOQUÍMICA CLÍNICA**

Se tomaron muestras de sangre de cada animal experimental para pruebas bioquímicas mediante la técnica de extracción de sangre de seno retro-orbital, la sangre se centrifugó para separar suero y plasma y se almacenó a -20°C para su posterior su análisis.

Se determinaron los valores de:

- Glucosa
- Colesterol
- Urea
- Nitrógeno
- Creatinina
- Bilirrubina
- Y dos enzimas indicadoras de los efectos hepatocelulares: alanina aminotransferasa (TGA) y aspartato aminotransferasa (TGO)

Las determinaciones sanguíneas y bioquímicas se realizaron mediante el equipo automatizado marca Beckman Coulter - AU 680 en el Laboratorio de Química Clínica del Hospital Nacional Rosales. (Ver **anexo N°4**)

#### **4.4.8.10 SACRIFICIO Y NECROPSIAS**

Transcurridos los 90 días del estudio, y después de la toma de muestras de sangre, los animales se sacrificaron por dislocación cervical para la necropsia y se efectuó un estudio macroscópico de los órganos internos: corazón, pulmones, riñones, hígado, estómago, bazo, intestino delgado e intestino grueso con su respectivo peso. <sup>(3)</sup>Se realizó un examen exhaustivo de la apariencia, superficie, consistencia, y color de cada órgano; con el fin de obtener datos suficientes para establecer la presencia o ausencia de lesiones.

Mediante este tipo de información se complementó la interpretación de los resultados obtenidos en los exámenes hematológicos, bioquímicos, estudio macroscópico y las variaciones de peso corporal.<sup>(10, 18, 19)</sup>

#### **4.4.8.11 EXÁMENES HISTOPATOLÓGICOS**

Los órganos evaluados durante la necropsia se preservaron en formalina al 10%. Todos los órganos más susceptibles a sufrir algún tipo de lesión por ser los encargados del metabolismo y eliminación de sustancias tóxicas en el organismo, fueron procesados por medio de la técnica histopatológica clásica para bloques parafinados, cortadas en 5µm con un micrótomo y coloreadas con hematoxilina–eosina, para luego ser leídos al microscopio por un patólogo. <sup>(10, 18, 19)</sup>

#### **4.4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los datos obtenidos de los análisis hematológicos, bioquímicos y cortes de órganos en cada uno de los parámetros serán estadísticamente evaluados con el software SPSS para Windows.

La prueba de hipótesis incluyó el análisis t de Student para muestras relacionadas y para muestras independientes. Se utilizó la desviación típica estándar y se tomó el 95 % como índice de confiabilidad estadística ( $p < 0.05$ ). Todos los resultados se expresaron como la Media  $\pm$  la Desviación Estándar de los grupos experimentales. Y para contrastar la normalidad de los datos se utilizó el Test de Shapiro–Wilk.

**CAPITULO V**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

## 5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.1 IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL

*Calea urticifolia* fue identificada en una investigación previa por el botánico encargado del herbario del Jardín Botánico la Laguna; con número de Voucher RAC00717, realizado utilizando muestras colectadas el 12 de febrero de 2012. (Ver **Anexo N°1**) <sup>(73)</sup>

### 5.2 RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las hojas de *Calea urticifolia*, fueron colectadas una vez por mes durante los meses de enero, febrero y marzo de 2014, colocadas en bandejas metálicas cubiertas con papel filtro y se dejaron secar a claridad bajo una temperatura de 25°C. (Ver **Figura N°23**)



**Figura N°23.** Secado de hojas de *Calea urticifolia*

A las tres recolectas de *Calea urticifolia* se le asignó un código, el cual se muestra en la Tabla N°7.

**Tabla N°7.** Códigos asignados a las muestras recolectadas

<b>Mes de colecta</b>	<b>Código</b>
Enero 2014	E1
Febrero 2014	E2
Marzo 2014	E3

### **5.3 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO *n*-HEXÁNICO SECO**

Se realizó la extracción del material colectado por cada mes, se llevó a cabo hasta agotamiento de las muestras (ver **Figura N°24**). Luego se procedió a eliminar el solvente *n*-hexano colocando los extractos fluidos en vasos de precipitados de 600 mL previamente pesados, que se llevaron a una cámara extractora de gases para evaporar el *n*-hexano y así obtener el extracto seco de cada una de las tres colectas. Posteriormente se pesó cada vaso de precipitado y se calculó el porcentaje de rendimiento (Ver **Tabla N°8**).

Los tres extractos secos resultantes fueron utilizados para la identificación y cuantificación de las sesquiterpenlactonas en el material vegetal colectado.



**Figura N°24.** Aparato Soxhlet

**Tabla N°8.** Porcentaje de rendimiento de extracción en base al peso de las hojas secas y del extracto *n*-hexánico seco de cada una de las tres colectas realizadas de *C.urticifolia*.

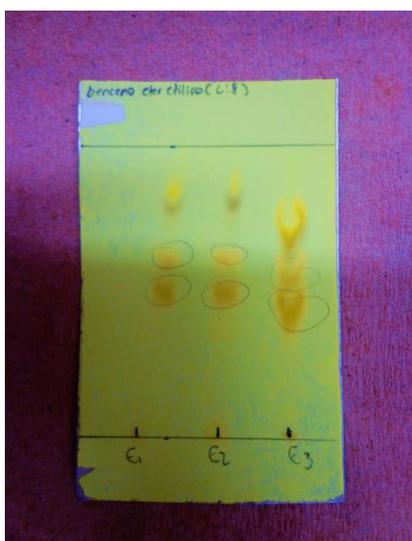
Código de muestra	Peso muestra de las hojas secas de <i>C. urticifolia</i> molida (g)	Peso extracto <i>n</i> -hexánico de <i>C. urticifolia</i> seco (g)	Porcentaje de rendimiento
E1 enero	119.1	9.5	7.98
E2 febrero	120.9	9.8	8.11
E3 marzo	117.2	9.4	8.02

El porcentaje de rendimiento de extracción más alto (ver **Tabla N°8**) se obtuvo con la muestra E2 (perteneciente al mes de febrero) con 8.11% por el contrario la muestra con menor porcentaje fue la del mes de enero, sin embargo la diferencia es muy mínima entre las tres recolectas. Lo que nos indica que el mejor mes para recolectar la planta es el mes de febrero.

#### 5.4 RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE LAS SESQUITERPENLACTONAS EN EL EXTRACTO *n*-HEXÁNICO POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La realización de la cromatografía en capa fina se llevó a cabo bajo las condiciones que se mostraron anteriormente en la **Tabla N°5**.

Al revelar la placa cromatográfica, se identificó la presencia de sesquiterpenlactonas, evidenciado por el apareamiento de manchas color naranja similar a las presentadas por el marcador. Todo esto se realizó en una cámara extractora de gases. (Ver **Figura N°25** y **Tabla N°5**) Las manchas naranjas evidencian la presencia de lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas; que forman parte de la estructura química de las sesquiterpenlactonas. <sup>(28)</sup>



**Figura N°25.** Cromatograma de cada uno de los tres extractos *n*-hexánicos de *Calea urticifolia* usando reactivo de Baljet como revelador

El marcador analítico tomado como referencia no aparece en el cromatograma debido a que el dato de su  $R_f$  fue tomado de una investigación previa donde el resultado fue de 0.73. <sup>(66)</sup>

Al calcular la relación entre la distancia de la muestra con respecto al eluyente ( $R_f$ ) se encontró una similitud entre los  $R_f$  de los tres extractos y el  $R_f$  del marcador quimiotaxonómico de la familia Asteraceae: Juanislamina, la cual, es una de las sesquiterpenlactonas mayoritarias en *C. urticifolia*.<sup>(66)</sup> (**Tabla N°9**) <sup>(11)</sup>

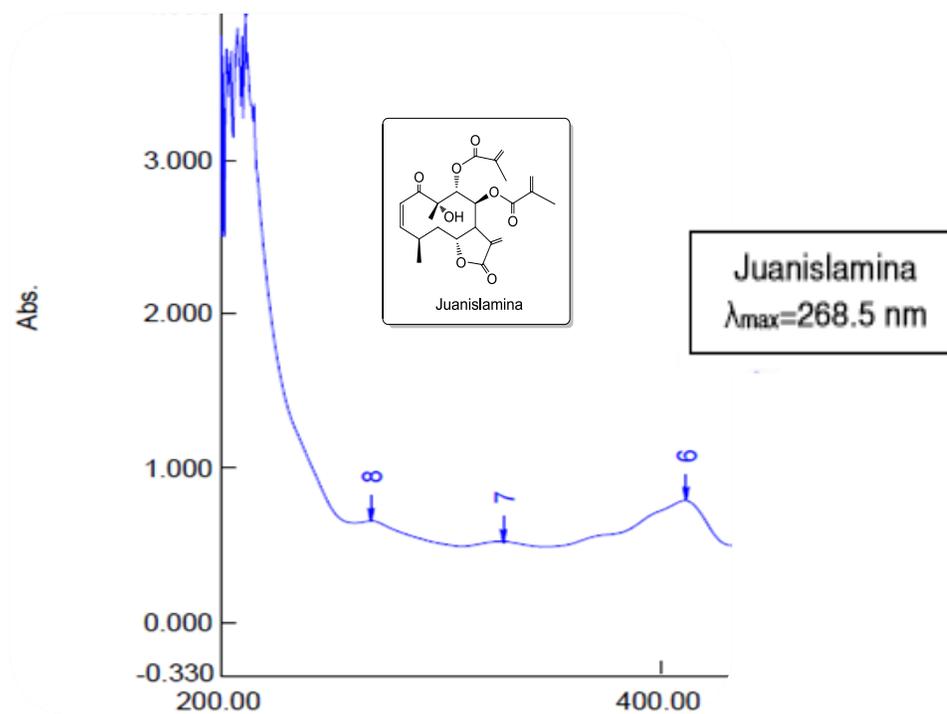
**Tabla N°9.** Resultados de  $R_f$  obtenidos de la cromatografía en capa fina de los tres extractos

Código de los extractos	$R_f$ de la mancha
E1	0.75
E2	0.79
E3	0.72
Juanislamina	0.73

## 5.5 RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE SESQUITERPENLACTONAS EN EL EXTRACTO *n*-HEXANICO POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

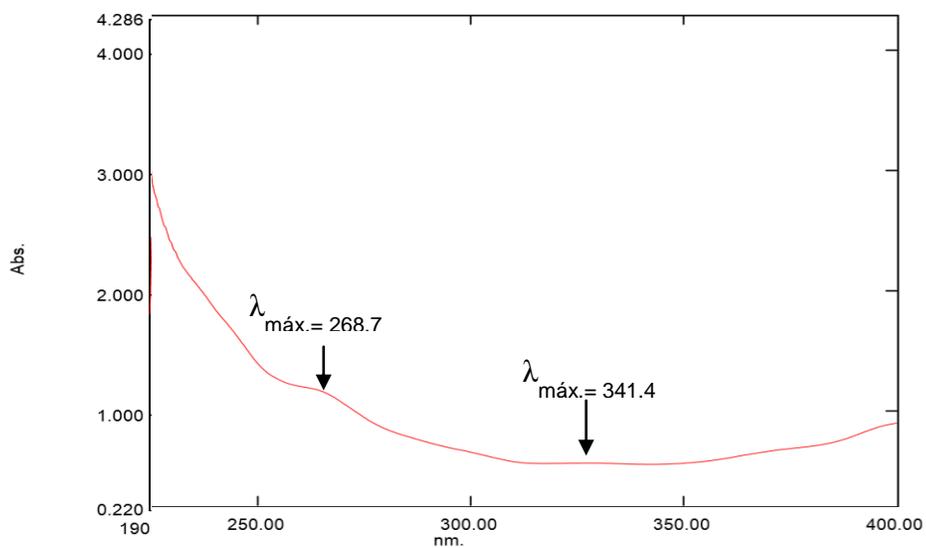
Se obtuvieron los espectros UV haciendo un barrido desde 190 nm hasta 400 nm para la identificación de las lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas de las sesquiterpenlactonas. Esperándose máximos de absorción entre 265-275 nm. Al obtener los respectivos espectros se determinó que se definían mejor al hacer el barrido de 235 nm hasta 400 nm. En las figuras No. 26, 27, 28 y 29 se presentan el espectro del marcador Juanislamina con su respectiva longitud de

onda máxima y absorbancia (ver **Figura N°26**) así como los espectros de los tres extractos *n*-hexánicos de *C. urticifolia* obtenidos.

