

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



CUANTIFICACION DE SESQUITERPENLACTONAS PROVENIENTES DE LAS
HOJAS DE *Calea urticifolia* (JUANISLAMA) RECOLECTADAS EN EL
PERIODO DE ENERO A JUNIO DE 2012

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
JOSUE ROBERTO VILLACORTA HERNANDEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

ABRIL 2013

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

LICDA. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTO Y QUIMICA AGRICOLA

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

ASESORA DE AREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

LICDA. Rina Antonieta Toledo Mendoza

DOCENTES DIRECTORES

MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz

Dr. Marvin José Núñez Rivas

AGRADECIMIENTOS

A Jesucristo Hijo de Dios, Al Padre de las luces y a su Santo Espíritu, por darme todo lo necesario y aún más, para concluir este pequeño triunfo, sin el cual jamás hubiera llegado a este momento.

A mi padre terrenal, que me apoyo incondicionalmente con tantos sacrificios que jamás podré pagar, a pesar de su frágil salud, siempre estuvo cuando más lo necesitaba, por mostrarme el camino al más grande título que puede el ser humano desear, de llegar a ser por misericordia y gracia Hijo de Dios.

A mi madre que siempre me encomendó a Dios en cada momento, por sus oraciones que fueron siempre la coraza en cada segundo de mi vida, por hacerme sentir bienvenido a casa y por brindarme su gran amor incondicional.

A mi hermano Byron, al cual amo con todo mi corazón y toda su familia (Byrito y Sary) gracias por toda su ayuda, siempre la recordaré, espero verlos y salir a caminar como siempre lo solíamos hacer.

A mi hermana Ericka y su esposo Mauricio por ser una pieza fundamental en mis ánimos de seguir adelante y sentir en ellos un apoyo verdadero, se les ama mucho.

A Karen Elieth Cabrera Osorio, por ser esa piedra la cual me sustentaba cuando me sentía completamente desamparado, por brindarme su cariño, amor y ternura, por ser mi compañía cuando más solo me sentía, por estar siempre pendiente de mis necesidades y sufrir en silencio mi dolor.

A mi abuelitos, mamá Con, mamá Lina y papá René; los cuales estos dos últimos están durmiendo, esperando la primera resurrección. Cada uno de ellos marco mi vida para aferrarme aún más, a nuestro Señor Jesucristo.

Al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia UES y todos los docentes de dicho laboratorio, Dr Marvin Nuñez, MSc Morena Martinez, Licda Rinha Toledo, Licda. Ana Santamaria, y Licda Susy Doño (Su), por ser más que profesores, pues son verdaderos amigos, no lo hubiera logrado sin su gran paciencia y apoyo incansable.

Al proyecto CIC-UES bajo el código 05.09 titulado: *Estrategia multidisciplinar en la búsqueda de nuevos agentes analgésicos y antiinflamatorios procedentes de la Familia Compositae*. Por financiar esta tesis de licenciatura.

Al Laboratorio Físicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia perteneciente a la Universidad de El Salvador, por haberme permitido realizar todas las medidas espectroscópicas necesarias en este trabajo de graduación.

A todos los Docentes de La Facultad de Química y Farmacia, que me ayudaron de diferentes formas, cuando más lo necesite, jamás olvidaré sus asistencialismos, todos son verdaderos docentes y hacen honor a su noble profesión la cual espero un día tener la oportunidad de ejercerla por amor a la enseñanza.

A nuestra amada Universidad, la cual llevo dentro de mi corazón con profundo agradecimiento, por la oportunidad que me dio de formarme en ella. Siento un estima por ella como pocos creo que le tienen, su existencia representó la oportunidad de formarme hasta este nivel.

Todos esos ángeles, (amigas/os) que Dios mando a mi vida a ayudarme de millones de maneras, quizás ni se dieron cuenta, que muchas veces sus ayudas fueron vitales para mí.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado en primer lugar a mi buen Dios y Salvador Jesucristo.