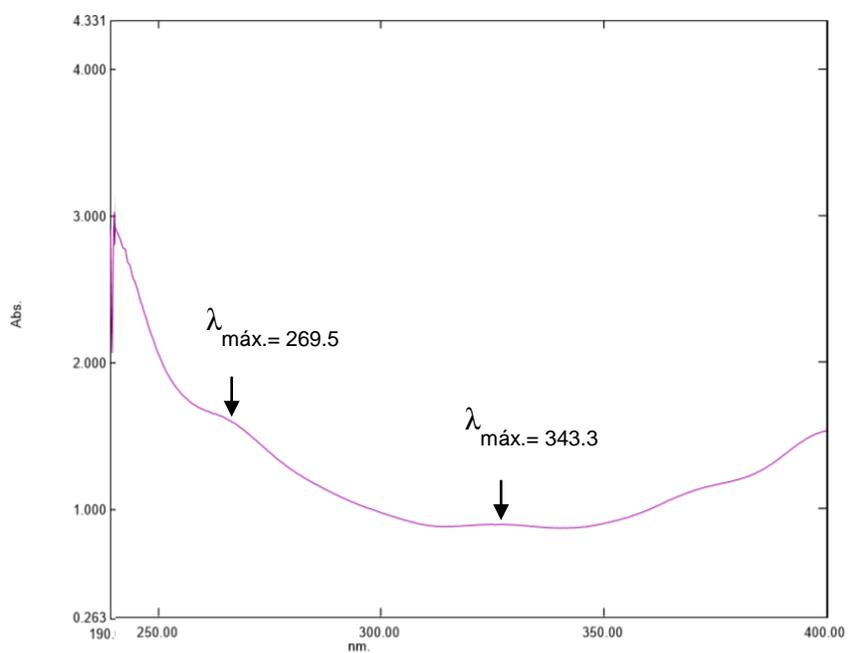


**Figura N°26.** Espectro del marcador Juanislamina

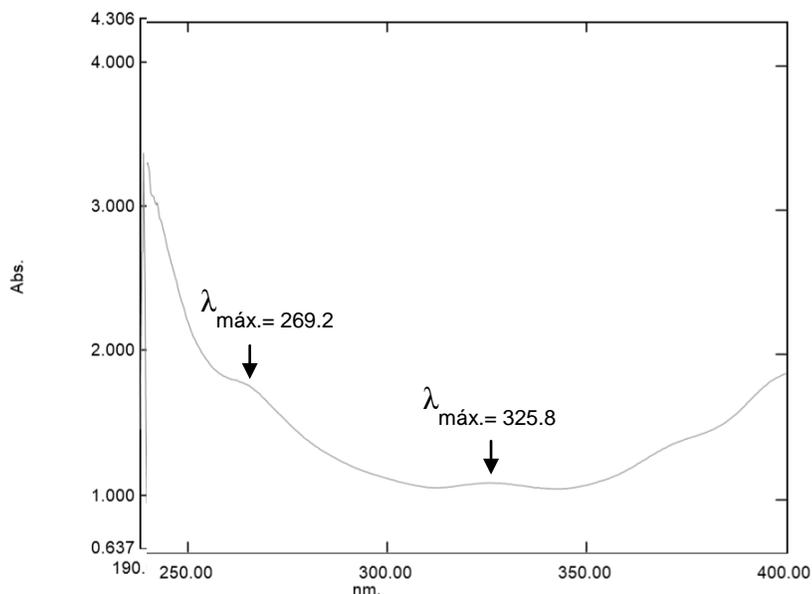
Las lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas no absorben por encima de los 200 nm, pero existen situaciones donde pueden verse afectadas por la presencia de dobles enlaces conjugados dentro de la estructura molecular, desplazando la longitud de onda a valores mayores. (11, 21)



**Figura N°27.** Espectro del extracto correspondiente a enero (E1)



**Figura N°28.** Espectro del extracto correspondiente a febrero (E2)



**Figura N°29.** Espectro del extracto correspondiente a marzo (E3)

Nótese que al observar las **figuras N°27, 28 y 29** los máximos de absorbancia se encuentran en longitudes de onda de 268.7, 269.2 y 269.5 nm valores muy similares al presentado por el marcador Juanislamina cuyo máximo de absorbancia se reportó a 268.5 nm, esto es totalmente razonable puesto que la Juanislamina es la sesquiterpenlactona más abundante en *C. urticifolia* y tiene mayor número de grupos cromóforos en su estructura.

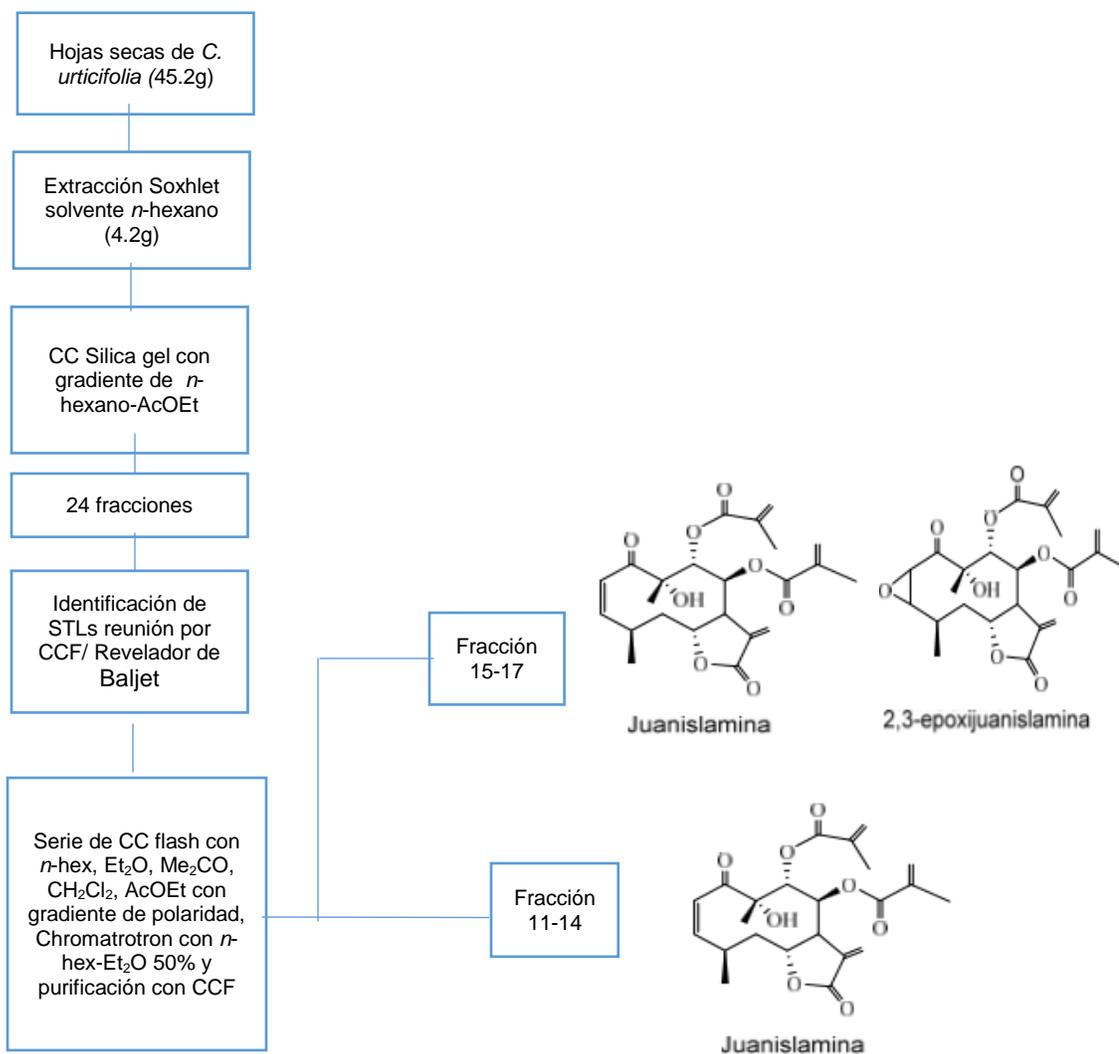
Todo lo anterior, unido con los resultados obtenidos en la cromatografía en capa fina evidencia la presencia de las sesquiterpenlactonas en los tres extractos *n*-hexánicos obtenidos de *C. urticifolia* durante los meses de enero, febrero y marzo, estos metabolitos son producidos por la planta posiblemente como un mecanismo de defensa de la especie vegetal frente a herbívoros, microorganismos y en la competencia con otras especies vegetales. (16, 66)

## 5.6 ESPECTROSCOPIA POR RMN $^1\text{H}$

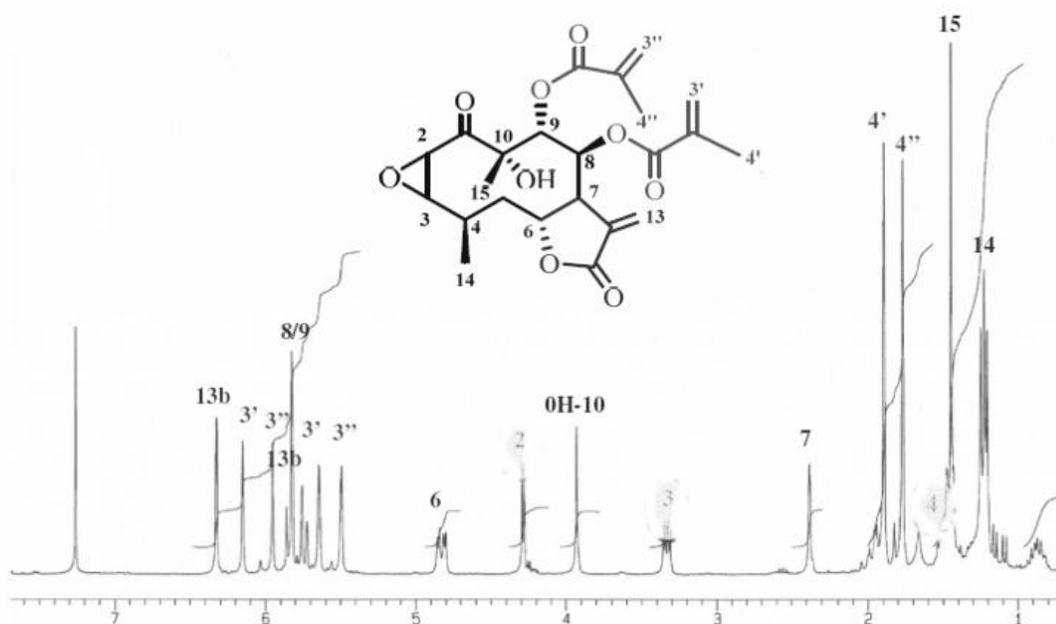
La **Figura N°30** representa el proceso de extracción, fraccionamiento y aislamiento del extracto *n*-hexánico de *C. urticifolia* por Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN  $^1\text{H}$ ), a través de un Proyecto de Cooperación Interuniversitaria con la Universidad de La Laguna, España 2013 <sup>(55)</sup> por el Doctor Marvin Núñez.

En este proyecto se logró a aislar las dos sesquiterpenlactonas más abundantes presentes en el extracto *n*-hexánico, Juanislamina y 2,3-Epoxijuanislamina. (Ver **Figuras N°31** y **N°32**)

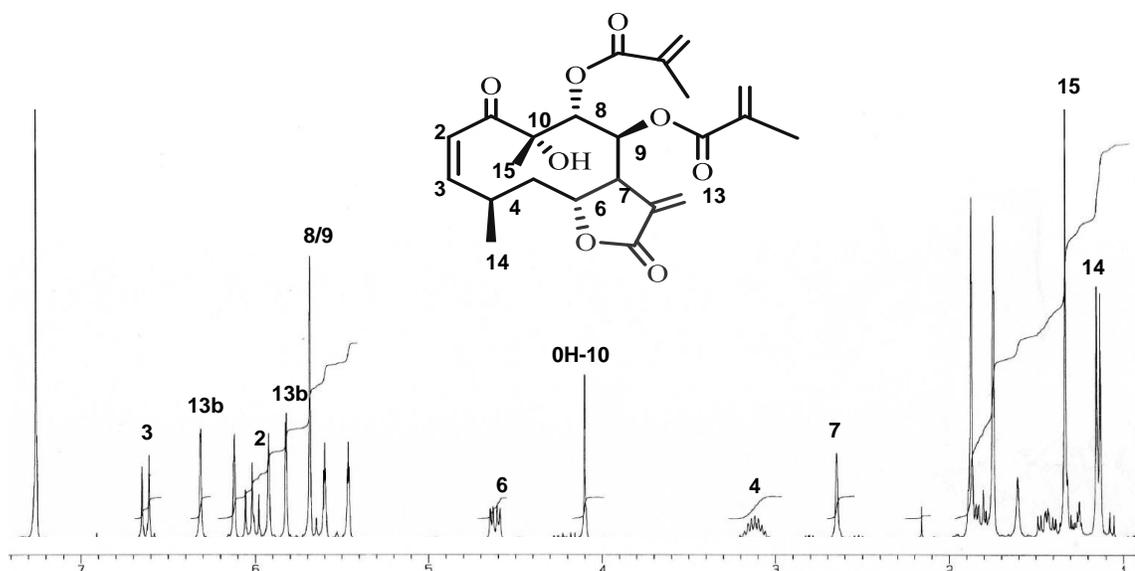
El objetivo de mostrar el aislamiento de Juanislamina y 2,3-Epoxijuanislamina es para proporcionar fidedignamente la seguridad que dichos compuestos o metabolitos secundarios fueron aislados y caracterizados por técnicas espectroscópicas y espectrométricas.



**Figura N°30.** Esquema de fraccionamiento y elución del extracto del extracto *n*-hexánico de las hojas de *C. urticifolia* con las sesquiterpenolactonas más abundantes del mismo



**Figura N°31.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la 2,3-Epoxyuanislamina RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$ : 6.34 (d,  $J = 1$  Hz, H-13b), 6.16 (dc,  $J_{ae} = 1.5$  Hz,  $J_{aa} = 1.5$  Hz, H-3'), 5.96 (dc,  $J_{ae} = 1.5$  Hz,  $J_{aa} = 1.5$  Hz, H-3''), 5.83 (s, H-8), 5.83 (s, H-9), 5.78 (d,  $J = 1$  Hz, H-13a), 5.65 (dc,  $J_{ae} = 1.5$  Hz,  $J_{aa} = 1.5$  Hz, H-3'), 5.5 (dc,  $J_{ae} = 1.5$  Hz,  $J_{aa} = 1.5$  Hz, H-3''), 4.82 (dd,  $J_{ae} = 4.0$  Hz,  $J_{aa} = 12.0$  Hz, H-6), 4.3 (d,  $J = 4$  Hz, H-2), 3.96 (s, H-10), 3.35 (d,  $J_{ae} = 4.0$  Hz,  $J_{aa} = 8.5$  Hz, H-3), 2.39 (s, H-7), 1.9 (3H, dd,  $J_{ae} = 1.5$  Hz,  $J_{aa} = 1.5$  Hz, H-4'), 1.78 (3H, dd,  $J_{ae} = 1.5$  Hz,  $J_{aa} = 1.5$  Hz, H-4''), 1.53 (s, H-4), 1.25 (3H, s, H-15), 1.16 (3H, d,  $J = 6$  Hz, H-14).



**Figura N°32.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la Juanislamina (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 6.64 (d, H-1), 6.50 (dd, H-1), 6.31 (d, H), 6.13 (s, H), 5.94 (s, H-1), 5.82 (d, H), 5.69 (1H), 5.69 (1H), 5.61 (1H), 5.48 (1H), 4.62 (dd, H-1), 4.10 (s, H-1), 3.13 (m, H-1), 2.648 (s, H-1), 1.88 (s, H-1), 1.80 (m, H-1), 1.76 (d, H-3), 1.38 (m, H-1), 1.33 (s, H-3), 1.14 (d, H-3).

### 5.7 CANTIDAD DE SESQUITERPENLACTONAS TOTALES EXPRESADAS COMO mg DE JUANISLAMINA PRESENTES EN LAS ALÍCUOTAS USADAS PARA LAS LECTURAS EN ESPECTROSCOPIA VISIBLE <sup>(13)</sup>

- Marcador analítico: Juanislamina
- Blanco: mezcla de 5.0 mL de etanol para análisis y 3.0 mL de solución alcalina de picrato de sodio.
- Concentración del marcador analítico: 1.5 mg/mL.
- Absorbancia del marcador analítico: 0.491
- Longitud de onda: 495 nm

En la **Tabla N°10** se presentan las absorbancias obtenidas para cada alícuota en las cinco repeticiones llevadas a cabo con los extractos. También se presentan los pesos utilizados para realizar las soluciones de cada una de las muestras leídas y su respectivo factor de dilución.

**Tabla N°10.** Absorbancias, peso y factor de dilución en las alícuotas de cada una de los extractos de *C. urticifolia* con 5 réplicas cada uno

Código de muestra	Replica	Factor de dilución	Peso muestra (g)	Absorbancia
E1	1	4	0.0098	<b>0.645</b>
	2		0.0101	0.510
	3		0.01	0.540
	4		0.0106	0.598
	5		0.0096	0.540
E2	1	4	0.0111	0.895
	2		0.0108	0.816
	3		0.0105	0.871

**Tabla N°10.**Continuación

	4		0.0114	<b>0.918</b>
	5		0.0103	0.814
E3	1	4	0.011	0.625
	2		0.0101	0.723
	3		0.011	<b>0.945</b>
	4		0.0103	0.602
	5		0.0102	0.698

El factor de dilución es el mismo para cada una de las muestras, las absorbancias más altas están comprendidas en el extracto E2 correspondiente al mes de febrero, por el contrario las más bajas corresponden al extracto E1 del mes de enero, mientras que en el extracto E3 se obtuvieron valores de absorbancia comprendidos entre E1 y E2; a excepción de la réplica 3 que mostró el valor más alto de todas las absorbancias con 0.945.

A continuación se presenta un ejemplo del cálculo de la obtención de la cantidad de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina, en las alícuotas de la muestra colectada el mes de enero (E1), utilizando la siguiente fórmula:

$$C_{mx} = \frac{(C_{marc.})(A_{mx})}{A_{marc.}} \times FD$$

Como se mencionó en la cascada de dilución de las muestras (**Figura N°21**) debido a que la investigación es fitoquímica y la metodología ya ha habido sido

utilizada en dos investigaciones anteriores, y se siguen las marchas estandarizadas para este tipo de investigaciones, el factor de dilución es 4.

$$C_m = \frac{(1.5 \text{ mg/mL})(0.645)}{0.491} \times 4 = 7.88 \text{ mg/mL}$$

$$C_m = \frac{(1.5 \text{ mg/mL})(0.510)}{0.491} \times 4 = 6.24 \text{ mg/mL}$$

$$C_m = \frac{(1.5 \text{ mg/mL})(0.540)}{0.491} \times 4 = 6.60 \text{ mg/mL}$$

$$C_m = \frac{(1.5 \text{ mg/mL})(0.598)}{0.491} \times 4 = 7.32 \text{ mg/mL}$$

$$C_m = \frac{(1.5 \text{ mg/mL})(0.540)}{0.491} \times 4 = 6.60 \text{ mg/mL}$$

Se calculó la cantidad de sesquiterpenlactonas totales presentes en cada una de las 3 muestras por quintuplicado.

La **tabla N°11** muestra el contenido de las STLs totales presentes en las alícuotas de los tres extractos calculados de la misma forma que el ejemplo anterior. El contenido más alto se encontró en el mes de febrero codificado como E2, con una media de 10.524 y el más bajo fue E1 correspondiente al mes de enero con una media de tan solo 6.090.

**Tabla N°11.** Contenido de las sesquiterpenlactonas totales presentes en las alícuotas expresadas como mg de Juanislamina, promedios, desviaciones estándar, e intervalo de confianza 95%.