A mi familia que es el pilar que Dios dejó de mi vida.

A los docentes del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales y docentes en general de la Facultad de Química y Farmacia.

A las Instituciones y laboratorios que me ayudaron a realizar todo lo necesario para este triunfo.

A mis amigos que siempre estuvieron cerca.

A todas esas personas que confiaron en mí y siempre tuvieron una palabra de aliento para que termine el presente trabajo de graduación.

INDICE

| | Pág. |
|---|------|
| Resumen | 10 |
| Capítulo I | 12 |
| 1.0 Introducción | xiii |
| Capítulo II | 15 |
| 2.0 Objetivos | 16 |
| Capítulo III | 17 |
| 3.0 Marco Teórico | 18 |
| 3.1 Generalidades de las sesquiterpenlactonas | 18 |
| 3.1.1 Definición de sesquiterpenlactonas | 18 |
| 3.1.2 Clasificación | 19 |
| 3.1.3 Nomenclatura | 19 |
| 3.1.4 Biogénesis | 20 |
| 3.1.5 Formación de la lactona sesquiterpénica | 23 |
| 3.1.6 Distribución y estado natural de sesquiterpenlactonas | 24 |
| 3.1.7 Extracción de sesquiterpenlactonas | 24 |
| 3.1.8 Pruebas de identificación de sesquiterpenlactonas | 27 |
| 3.1.9 Separación y análisis cromatográfico | 28 |
| 3.1.10 Características espectrales | 29 |
| 3.1.11 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS) | 29 |
| 3.2 Generalidades de Género <i>Calea</i> | 30 |
| 3.2.1 Género <i>Calea</i> | 30 |

| | |
|--|----|
| 3.2.2 Especie <i>Calea urticifolia</i> | 32 |
| 3.2.3 Descripción botánica | 32 |
| 3.2.4 Distribución de <i>Calea urticifolia</i> | 35 |
| 3.2.5 Distribución geográfica de <i>Calea urticifolia</i> en El Salvador | 36 |
| 3.2.6 Usos etnobotánicos de <i>Calea urticifolia</i> | 37 |
| 3.2.7 Metabolitos secundarios aislados de <i>Calea urticifolia</i> | 39 |
| 3.2.8 Sesquiterpenlactonas aisladas de <i>Calea urticifolia</i> | 40 |
| 3.2.9 Actividades biológicas de <i>Calea urticifolia</i> | 45 |
| Capítulo IV | 51 |
| 4.0 Diseño Metodológico | 52 |
| 4.1 Tipo de estudio | 52 |
| 4.2 Investigación bibliográfica | 52 |
| 4.3 Investigación de campo | 52 |
| 4.3.1 Identificación del material vegetal | 52 |
| 4.3.2 Recolección del material vegetal | 53 |
| 4.4 Parte experimental | 53 |
| 4.4.1 Preparación de las muestras a investigar | 53 |
| 4.4.2 Obtención de extracto seco clorofórmico de <i>Calea urticifolia</i> | 54 |
| 4.4.3 Identificación de las sesquiterpenlactonas en el extracto clorofórmico por cromatografía en capa fina | 54 |
| 4.4.4 Identificación por espectroscopía ultravioleta de las sesquiterpenlactonas de <i>Calea urticifolia</i> | 55 |
| 4.4.5 Cuantificación de sesquiterpenlactonas mediante | |