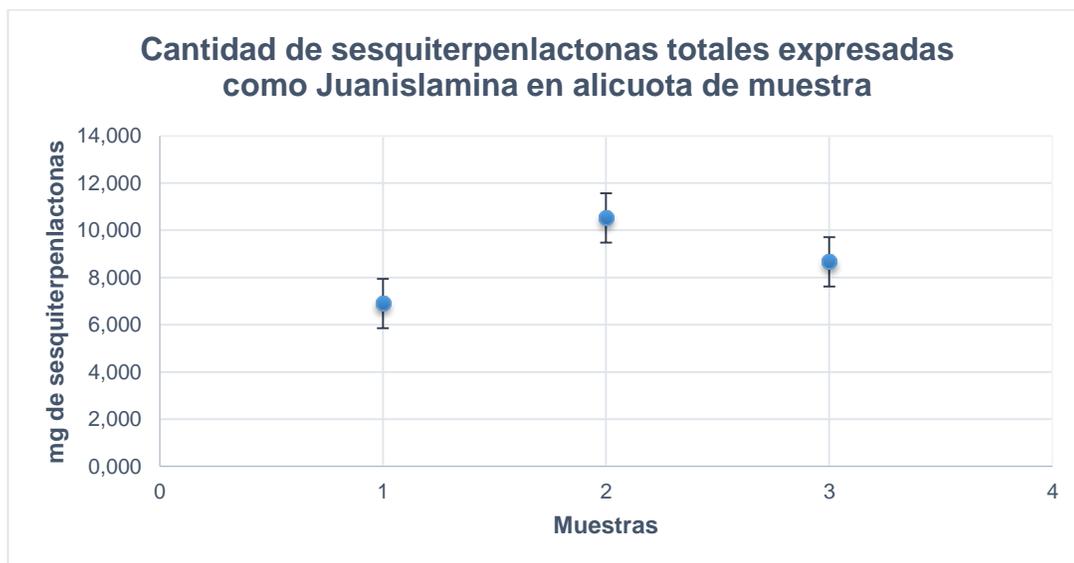
Replica	Muestras		
	E1	E2	E3
1	7.88	10.92	7.64
2	6.24	9.96	8.84
3	6.60	10.64	11.56
4	7.32	11.20	7.36
5	6.60	9.96	8.52
Media (mg)	6.090	10.524	8.669
DEV STD	0.661	0.562	1.667
IC 95%	0.020	0.017	0.050

n (número de repeticiones): 5

95% IC = Intervalo de confianza al 95%

DEV STD = Desviación estándar

La representación gráfica de los datos contenidos en la **Tabla N°7** se observa en la **Figura N°33** donde se muestran los mg de sesquiterpenlactonas totales expresados como Juanislamina para cada alícuota y se observan valores muy similares entre las alícuotas de las muestras siendo el extracto 2 (E2) perteneciente al mes de febrero la que posee el valor más elevado con promedio de 10.524 mg de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina.



**Figura N°33.** Cantidad de sesquiterpenlactonas totales expresadas en mg de Juanislamina presentes en cada alícuota de muestra

#### - CANTIDAD DE SESQUITERPENLACTONAS (STLs) EN EXTRACTO *n*-HEXÁNICO SECO

Antes de calcular los porcentajes de sesquiterpenlactonas, se calculó su cantidad en gramos que están presentes en el extracto *n*-hexánico seco para luego establecer las relaciones respectivas.

A continuación se presenta un ejemplo del cálculo de la cantidad de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina, en el extracto *n*-hexánico de la muestra de la colecta del mes de enero donde se utilizaron las fórmulas siguientes:

$$\text{Sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto } n\text{-hexánico seco} = \frac{\left( \text{Cantidad de STLs totales en alícuota de la muestra} \right) \left( \text{Peso extracto seco (g)} \right)}{\text{Peso mx (g)}}$$

$$\begin{aligned} &\text{Sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto } n\text{-hexánico seco} \\ &= \frac{(7.88 \text{ mg})(9.5\text{g})}{9.8\text{mg}} = 7.64\text{g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &\text{Sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto } n\text{-hexánico seco} \\ &= \frac{(6.24 \text{ mg})(9.5\text{g})}{10.1\text{mg}} = 5.87\text{g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &\text{Sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto } n\text{-hexánico seco} \\ &= \frac{(6.60 \text{ mg})(9.5\text{g})}{10.0\text{mg}} = 6.27\text{g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &\text{Sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto } n\text{-hexánico seco} \\ &= \frac{(7.32 \text{ mg})(9.5\text{g})}{10.6\text{mg}} = 6.56\text{g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &\text{Sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto } n\text{-hexánico seco} \\ &= \frac{(6.60 \text{ mg})(9.5\text{g})}{9.60\text{mg}} = 6.53\text{g} \end{aligned}$$

Mediante la fórmula anterior se obtuvieron los gramos de STLs que están presentes en el extracto *n*-hexánico seco en cada alícuota utilizada para las lecturas en espectroscopia visible, esto para continuar con el cálculo del porcentaje.

En la **tabla N°12** se muestra la cantidad en gramos de STLs totales expresadas como Juanislamina presentes en los tres extractos *n*-hexánicos secos, a pesar que se observan valores muy similares, la cantidad más alta la presentó el extracto recolectado en el mes correspondiente a febrero (E2).

**Tabla N°12.** Cantidad de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto *n*-hexánico seco, promedios,

Replica	Muestras		
	E1	E2	E3
1	7.64	9.64	6.53
2	5.87	9.04	8.23
3	6.27	9.93	9.88
4	6.56	9.63	6.72
5	6.53	9.48	8.30
Media (mg)	6.55	9.54	7.84
DEV STD	0.66	0.33	1.37
IC 95%	0.02	0.01	0.04

desviaciones estándar, e intervalo de confianza 95%.

n (número de repeticiones): 5

95% IC = Intervalo de confianza al 95%

DEV STD = Desviación estándar

## PORCENTAJE DE SESQUITERPENLACTONAS (STLs) EXPRESADAS COMO JUANISLAMINA PRESENTES EN EXTRACTO *n*-HEXÁNICO SECO

Se calculó la cantidad de sesquiterpenlactonas totales presentes en cada una de las 3 muestras por quintuplicado y posteriormente su porcentaje en el extracto *n*-hexánico.

$$\% \text{ de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto } n\text{-hexánico seco} = \frac{\text{Peso de sesquiterpenlactonas en la mx expresadas como Juanislamina (g)}}{\text{Peso del extracto } n\text{-hexánico seco (g)}} \times 100$$

A continuación se presenta un ejemplo del cálculo de la obtención de la cantidad de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina, en las alícuotas de la muestra colectada el mes de enero.

$$\% \text{ de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto } n\text{-hexánico seco} = \frac{0.764\text{g}}{9.5\text{g}} \times 100 = 8.04\%$$

$$\% \text{ de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto } n\text{-hexánico seco} = \frac{0.587\text{g}}{9.5\text{g}} \times 100 = 6.18\%$$

$$\% \text{ de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto } n\text{-hexánico seco} = \frac{0.627\text{g}}{9.5\text{g}} \times 100 = 6.60\%$$

$$\% \text{ de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto } n\text{-hexánico seco} = \frac{0.656\text{g}}{9.5\text{g}} \times 100 = 6.90\%$$

$$\begin{array}{l} \text{\% de sesquiterpenlactonas totales} \\ \text{expresadas como Juanislamina en} \\ \text{el extracto } n\text{-hexánico seco} \end{array} = \frac{0.653\text{g}}{9.5\text{g}} \times 100 = 6.87\%$$

En la **tabla N°13** se muestra en resumen los porcentajes de STLs expresadas como Juanislamina por ser el metabolito mayoritario presente en el extracto *n*-hexánico de *C.urticifolia*. El porcentaje más alto está comprendido en la muestra recolectada en el mes de febrero (E2) con un valor de 97.33%, seguido por el mes de marzo (E3) y el valor más bajo es el mes de enero (E1).

**Tabla N°13.** Porcentaje de sesquiterpenlactonas expresadas como Juanislamina presente en el extracto *n*-hexánico seco, promedios, desviaciones estándar, e intervalo de confianza 95%.

Replica	Muestras		
	E1	E2	E3
1	80.41	98.38	69.46
2	61.78	92.22	87.52
3	66	101.33	105.1
4	69.06	98.25	71.46
5	68.75	96.7	83.53

**Tabla N°13.** Continuación

Media (%)	68.935	<b>97.330</b>	82.465
DEV STD	6.913	3.333	14.359
IC 95%	0.206	0.099	0.428

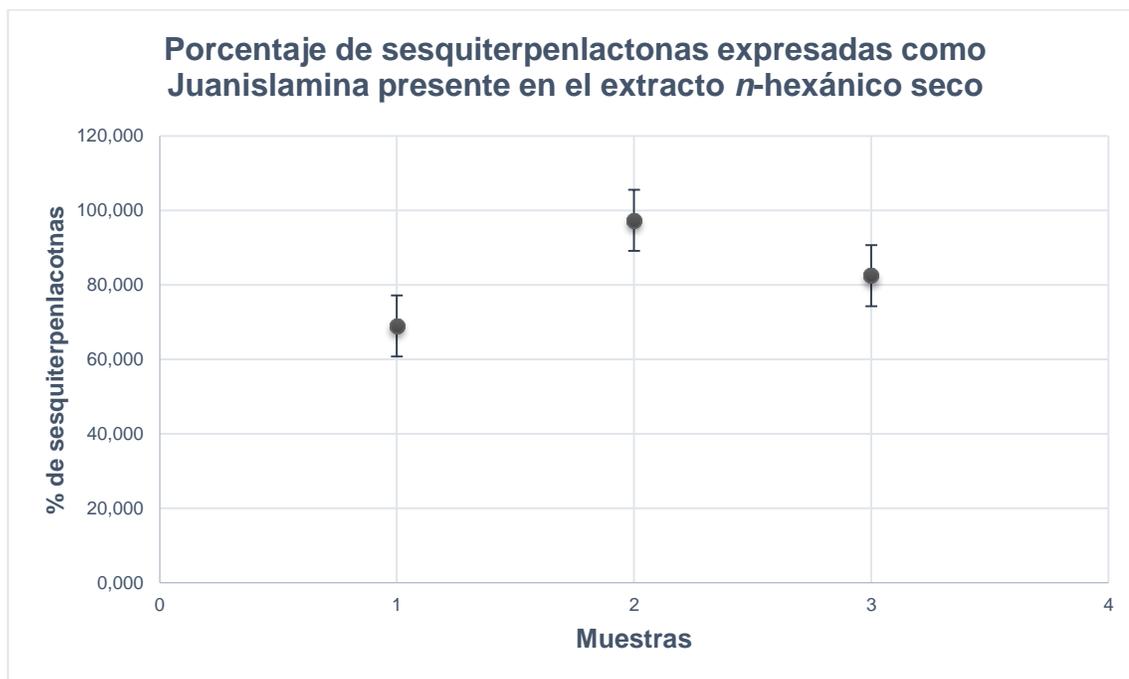
n (número de repeticiones): 5

95% IC = Intervalo de confianza al 95%

DEV STD = Desviación estándar

La **figura N°34** es la representación gráfica de los valores expresados en la tabla N°9. Los mayores porcentajes de STLs son los correspondientes a febrero y marzo, con mayor porcentaje en el mes de febrero donde se notó un significativo incremento.

Al traslapar los intervalos de las muestras indica que entre la concentración encontrada en el mes de febrero y marzo no hay diferencia significativa pero que entre el mes de enero y febrero si existe una diferencia significativa por tanto el mayor contenido de STLs se obtiene en febrero. Sin embargo, estadísticamente es similar recolectar en febrero que en marzo.



**Figura N°34.** Porcentaje de STLs totales en cada una de las tres colectas.

## 5.8 ENSAYO DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA POR ADMINISTRACIÓN CONTINUA (90 DÍAS) POR VÍA ORAL

La preparación de las soluciones a administrar a los animales del estudio, se demoraron alrededor de 23 horas en cada preparación, por la naturaleza del extracto se presentaron dificultades para solubilizarlo en agua, para lo cual agregamos tres gotas de Tween 80 lo máximo permitido para no causar efectos digestivos a los animales de experimentación.<sup>(7)</sup>

A continuación se presenta un ejemplo de la fórmula general para determinar la cantidad de extracto seco para preparar las soluciones a 150 mg/Kg de peso corporal del ratón para ser administrada a los animales en estudio. Nótese que la dosis de 150 mg/Kg es para 1,000 g de peso corporal, se necesita realizar el cálculo para el peso promedio que presentan los animales en estudio semanalmente para la preparación de las soluciones.

El peso corporal es un parámetro que varía en cada animal según avanza el estudio, por no ser un valor constante, se debe calcular la cantidad de extracto seco para preparar soluciones de 10 mL de 150 mg/Kg de peso.

Peso promedio de los 30 machos: 24.59 g

150 mg de extracto seco \_\_\_\_\_ 1,000 g de peso

X \_\_\_\_\_ 24.59 g de peso promedio

X= 3.6885 mg = 3.69 mg de extracto seco

3.69 mg de extracto seco \_\_\_\_\_ 0.1 mL de solución

X \_\_\_\_\_ 10.0 mL de solución

X= 184.5 mg de extracto seco para 10.0 mL de solución

Durante el ensayo subcrónico (Ver **Figura N°35**) no se observó mortalidad en ninguno de los grupos controles de ambos sexos. En los grupos centinela y tratamiento de ambos sexos, solamente se sacrificó un miembro del grupo centinela a la tercera semana de estudio por el deterioro serio en su estado de salud ya que presentaba un encorvamiento notorio al momento de desplazarse, una reacción casi nula a estímulos, una piloerección pronunciada y una inflamación en la parte abdominal que permitía que el diafragma se elevara provocando dificultad para respirar, siendo muy evidente en la necropsia, la dilatación de las asas intestinales por acumulo de gases, que muy bien puede estar relacionado con la naturaleza irritante de las STLs sobre la mucosa intestinal.

Se ha reportado en diferentes estudios que las STLs poseen una naturaleza irritante de las mucosas y en especial las pertenecientes a la familia Asteraceae tienen una actividad gastro irritante. <sup>(2, 44)</sup>Ejemplos de ellas tenemos:

Vernolepina, STL aislada de *Vernonia amygdalina*, un miembro de la Familia Asteraceae, <sup>(2, 44)</sup>que fue administrada en un estudio a conejillos de indias, la presentó efectos potenciadores e inhibitorios sobre la contractilidad del músculo liso intestinal. <sup>(2, 44)</sup>

La Helenalina, STL responsable de la actividad biológica del Árnica, se administró a ratones de la cepa BDF y fue la causante de generar obstrucción intestinal, además de otros efectos tóxicos.

Algunas sesquiterpenlactonas y compuestos relacionados han sido probados para determinar la actividad antiinflamatoria sobre roedores en donde el grupo  $\alpha$ -metilen  $\gamma$ -lactona presente en las sesquiterpenlactonas mostró ser indispensable para inhibir la actividad antiinflamatoria, además existen estudios de actividad antiinflamatoria realizados en sesquiterpenlactonas aisladas en *Magnolia grandiflora* y *Smallanthus uvedalius*, donde utilizaron como animales de estudio ratas con carragenina, en los que se concluye que estos compuestos se pueden utilizar como agentes antiinflamatorios. Sin embargo los fármacos antiinflamatorios pueden presentar en algunas ocasiones, graves efectos tóxicos gastrointestinales, que pueden aparecer inmediatamente después de iniciado el tratamiento o en general después de algún tiempo (semanas – meses). <sup>(31)</sup>

Si bien el macho sacrificado mostraba dilatación en las asas intestinales e inflamación, es posible que las STLs presentes en el extracto *n*-hexánico de *C. urticifolia*, al igual que las STLs: Vernolepina y Helenalina, fueran las causantes de la irritación a nivel gastrointestinal, tomando en consideración que son catalogadas con un efecto antiinflamatorio que entre sus efectos secundarios, puede ocasionar efectos tóxicos gastrointestinales.



**Figura N°35.** Administración del extracto *n*-hexánico con la cánula intragástrica

### **Observaciones Clínicas**

En los chequeos clínicos que se realizaron diariamente a los animales machos y hembras tratados con el extracto *n*-hexánico de las hojas de *Calea urticifolia*, se observaron a lo largo del estudio patrones anormales que no fueron observados en los grupos control de ambos sexos, y que podrían significar un patrón de toxicidad en los animales en estudio. Dichas observaciones se muestran en la **tabla N°14**.

**Tabla N°14** Resumen de los chequeos clínicos en los grupos control, tratamiento y centinela de ambos sexos observados durante los 90 días del estudio

<b>Sexo</b>	<b>Grupo</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Machos</b>	Control	No se observaron efectos negativos en los animales durante el estudio.
	Tratamiento	Piloerección, deshidratación, reacción lenta y casi nula a estímulos, pérdida del equilibrio, frecuencia respiratoria baja, desplazamiento lento, inflamación abdominal pronunciada.
	Centinela	Reacción lenta y casi nula a estímulos, pérdida del equilibrio, disminución de la frecuencia respiratoria. Desplazamiento encorvado lo que provocó el sacrificio de un animal, inflamación abdominal notoria, piloerección, deshidratación, pérdida del equilibrio, disminución de la frecuencia respiratoria.
<b>Hembras</b>	Control	No se observaron efectos negativos en los animales durante el estudio.
	Tratamiento	Deshidratación, pérdida del equilibrio, piloerección, reacción lenta y casi nula a estímulos, desplazamiento lento, frecuencia respiratoria baja, inflamación abdominal.
	Centinela	Inflamación abdominal, deshidratación, reacción lenta a estímulos, disminución de la frecuencia respiratoria, piloercción, desplazamiento lento.

## - PESO CORPORAL

Se registró el peso corporal semanalmente durante los 90 días, al cabo de los cuales se realizaron las necropsias y la observación macroscópica de órganos y tejidos fundamentales.

En cuanto al comportamiento del peso corporal de los animales y tal como puede observarse en las **Tablas N°15 y 16**, la disminución de peso de todos los grupos tratados con el extracto *n*-hexánico en comparación con su peso inicial es evidente y más aún cuando se comparan los valores de aumento porcentual de peso entre estos grupos y los grupos controles, donde se reportan valores negativos para los grupos tratados con el extracto *n*-hexánico. La pérdida de peso corporal, puede explicarse por una disminución de la ingesta de alimento a causa del malestar abdominal observado en los animales tratados con la sustancia de estudio. Por otro lado, esta disminución del peso de los animales, puede muy bien ser consecuencia de la movilización de reservas energéticas del individuo para enfrentar la actividad metabólica incrementada que acompaña los procesos de desintoxicación <sup>(9)</sup> lo que sin lugar a dudas demuestra el posible daño tóxico de esta especie vegetal. Esta toxicidad es aún más evidente cuando en la misma tabla se observa la recuperación en aproximadamente 11 puntos porcentuales del peso de los animales machos del grupo centinela luego de 30 días de observación sin tratamiento alguno; lo que demuestra la reversibilidad de los efectos tóxicos de la administración continua por 90 días de la sustancia en estudio. Es de mucha importancia mencionar que en hembras centinela, luego del periodo de reposo sin tratamiento, si bien se observa una leve recuperación, el grupo no alcanzó valores positivos respecto del peso inicial, lo que indica una mayor susceptibilidad de las hembras a los posibles efectos tóxicos de la sustancia evaluada.

Los machos son más susceptibles a las toxinas renales, y las hembras a las toxinas hepáticas. <sup>(36)</sup>Las causas de estas diferencias de respuesta entre machos y hembras se han relacionado con sus diferencias en una gran variedad de procesos fisiológicos (por ejemplo, las hembras pueden excretar una mayor cantidad de algunas sustancias tóxicas en las hemorragias menstruales y en la leche transfiriéndolas al feto, pero sin embargo experimentan una tensión adicional durante el embarazo, el parto y la lactancia), actividades enzimáticas, mecanismos de reparación genética y factores hormonales, así como con la presencia de depósitos de grasa relativamente mayores en las hembras, lo que produce una mayor acumulación de algunos tóxicos lipófilos, como los disolventes orgánicos y algunos fármacos. <sup>(34)</sup>Si bien las STLs que son consideradas de mediana polaridad, se caracterizan por ser lipofílicas, existe la posibilidad que se hayan acumulado en los depósitos de grasa que relativamente son mayores en hembras tratadas que en machos tratados con el extracto *n*-hexánico de *C. urticifolia*.

**Tabla N°15.** Variación de los valores promedios de peso corporal (g) de grupos hembra experimentales a lo largo del ensayo y el grado de significancia (Sig. Bilateral) de los grupos tratamiento y centinela con respecto al aumento porcentual de peso corporal correlacionado con los grupos controles.

	Grupo	Peso inicial		Peso final		Aumento %	Sig. Bilateral
		Media	Des. E.	Media	Des. E.		
Hembras	Control	23.3	± 0.25	25.2	± 0.63	8.15%	0.001*
	Tratamiento	23.02	± 0.55	21.74	± 0.36	-5.56%	
	Centinela	22.4	± 0.36	21.14	± 0.88	-5.63%	
	*Centinela	22.4	± 0.36	22.32	± 0.61	-0.36%	

\*valores de grupo centinela después de las 4 semanas de observación post estudio

**Tabla N°16.** Variación de los valores promedios de peso corporal (g) de grupos machos experimentales a lo largo del ensayo y el grado de significancia (Sig. Bilateral) de los grupos tratamiento y centinela con respecto al aumento porcentual de peso corporal

	Grupo	Peso inicial		Peso final		Aumento %	Sig. Bilateral
		Media	Desv. E.	Media	Desv. E.		
Machos	Control	23.36 ±	0.59	30.78 ±	1.25	31.76%	0.001*
	Tratamiento	26.23 ±	0.32	25.50 ±	0.40	-2.78%	
	Centinela	25.86 ±	0.65	23.76 ±	0.32	-8.12%	
	*Centinela	25.86 ±	0.65	26.74 ±	0.50	3.40%	

correlacionado con los grupos controles.