| | |
|---|----|
| espectroscopía visible. | 55 |
| 4.4.6 Diseño estadístico | 56 |
| 4.4.6.1 Desviación típica estándar. | 57 |
| 4.4.6.2 Intervalo de confianza | 57 |
| 4.4.7 Parte experimental | 59 |
| Capítulo V | 60 |
| 5.0 Resultados y discusión de resultados | 61 |
| 5.1 Identificación de la especie vegetal | 61 |
| 5.2 Recolección y preparación del material vegetal | 61 |
| 5.3 Preparación del extracto clorofórmico seco | 62 |
| 5.4 Resultados del análisis por cromatografía en capa fina | 62 |
| 5.5 Resultados de la identificación de las sesquiterpenlactonas por espectroscopía ultravioleta. | 66 |
| 5.6 Resultados de la cuantificación de sesquiterpenlactonas | 67 |
| 5.6.1 Cantidad de sesquiterpenlactonas presentes en el total de hojas colectadas | 69 |
| Capítulo VI | 71 |
| 6.0 Conclusiones | 72 |
| Capítulo VII | 73 |
| 7.0 Recomendaciones | 74 |
| Bibliografía | 75 |
| Glosario | 81 |
| Anexo | 83 |
| Materiales y Equipos | 85 |

RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo el cuantificar el contenido de sesquiterpenlactonas en ***Calea urticifolia*** durante los meses de enero a junio de 2012. Las sesquiterpenlactonas son metabolitos secundarios que se encuentran principalmente en la Familia botánica de las Asteráceas y dentro de esta Familia se encuentra ***Calea urticifolia*** conocida como Juanislama, popularmente utilizada por la población Salvadoreña en el tratamiento de artritis, fiebre, cáncer, coloradias (ácaros), analgésico, diabetes, entre otros.

La investigación consistió en la identificación de la especie vegetal por un botánico experto; la recolección de ***Calea urticifolia*** dos veces por mes; para proseguir con la extracción, identificación y cuantificación de las sesquiterpenlactonas presentes en las hojas; la sesquiterpenlactonas se extrajeron a través del método continuo Soxhlet, luego se eliminó el solvente de extracción por medio de un rotaevaporador para obtener los extractos secos. A partir de estos extractos secos se realizaron dos pruebas de identificación de sesquiterpenlactonas: 1) A través de un reactivo revelador (reactivo de Baljet), luego de ser eluida en cromatografía de capa fina, además se obtuvieron los R_f de cada una de las manchas reveladas. 2) Se realizó por medio de un espectroscopía ultravioleta. Posteriormente se llevó a cabo la cuantificación por medio de espectroscopía visible.

Los resultados de la identificación de sesquiterpenlactonas dieron positivos por los dos métodos; algunas manchas en la cromatografía de capa fina resultaron tener un R_f diferente a los marcadores, las cuales sería convenientes estudiar en un futuro.

Es necesario completar los meses de julio a diciembre para tener una visión más amplia de la producción de sesquiterpenlactonas en ***Calea urticifolia*** durante todo el año.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Las sesquiterpenlactonas son metabolitos secundarios predominantes de la Familia Asteráceas (Compositae), derivados biogenéticamente del farnesil difosfato (FPP). Estos poseen la característica de ser amargos al gusto y se encuentran en todas las partes de las plantas de la Familia Asteraceae (Compositae), en concentraciones que varían entre 0.01 al 8% del peso seco, siendo las concentraciones mayores generalmente en las hojas. Además los métodos más habituales de extracción son el reflujo y el soxhlet. Las sesquiterpenlactonas poseen una gran variedad de actividades biológicas como: citotóxica, antitumoral, analgésica, antiinflamatoria, antimicrobiana, entre otras. ^{(10), (20)}

Calea urticifolia (Juanislama) es una especie vegetal ampliamente utilizada en la medicina tradicional salvadoreña para una gran variedad de padecimientos, entre los que se encuentran: artritis, fiebre, cáncer, coloradías (ácaros), analgésico, diabetes, entre otros. ⁽¹⁰⁾

El presente trabajo consistió en la recolección, extracción, identificación y cuantificación de sesquiterpenlactonas presentes las hojas de ***Calea urticifolia*** (Juanislama) durante el periodo de Enero a Junio de 2012 (el periodo restante que consta de Julio a Diciembre se completará en 2013 a través de un nuevo trabajo de graduación). Este se puede considerar como un primer estudio que se lleva a cabo sobre cuantificación de sesquiterpenlactonas en esta especie vegetal.

El presente trabajo de graduación fue financiado por el proyecto de CIC-UES, bajo el código 09.05 titulado: *Estrategia multidisciplinar en la búsqueda de nuevos agentes analgésicos y antiinflamatorios procedentes de la Familia*

Compositae; concedido por el Consejo de Investigación Científica de la Universidad de El Salvador.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Cuantificar las sesquiterpenlactonas provenientes de las hojas de *Calea urticifolia* en el periodo comprendido de enero a junio de 2012.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Identificar la especie vegetal en el Herbario del Jardín Botánico La Laguna.
- 2.2.2 Recolectar las hojas de la *Calea urticifolia* bimensualmente durante el periodo comprendido de Enero a Junio de 2012.
- 2.2.3 Realizar la extracción de las sesquiterpenlactonas por el método continuo en Soxhlet, utilizando cloroformo como solvente de extracción.
- 2.2.4 Cuantificar las sesquiterpenlactonas presentes en el extracto clorofórmico mediante espectroscopía visible.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 GENERALIDADES DE LAS SESQUITERPENLACTONAS

Las sesquiterpenlactonas constituyen un grupo numéricamente importante de sustancias (alrededor de 3000 estructuras conocidas) que ya fueron descritas en los tratados antiguos de materia médica bajo el nombre evocado de “Principios Amargos”. Estas sustancias se encuentran en hongos, briofitos; pero mayoritariamente en especies de la Familia Asteraceae, donde se localizan frecuentemente en pelos secretores situados alrededor de la hoja, tallo y brácteas de la inflorescencia a menudo en los aquenios. ^{(20), (23)}

Las sesquiterpenlactonas poseen un esqueleto fundamental de 15 átomos de carbono, que teóricamente derivan de la unión cabeza-cola de tres fragmentos de isopreno y se considera biogenéticamente derivados del farnesil difosfato; parte del esqueleto es un anillo de metilbutenólido. ⁽⁷⁾

3.1.1 Definición de sesquiterpenlactonas

Son una clase de terpenoides de origen natural (sesquiterpenoides C₁₅) con un anillo lactónico, que provienen biogenéticamente del farnesil difosfato, presentando una gran diversidad de estructuras y clasificaciones (ver Fig. N° 1).

^{(17), (20), (23)}

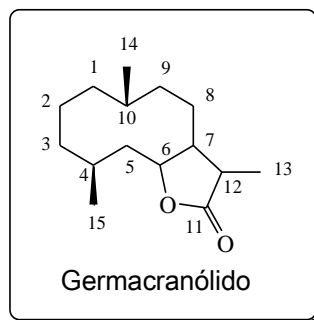


Fig. N° 1. Ejemplo de una sesquiterpenlactona con esqueleto germacranólido.

3.1.2 Clasificación

Las sesquiterpenlactonas se clasifican comúnmente de acuerdo con el tipo de núcleo que posean y con la terminación ólido, que indica la existencia de un grupo funcional lactónico; por ejemplo las que tienen el núcleo tipo Germacrano se las llama Germacranólidos; las que tienen el núcleo tipo Eremofilano son Eremofilanólidos, las que contengan núcleo tipo Eudesmano son Eudesmanólidos, Heliangólidos, Michampanólidos, etc. ⁽²³⁾

3.1.3 Nomenclatura

Debido a la gran diversidad estructural de las sesquiterpenlactonas, no se cuenta con normas claras para su nomenclatura, por esto se acostumbra denominarlas con nombres vulgares p.ej. Helenalina, Mexicanina, Artemisinina, entre otras; aunque algunos autores las nombran relacionando el núcleo básico y los sustituyentes. ⁽²³⁾

La Fig. N° 2 muestra ejemplos de esqueletos de sesquiterpenlactonas y la manera como se enumeran los átomos de carbono del núcleo base.