\*valores de grupo centinela después de las 4 semanas de observación post estudio

## - PRUEBAS BIOQUÍMICAS

En la **Tabla N°17** puede observarse los valores de significancia calculados, en los cuales no se observan diferencias significativas entre los valores promedios de los grupos tratamiento y centinela comparados con los grupos control en ambos sexos. Nótese que los valores promedios de cada parámetro bioquímico de los ratones experimentales son muy afines estadísticamente a los de los ratones control, a excepción de una disminución estadísticamente significativa de los valores observados para creatinina en grupos centinela de ambos sexos.

Del mismo modo, puede observarse una disminución del valor promedio de TGO en el grupo machos centinela comparados con los valores promedio de los grupos control.

La disminución de estos parámetros bioquímicos en sangre, podrían estar fuertemente relacionados con la disminución del peso corporal y por consiguiente con una disminución de la masa muscular de estos animales.

La concentración de creatinina en especial, es directamente proporcional a la masa y la actividad muscular. Una disminución de la masa muscular, causada por una caída del peso corporal, podría explicar valores bajos de creatinina.

En este sentido, esta caída en valores de creatinina no debe ser considerada como consecuencia de daño a hígado o riñón, puesto que de existir un daño renal o hepático, los valores de TGO y TGP deben verse incrementados al igual que la creatinina, pues los valores se vieron disminuidos.

Lo anterior explica los valores bajos de creatinina en hembras en tanto estas continuaron con una caída del peso corporal luego de los 30 días de recuperación, pero no explica la baja en la creatinina en el grupo centinela macho, puesto que estos experimentaron una recuperación de su peso corporal y por lo tanto un aumento de la masa muscular, lo que tuvo que haber potenciado la recuperación de estos valores.

**Tabla N° 17.** Valores de significancia de la diferencia entre los grupos tratamiento y centinela respecto a los grupos control, calculados a partir de los valores promedio de parámetros bioquímicos

Parámetro	Grupo	HEMBRAS		MACHOS	
		Media $\pm$ Desv. E	Sig. Bilateral	Media $\pm$ Desv. E	Sig. Bilateral
Ácido Úrico	Control	1.53 $\pm$ 0.42	0.067 0.542	1.56 $\pm$ 0.14	0.132 0.353
	Tratamiento	0.97 $\pm$ 0.16		1.14 $\pm$ 0.30	
	Centinela	1.83 $\pm$ 0.87		1.56 $\pm$ 0.13	
Nitrógeno	Control	16.00 $\pm$ 1.41	0.124 0.387	21.75 $\pm$ 0.50	0.300 0.714
	Tratamiento	18.75 $\pm$ 1.71		21.00 $\pm$ 1.41	
	Centinela	17.75 $\pm$ 2.06		22.67 $\pm$ 2.08	
Bilirrubina total	Control	0.12 $\pm$ 0.02	0.544 0.139	0.15 $\pm$ 0.01	0.410 0.409
	Tratamiento	0.13 $\pm$ 0.02		0.12 $\pm$ 0.03	
	Centinela	0.14 $\pm$ 0.01		0.19 $\pm$ 0.10	
Glucosa	Control	210.50 $\pm$ 25.68	0.350 0.900	176.50 $\pm$ 16.76	0.202 0.423
	Tratamiento	192.70 $\pm$ 4.35		155.25 $\pm$ 22.37	
	Centinela	209.70 $\pm$ 20.12		197.67 $\pm$ 36.75	
Creatinina	Control	0.21 $\pm$ 0.01	0.025* 0.054*	0.15 $\pm$ 0.03	0.090 0.049
	Tratamiento	0.20 $\pm$ 0.01		0.13 $\pm$ 0.01	
	Centinela	0.15 $\pm$ 0.22		0.13 $\pm$ 0.02	
TGO	Control	99.75 $\pm$ 21.17	0.029* 0.056	125.00 $\pm$ 48.08	0.143 0.825
	Tratamiento	72.00 $\pm$ 4.90		84.50 $\pm$ 11.73	
	Centinela	84.75 $\pm$ 20.92		122.33 $\pm$ 94.21	
TGP	Control	83.50 $\pm$ 21.17	0.410 0.096	72.75 $\pm$ 34.87	0.654 0.683
	Tratamiento	44.75 $\pm$ 2.50		55.75 $\pm$ 5.91	
	Centinela	57.00 $\pm$ 44.74		147.33 $\pm$ 198.97	
Colesterol	Control	118.50 $\pm$ 3.70	0.146 0.700	126.00 $\pm$ 8.12	0.875 0.543
	Tratamiento	108.00 $\pm$ 6.68		128.00 $\pm$ 12.03	
	Centinela	106.50 $\pm$ 72.46		136.33 $\pm$ 22.48	

Los valores se expresan con la media  $\pm$  desviación estándar (Desv. E) y la significancia de la diferencia, entre los grupos tratamiento y centinela respecto a sus controles cuando \*P < 0.05.

## - PRUEBAS HEMATOLOGICAS

Los exámenes hematológicos son indicadores del alcance y profundidad de los efectos adversos de una sustancia, en ese sentido, además los resultados pueden correlacionarse con los posibles daños sobre un órgano específico.

Tal como puede verse en la **tabla N°18**, existe una caída estadísticamente significativa de glóbulos rojos, hemoglobina y linfocitos en grupos tratados con el extracto *n*-hexánico. Caso contrario, ocurre con los valores de plaquetas y neutrófilos, los cuales sufren un incremento en sus valores promedio en grupos tratados con la sustancia de estudio. Todas estas diferencias estadísticas entre algunos parámetros de grupos controles y tratamiento fueron observados únicamente en grupos hembra, lo que nuevamente nos indica una mayor susceptibilidad a los efectos del extracto *n*-hexánico por parte de hembras. Los valores bajos de glóbulos rojos y hemoglobina en grupos hembra tratadas con la sustancia de estudio, podrían estar relacionados con la pérdida de peso corporal, causado por daños en el tracto gastrointestinal evidenciado por malestares abdominales observados durante los chequeos clínicos, observación que concuerda con lo reportado en otros estudios como consecuencia de la exposición de animales a plantas con sesquiterpenlactonas, tales como la Vernolepina y Helenalina que han mostrado toxicidad a nivel gástrico. Un daño en el tracto gastrointestinal, explicaría la pérdida de peso corporal por una mala absorción de nutrientes que a su vez tendrá un efecto directo sobre la producción de hemoglobina y glóbulos rojos. El aumento de plaquetas en el grupo hembras centinela posiblemente sea por la baja de glóbulos rojos y hemoglobina que fue notorio en las pruebas hematológicas. La causa más frecuente de un incremento de plaquetas es debida a la presencia de una infección ya sea bacteriana o viral, recordemos que la flora intestinal de todo individuo posee bacterias anaerobias que al haber una acumulación de estas (infección bacteriana) provoca una excesiva producción de gases, acumulación semejante como la encontrada después de realizadas las

necropsias de los animales tratados, que no fue encontrada en los animales control.

**Tabla Nº 18.** Valores de significancia de la diferencia entre los grupos tratamiento y centinela respecto a los grupos control, calculados a partir de los valores promedio de cada parámetro hematológico

Parámetro	Grupo	HEMBRAS		MACHOS	
		Media $\pm$ Desv. E	Sig. Bilateral	Media $\pm$ Desv. E	Sig. Bilateral
Glóbulos rojos	Control	9.75 $\pm$ 0.12	0.017*	10.29 $\pm$ 0.49	0.376
	Tratamiento	9.12 $\pm$ 0.28		9.71 $\pm$ 0.92	
	Centinela	8.94 $\pm$ 0.22		9.74 $\pm$ 0.24	
Glóbulos blancos	Control	8.15 $\pm$ 0.70	0.543	9.18 $\pm$ 2.30	0.273
	Tratamiento	7.48 $\pm$ 1.33		11.40 $\pm$ 2.59	
	Centinela	9.90 $\pm$ 2.82		11.20 $\pm$ 3.84	
Hemoglobina	Control	15.40 $\pm$ 0.32	0.005*	16.10 $\pm$ 0.63	0.275
	Tratamiento	14.23 $\pm$ 0.26		15.13 $\pm$ 1.07	
	Centinela	14.23 $\pm$ 0.36		15.83 $\pm$ 0.49	
Hematocrito	Control	45.48 $\pm$ 0.68	0.011*	46.68 $\pm$ 1.56	0.277
	Tratamiento	44.03 $\pm$ 0.71		45.00 $\pm$ 2.47	
	Centinela	41.15 $\pm$ 1.56		43.87 $\pm$ 0.45	
Plaquetas	Control	1292.00 $\pm$ 199.69	0.012*	1470.50 $\pm$ 169.68	0.312
	Tratamiento	1376.50 $\pm$ 135.74		1562.30 $\pm$ 158.84	
	Centinela	1587.25 $\pm$ 195.87		1565.67 $\pm$ 268.33	
Neutrófilo	Control	9.43 $\pm$ 4.10	0.132	17.20 $\pm$ 5.37	0.427
	Tratamiento	18.13 $\pm$ 3.84		20.90 $\pm$ 7.33	
	Centinela	9.57 $\pm$ 0.90		10.23 $\pm$ 3.01	
Linfocitos	Control	89.73 $\pm$ 3.56	0.089	82.45 $\pm$ 5.16	0.288
	Tratamiento	80.88 $\pm$ 3.57		78.90 $\pm$ 7.21	
	Centinela	90.23 $\pm$ 0.81		89.30 $\pm$ 3.03	

Los valores se expresan con la media  $\pm$  desviación estándar (Desv. E) y la significancia de la diferencia, entre los grupos tratamiento y centinela respecto a sus controles cuando \*P < 0.05.

### - EXAMEN MACROSCOPICO DE LOS ORGANOS

Se sacrificaron todos los animales para el examen de los órganos internos, para observar si existía algún daño observable a simple vista. No se reportaron alteraciones macroscópicas observables en cuanto a superficie, color, consistencia y tamaño de los órganos de los grupos tratamiento, estos datos fueron similares a los obtenidos de los grupos control. A excepción del macho centinela sacrificado a la tercera semana quien mostro dilatación en las asas intestinales e inflamación observables a simple vista, como se muestra en la **figura N°36**.



**Figura N°36.** Dilatación de las asas intestinales observadas en el macho centinela sacrificado durante el examen macroscópico de órganos

Como muestra la Tabla N°19, en la comparación del peso de los órganos de los animales tratados, no se reportan diferencias significativas del peso de órganos entre los grupos tratados y los controles de ambos sexos. Con estos resultados de la observación visual macroscópica de los órganos no se pudieron obtener

conclusiones, para ello se tiene que realizar la observación microscópica a nivel celular de los órganos para estudiar los resultados y poder concluir esta parte.