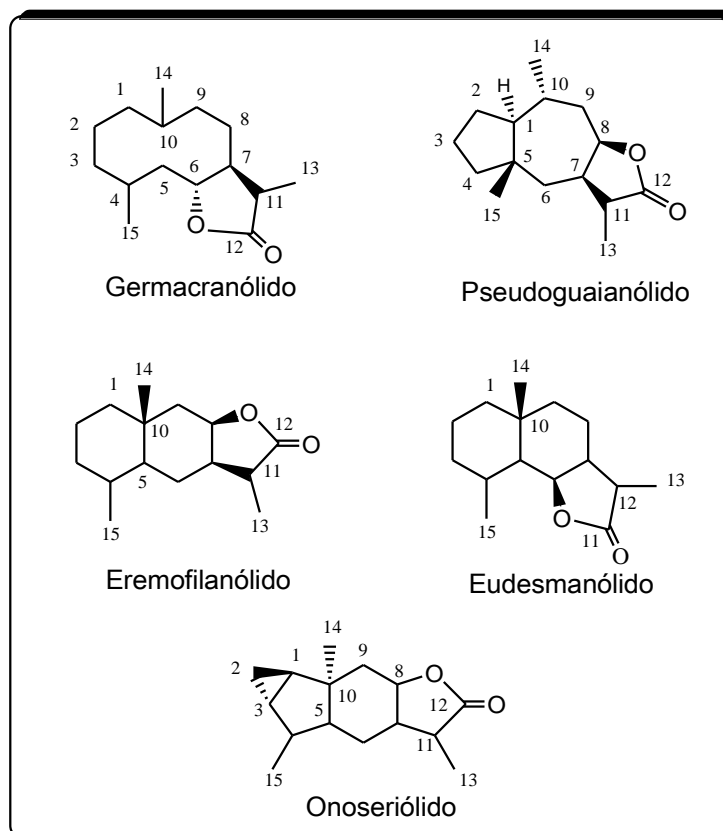


Fig. N° 2. Ejemplos de numeración de carbonos en cinco esqueletos base de sesquiterpenlactonas.

3.1.4 Biogénesis

Las sesquiterpenlactonas se originan a partir de farnesil difosfato, que por pérdida del OPP (grupo difosfato) se produciría el catión *E, E*-farnesilo y a partir de este se generarían posterior adición electrofílica el catión germacrilo y el humalilo (Ver fig. 3), los cuales a través de adiciones electrofílicas y protonaciones de doble enlace, nos conducirían a los cationes guailo y eudesmilo (Ver Fig. N° 3). (5) A partir del catión *E, E*-farnesilo y por medio del giro del enlace 3,4, se formaría el catión *E, Z*-farnesilo (Ver Fig. N° 3), el cual generaría a través de una serie de reacciones de adición electrofílica y

desplazamientos 1,3 de hidruro, cationes tales como el bisabólilo, *cis*-germacrilo, *cis*-humilo, etc. (Ver Fig. N° 3). ⁽⁵⁾