**Tabla N°19.** Valores promedio de peso de órganos en gramos de los grupos control, tratamiento y centinela con el grado de significación con un intervalo de confianza de 95%

Órgano	Grupo	MACHOS		HEMBRAS	
		Media ± Desv. E	Sig. Bilateral	Media ± Desv. E	Sig. Bilateral
Hígado	Control	1.60 ± 0.08	0.375 0.302	1.60 ± 0.08	0.130 0.141
	Tratamiento	1.54 ± 0.21		1.54 ± 0.21	
	Centinela	1.42 ± 0.39		1.33 ± 0.13	
Corazón	Control	0.15 ± 0.02	0.521 0.690	0.15 ± 0.10	0.702 0.658
	Tratamiento	0.16 ± 0.04		0.16 ± 0.04	
	Centinela	0.14 ± 0.03		0.14 ± 0.04	
Pulmones	Control	0.22 ± 0.03	0.679 0.764	0.22 ± 0.03	0.295 0.281
	Tratamiento	0.21 ± 0.03		0.21 ± 0.03	
	Centinela	0.17 ± 0.05		0.21 ± 0.02	
Bazo	Control	0.22 ± 0.09	0.075 0.093	0.22 ± 0.09	0.096 0.103
	Tratamiento	0.15 ± 0.10		0.15 ± 0.10	
	Centinela	0.22 ± 0.32		0.16 ± 0.02	
Riñón derecho	Control	0.27 ± 0.02	0.201 0.225	0.27 ± 0.02	0.628 0.604
	Tratamiento	0.27 ± 0.02		0.27 ± 0.02	
	Centinela	0.26 ± 0.03		0.18 ± 0.02	
Riñón izquierdo	Control	0.26 ± 0.02	0.117 0.110	0.26 ± 0.02	0.079 0.103
	Tratamiento	0.22 ± 0.22		0.22 ± 0.22	
	Centinela	0.24 ± 0.29		0.15 ± 0.02	
Estómago	Control	1.05 ± 0.36	0.070 0.077	1.05 ± 0.36	0.799 0.065
	Tratamiento	0.56 ± 0.12		0.56 ± 0.12	
	Centinela	0.67 ± 0.34		1.20 ± 0.37	
Intestino delgado	Control	2.40 ± 0.30	0.083 0.096	2.40 ± 0.30	0.056 0.064
	Tratamiento	1.95 ± 0.11		1.95 ± 0.11	
	Centinela	1.97 ± 0.48		2.18 ± 0.11	
Intestino grueso	Control	1.00 ± 0.12	0.192 0.201	1.00 ± 0.12	0.923 0.849
	Tratamiento	0.94 ± 0.14		0.95 ± 0.24	
	Centinela	0.95 ± 0.24		0.85 ± 0.06	

Los valores se expresan con la media ± desviación estándar (Desv. E) y la significancia de la diferencia, entre los grupos tratamiento y centinela respecto a sus controles cuando \*P < 0.05.

## -EXAMENES HISTOPATOLOGICOS

Los órganos evaluados durante la necropsia se preservaron en formalina al 10% (ver **figura N°37**) Todos los órganos más susceptibles a sufrir algún tipo de lesión por ser los encargados del metabolismo y eliminación de sustancias tóxicas en el organismo, fueron procesados por medio de la técnica histopatológica clásica para bloques parafinados, cortadas en 5µm con un micrótopo y coloreadas con hematoxilina–eosina, (Ver **anexo N°3**) para luego ser leídos al microscopio por un patólogo. (8, 17, 18)



**Figura N°37.**Órganos de los animales en estudio preservados en formalina al 10% con su respectiva codificación

El objetivo de la realización de los cortes histopatológicos es que el patólogo al observar microscópicamente las células de cada uno de los tejidos de los órganos de los 30 animales estudiados determinara los posibles daños a nivel celular que se pudieron haber generado durante el estudio de toxicidad.

La parte histopatológica en este trabajo de investigación concluyó hasta la realización de los bloques parafinados de los tejidos de los órganos de todos los animales en estudio, proceso que se llevó a cabo en el laboratorio de patología ubicado en CENSALUD. En el anexo N°3 se puede observar el procesamiento de tejidos para la realización de los bloques parafinados.

Dichos bloques parafinados tienen una vida útil de 5 años, por lo que hasta la fecha se conservaron en almacenamiento mientras un patólogo pueda realizar los cortes y observe de manera microscópica las células para concluir el posible daño ocasionado a nivel celular.

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0 CONCLUSIONES

1. Al realizar la identificación de sesquiterpenlactonas por cromatografía en capa fina en las muestras de enero, febrero y marzo de 2014, se puede observar la presencia de sesquiterpenlactonas ya que presentaron manchas de color naranja con el reactivo de Baljet.
2. Los espectros ultravioleta de los extractos *n*-hexánicos obtenidos durante los meses de enero a marzo de 2014 presentaron similitud con los máximos de absorbancia del marcador analítico: Juanislamina, lo que confirma la presencia de sesquiterpenlactonas.
3. Los porcentajes de rendimiento de los tres extractos *n*-hexánicos secos fueron similares, pero el análisis de varianza demostró en forma general que los mejores meses para recolectar *C. urticifolia* son los meses de febrero y marzo, pues no existe diferencia significativa en ambos.
4. El estudio de toxicidad subcrónica del extracto *n*-hexánico de las hojas de *C. urticifolia* produjo una disminución significativa de peso corporal, alteraciones clínicas, alteraciones a ciertos parámetros bioquímicos y hematológicos, lo que indica una toxicidad moderada de la sustancia en estudio.
5. El parámetro analizado de peso corporal de los animales de experimentación presentó alteraciones significativas en los grupos centinela y tratamiento de ambos sexos durante los 90 días de administración del extracto *n*-hexánico de *C. urticifolia*, mostrando

una recuperación de peso por parte de los grupos centinela después de las cuatro semanas de observación.

6. La recuperación del peso corporal fue mayor para los ratones machos que para los ratones hembras durante el periodo de evaluación post 90 días, mostrando que en este estudio las hembras son más susceptibles a los efectos tóxicos causados por el extracto *n*-hexánico.
7. En base a los resultados obtenidos se evidencia un daño a nivel gastrointestinal causado por el extracto *n*-hexánico de la especie *C. urticifolia* a una dosis de 150 mg/kg de peso de los ratones en estudio, información que debe ser confirmada y concluida con exámenes histopatológicos.



**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 7.0 RECOMENDACIONES

1. Completar el estudio con la evaluación histopatológica de los órganos de los animales tratados las cuales ya quedan preparadas con un periodo de vida útil de 5 años a partir del 2014.
2. Tomar las precauciones necesarias en la utilización de preparados caseros de *Calea urticifolia* con fines terapéuticos, ya que en el presente trabajo de investigación se observó que a los tres meses del consumo del extracto *n*-hexánico de la planta medicinal produce daño a nivel gastrointestinal.
3. Considerando que esta especie vegetal es preparada mediante una decocción con agua, se debería evaluar el efecto toxicológico del extracto acuoso en ratones con el fin de observar el comportamiento toxicológico de la planta en el solvente utilizado por la población.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Acta Bioethica, Universidad de Barcelona, España(2007). Alternativas a la experimentación animal en toxicología: situación actual.Barcelona: Martínez-Hidalgo Vinardell, MP.
2. Amorin, M.H. (2013). Sesquiterpene lactones: Adverse health effects and toxicity mechanisms. *Crit Rev Toxicol*, 43(7), 559–579.
3. Ávila, G.; Caballero, J.; Canales, M.; Durán, A.; Hernández, T.; Lira, R. y Romo de Vivar, A. (2005).Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México.*Journal of Ethnopharmacology*, 97, 429–439.
4. Barrios, RM. (2015). Desarrollo de reacciones de oxidación de enlaces C-H aplicación a la síntesis de guayanolidos. [Trabajo de graduación] Puerto Real: Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias.
5. Barsby, R.W.J.; Salan, U.; Knight, DW. y Hault, JRS. (1993). Feverfew and vascular smooth-muscle – extracts from fresh and dried plants show opposing pharmacological profiles, dependent upon sesquiterpene lactone content. *Planta Med*, 59, 20–5.
6. Berl, V. ; Giménez-Arnau, E. y Lepoittevin, J.P. (2009). Alpha-methylenegamma butyrolactones: versatile skin bioactive natural products.*Chemical Re*, 9, 258–70.

7. Bermúdez Toledo, D.; Betancourt Mongado, E; Boffill, M.; Jiménez.; et al. (2007).Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria* 1695-7504, volumen 3 numero 3.
8. Boffill, M.; Jiménez.; González, D.; Pérez, M.; et al. (2008). Evaluación de la Toxicidad Aguda de un Extracto de *Boldoa purpurascens* Cav. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27,250-254.
9. Bohlmann F. y Jakupovic J. (1978). Neue germacranolide aus *Calea urticifolia*. *Phytochemistry*, 18, 119-123.
10. Bonilla J.A. (2013). Determinación de la toxicidad, actividad sedante y ansiolítica del extracto acuoso de las flores de *Erythrina berteroana* (pito) en ratones NIH. [Trabajo de graduación] San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia.
11. Borges del Castillo J.; Ferrero MTM.; Luis FR.; Bueno PR.; Leonor NL y Arévalo SC. (1981). Salvadorian compositae. II. Juanislamin and lactones from *Calea urticifolia* 2, 3-epoxy-juanislamin, two new sesquiterpenic lactones from *Calea urticifolia*. *J. Nat. Prod*, 44, 348-350.
12. Brookes, PS.; Robotham, JL. y Yoon Y. et al. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, 817– 33.

13. Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. Zaragoza, España, Editorial ACRIBIA, SA, segunda edición, pag.611-615.
14. Cardozo, C. (2007). El animal como sujeto experimental. Aspectos Técnicos y Éticos. Centro Disciplinario de Estudios en Bioética (CIEB), Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, Universidad de Chile, pág. 13-14.
15. Castro, V.; Da Costa, F.; Garcia-Pineros, A.; Kisiel, W. ; Klaas, C.; Merfort, I.; Murillo, R.; Rüngeler, P.; Schulte-Mönting, J. y Siedle, B. (2004). Quantitative structure activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF-kappaB. *Journal of Medicinal Chemistry* , 47,6042-6054.
16. Chadwick, M.; Gawthrop, F.; Trewin, H. y Wagstaff, C. (2013). Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 12,780-12,805.
17. Chihiro, K.; Hiroto, S.; Makoto, U.; Matsuura, N.; Naoko, H. y Yamada, M. (2004). Germacranolides from *Calea urticifolia*. *Phytochemistry*, 65, 3107-3111.
18. Centro de Investigación y Desarrollo en Salud. CENSALUD. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Vías de administración y toma de muestras (rata y ratón) (2010). Universidad de El Salvador.

19. Centro de Investigación y Desarrollo en Salud. CENSALUD. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Toxicidad Subcrónica por administración continua a 90 días. (2010). Universidad de El Salvador.
20. Clawson, AB. (1931). A preliminary report on the poisonous effects of bitter rubber weed (*Actinea odorata*) on sheep. *J Agr Res*, 43, 693–701.
21. Consejo Canadiense para el Cuidado Animal. CCAC. (1998). Manual sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación.
22. Crouch Stanley, R.; Holler, F.; James Skoog, Douglas A. y West Donald M. (2005). *Química Analítica*. 3ª Edición en español. México, D.F. Mc Graw Hill. . Pag. 615.
23. Días, DA.; Urban, S. y Roessner U (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*, 2, 303-336.
24. Domínguez XA, Métodos de investigación fitoquímica (1973). México, Editorial Limusa. Pág. 93-109.
25. Duke, James A. (2009). *Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America*. Editorial CRC Press by Taylor & Francis Group. pág. 145.
26. European Medicine Agency Inspection. EMEA. (2008). Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products, CPMP/QWP/2819/00 and EMEA/CVMP/814/00. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP).