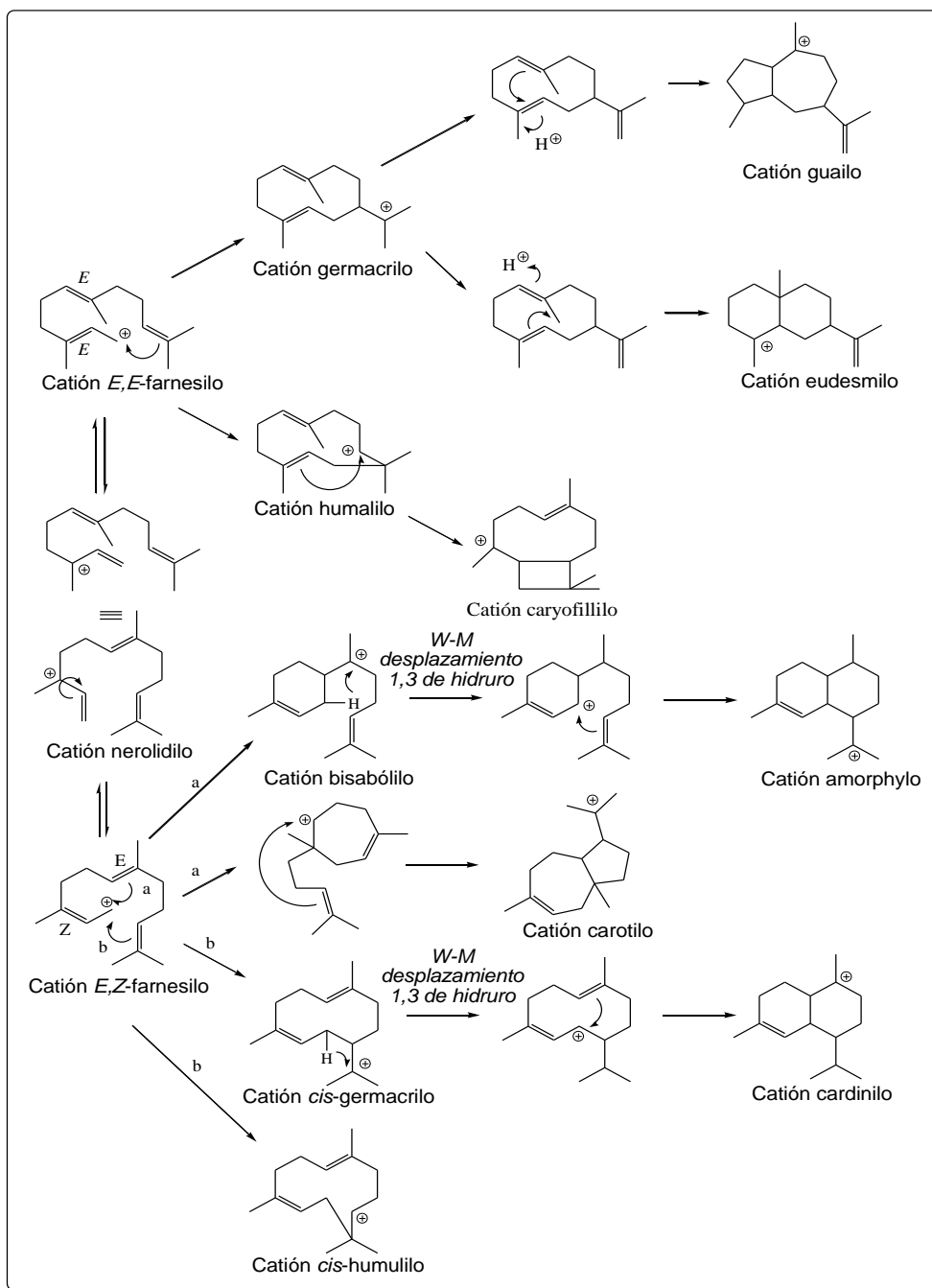


Fig. N° 3 Biogénesis de los sesquiterpenos cíclicos, a partir del catión *E, E*-farnesilo y *E, Z*-farnesilo.

Se ha demostrado también que hay una relación biogénica entre el germacranólido y las otras sesquiterpenlactonas según puede observarse en la Fig. N° 4