27. Farmacopea ufficiale de lla repubblica Italiana (1972). Ottava edizione. Roma, Italia. Instituto Poligrafico de llo statu P.V. Il Volume, 390-393.
28. Gallego CI., Meléndez D I y Pérez GE. (2000). Determinación de la bioactividad de 26 especies de la flora salvadoreña mediante el bioensayo interacción con ADN por cromatografía líquida de alta resolución, [Trabajo de graduación], Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. Pág. 4-5
29. Gámez R. y Más R. (2007). Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 38, No. 3, 204-208.
30. Guide Canadian Council on Animal Care. CCAC. (1998). la selección del punto final apropiado en experimentos en que se utilizan animales para investigación científica, enseñanza y pruebas de laboratorio. Editorial Estampa, México DF, 2000.
31. Gómez Barrera M. (2010). Determinación de actividad anti-inflamatoria de sesquiterpenlactonas aisladas de *Calea peruviana* y *Calea prunifolia*. [Tesis de maestría] Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Pág. 20-39.
32. González Ayala JC. (2002). Botánica medicinal popular, 2ª Edición. El Salvador, Centroamérica, CUSCATLANIA, Diciembre Pág. 32,39, 42, 47, 52, 64, 67, 72, 98, 123.
33. Gupta PM. 270 Plantas medicinales Iberoamericanas, (1995). Bogotá Colombia, Editorial Presencia Ltda Pág. 93-95.

34. Gurib-Fakim A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1–93.
35. Hasegawa, N.; Kurosaka, C.; Matsuura, N.; Suzuki, H.; Ubukata, M. y Yamada M, (2005). Inhibition of preadipocyte differentiation by germacranolides from *Calea urticifolia* in 3T3-L1 cells. *Biosci. Biotech. Biochem.* 69, 2470-2474.
36. Heinrich, M.; Robles, M.; West, J.E.; Ortiz de Montellano, B.R. y Rodríguez, E. (1998). Ethnopharmacology of Mexican *Asteraceae* (Compositae). *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 38, 539–565.
37. Herrera-Parra, E.; Cristóbal-Alejo, J.; Tún-Suárez, JM.; Gamboa-Angulo y Marbán-Mendoza N. (2009). Extractos acuosos de *Calea urticifolia* para el control de *Meloidogyne incognita*. *Nematrónica*, 39, 289-296.
38. Herz W. y Kumar N. (1980). Sesquiterpene lactones of *Calea zacatechichi* and *Calea urticifolia*. *Phytochemistry*, 19, 593-597.
39. Hoffmann D. (2003). Medicinal herbalism: the science and practice of herbal medicine. Rochester, UK: Healing Arts Press.
40. Itoigawa, M.; Takeya, K.; Furukawa, H. y Ito K. (1987). Mode of cardiotoxic action of helenalin, a sesquiterpene lactone, on guinea-pig ventricular myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol*, 9, 193–201.

41. James, L.F.; Panter, K.E.; Nielsen, D.B. y Molyneux, R.J. (1992). The effect of natural toxins on reproduction in livestock. *J Anim Sci*, 70, 1573–9.
42. Jardín Botánico La Laguna, Sección Herbario Jardín Botánico la Laguna, **Herbario LAGU**, Antiguo Cuscatlán, La Libertad, El Salvador.
43. Konaklieva, M. I.; Plotkin, B. J. Lactones: Generic Inhibitors of Enzymes? *Mini Rev. Med. Chem.* 2005, 5, 73–95.
44. Laekeman, G.M.; Mertens, J. y Totte', J. et al. (1983). Isolation and Pharmacological Characterization of Vernolepin. *J Nat Prod*, 46, 161–9.
45. Lagos, J. A. Compendio de botánica sistemática (1987). Tercera edición. Dirección de Publicación e Impresos del Ministerio de Cultura y Comunicaciones. San Salvador, El Salvador. Pág. 79, 81, 95.
46. Leonor Genovez AN. (1980). Estudio inicial de cuatro germacranólidos de la *Calea urticifolia*, [Trabajo de graduación] San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia, Pág. 10.
47. Lock de Ugaz O. (1949). Investigación fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales, Perú, Pontificia Universidad Católica del Perú, Segunda edición. Pág. 53-63; 265-269.
48. Marcano D. y Hasegawa M. (2002). Fitoquímica orgánica, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Pág. 54-57.

49. Martínez Martínez A. (2001). Sesquiterpenlactonas, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Pág. 1-19.
50. Matiz Mejía C, Rodríguez G. (2007). Flora medicinal y sus conocimientos asociados lineamientos para una regulación. Editorial Universidad del Rosario, primera edición Colombia, pág. 294-296  
<http://books.google.es/books?id=uUBc6u7KVCQC&pg=PA34&dq=plantas+medicinales+segun+la+oms&hl=es&sa=X&ei=GShxU8StBvHJsQT9qIGgAg&ved=0CD4Q6AEwAQ#v=onepage&q=plantas%20medicinales%20segun%20la%20oms&f=false>
51. Mejía Valencia, J. y Parada Palacios, E.; (2009). Estudio Toxicológico subcrónico en ratones (INH) por administración oral de infusión de epazote (*Chenopodium ambrosioides*). [Trabajo de Graduación], San Salvador, El Salvador.
52. Mitchell, J.C.; Rodriguez, E.; Towers, G.N.H. (1976). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 15, 1573–1580.
53. Nakagawa, Y.; Inuma, M.; Matsuura, N.; Yi, K.; Naio, M.; Nakayama, T.; Nozawa, Y. and Akao Y. (2005). A potent apoptosis-inducing activity of a sesquiterpene lactone, arucanolide, in HL60 cells: a crucial role of apoptosis-inducing factor. *J. Pharmacol. Sci.*, 97, 242-252.
54. Negría Morales G. (2013) lactonas sesquiterpénicas de origen natural que inducen apoptosis y la activación de la vía MAPK en líneas celulares tumorales humanas [tesis doctoral] las Palmas de Gran Canaria: universidad de las Palmas de Gran Canaria. Programa de Doctorado.

55. Núñez M.J., Bazzocchi IL, Martínez ML, Rodríguez ML, Torres DF, Guzmán JA. *et al.* (2011). Especies de la flora salvadoreña como fuente de nuevos agentes terapéuticos, A/030031/10 Proyecto de Cooperación Interuniversitaria e Investigación Científica PCI/AECID.
56. OECD 408 GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodent. 1998.
57. Ohguchi, S.; Ito, M.; Yokoyama, K.; Inuma, M.; Itoh, T.; Nozawa, Y. and Akao, Y. (2009). Effects of sesquiterpene lactones on melanogenesis in mouse B16 melanoma cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 32: 308-310.
58. Olsen RW. y Venter JC. (1986). Benzodiazepine/GABA receptors and chloride channels: structural and functional properties. A. R. Liss, New York.
59. Ong, C.N.; Shen, H.M.; Won, YK. and Zhang, S. (2005) Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: Bioactivity and molecular mechanisms. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents*, 5, 239–249.
60. Ortiz S. (2011). Evaluación del extracto etanólico de *Calea urticifolia* (Mill.) dc. sobre la regulación de la secreción de adipocinas asociadas a la resistencia a la insulina [Tesis de Maestría] San Luis Potosí: Universidad Autónoma de Luis Potosí. Facultad de Ciencias Químicas, Ingeniería y Medicina. Pág. 19-21

61. Perdomo Paiba, M.; Romay Penabad, T.; Sebazco Pernas, C.; Sotolongo Baró, MC. (1996). Toxicología subcrónica bucal del extracto fluido de *plantago lanceolata*. *Rev cubana plant med* 1:24-26.
62. Picman AK. (1986). Biological-activities of sesquiterpene lactones. *Biochem System Ecol*, 14, 255–81.
63. Post L, Bailey EM. (1992). The effect of dietary-supplements on chronic bitterweed (*Hymenoxys-odorata*) poisoning in sheep. *Vet Hum Toxicol*, 34, 209–13.
64. Ramírez Díaz, F.; Reyes, C.J. y Valdés Martínez, D. E. (2002). Principales plantas de uso médico popular en los municipios de Ahuachapán, Atiquizaya, Jujutla y Tacuba del departamento de Ahuachapán. [Tesis de Graduación] Santa Ana: Universidad de El Salvador. Facultad Multidisciplinaria de Occidente.
65. Rodríguez, E.; Towers, GHN. y Mitchell, JC. (1976). Review – Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 15, 1573–80.
66. Sánchez Pérez JP. (2013). Cuantificación de sesquiterpenlactonas totales procedentes del extracto clorofórmico de hojas de *Calea urticifolia* (juanislama) recolectadas en el periodo correspondiente de julio a diciembre de 2012 [Trabajo de graduación] San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia.
67. Schmidt TJ. (1999). Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects. *Curr Organic Chem*, 3, 577–608.

68. Silbergeld Ellen K. (1998). Encyclopaedia of Occupational Safety and Health. Toxicology. Chapter 33.
69. Terry. MK.; Williams, HG; Kim, HL. et al. (1983). Ovine urinary metabolites of hymenoxon, a toxic sesquiterpene lactone isolated from *Hymenoxys odorata* DC. *JAgric Food Chem*, 31, 1208–10.
70. Umeruma, K.; Itoh, T.; Hamada, N.; Fujita, Y.; Akao, Y.; Nozawa, Y. *et al.* (2008). Preconditioning by sesquiterpene lactone enhances H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Nrf2/ARE activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 368, 948-954. (38)
71. UNAM. **Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana.** [Base de datos en internet] México: BIBLIOTECA DIGITAL de la medicina tradicional Mexicana Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7856>
72. Vargas, D.; Ober, AG. y Fischer NH. (1989). Sesquiterpene lactones from three populations of *Calea urticifolia*. Lactonas sesquiterpénicas de *Calea urticifolia* aisladas de tres poblaciones. *Revista Latinoamericana de Química*, 20. (1), 11
73. Villacorta Hernández J. (2013). Cuantificación de sesquiterpenlactonas provenientes de las hojas de *Calea urticifolia* (Juanislama) recolectadas de enero a junio de 2012. [Trabajo de graduación] San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia.

74. Witzel, DA.; Jones, LP. e Ivie GW. (1977). Pathology of subacute bitterweed (*Hymenoxys odorata*) poisoning in sheep. *Vet Pathol*, 14, 73–8.
75. Yamada, M.; Matsuura, N.; Hiroto, S.; Chihiro, K.; Naoko, H.; Makoto, U.; Tanaka, T. and Inuma, M. (2004). Germacranolides from *Calea urticifolia*. *Phytochemistry*, 65, 3107-3111