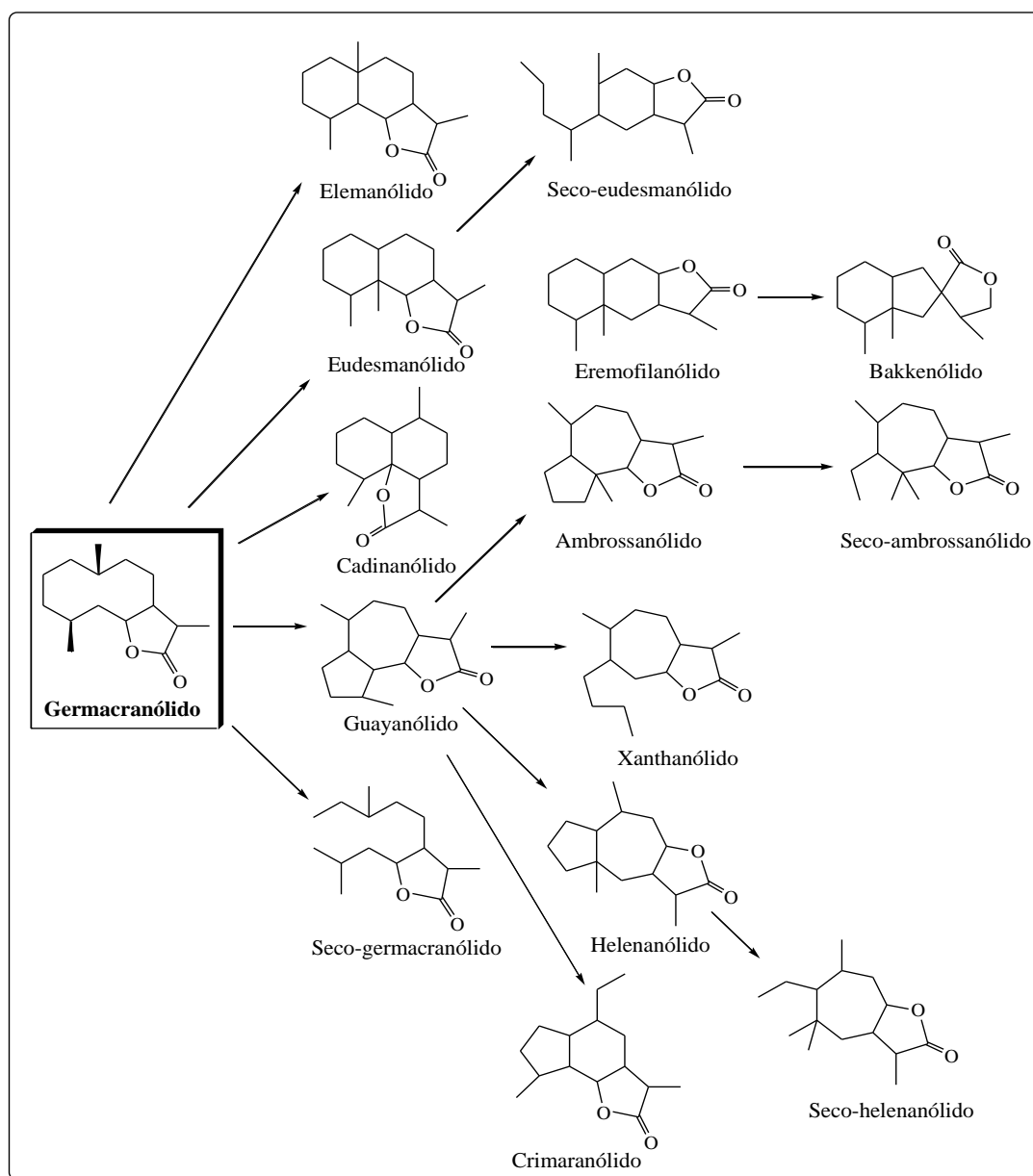


Fig. N° 4 Formación de diversos esqueletos sesquiterpenlactónicos a partir del esqueleto de germacranólido.

3.1.5 Formación de la lactona sesquiterpénica

Una propuesta biogénica de formación del anillo lactónico, podría transcurrir a través del farnesil difosfato por pérdida del OPP, generándose el catión E, E-farnesilo. A partir de este y por medio de la pérdida de un protón se generaría el Germacrano A. Hidroxilación selectiva del C-13 y posterior oxidación con NAD^+ (dinucleotido de adenina nicotinamidasas) nos producirá el ácido germacránico (Ver Fig. N° 5), posterior hidroxilación regio y estereoselectiva con NADPH (dinucleotido de adenina nicotinamida reductasa) en presencia de O_2 y esterificación intramolecular se generaría el (+)-Custunólido. (5), (14)

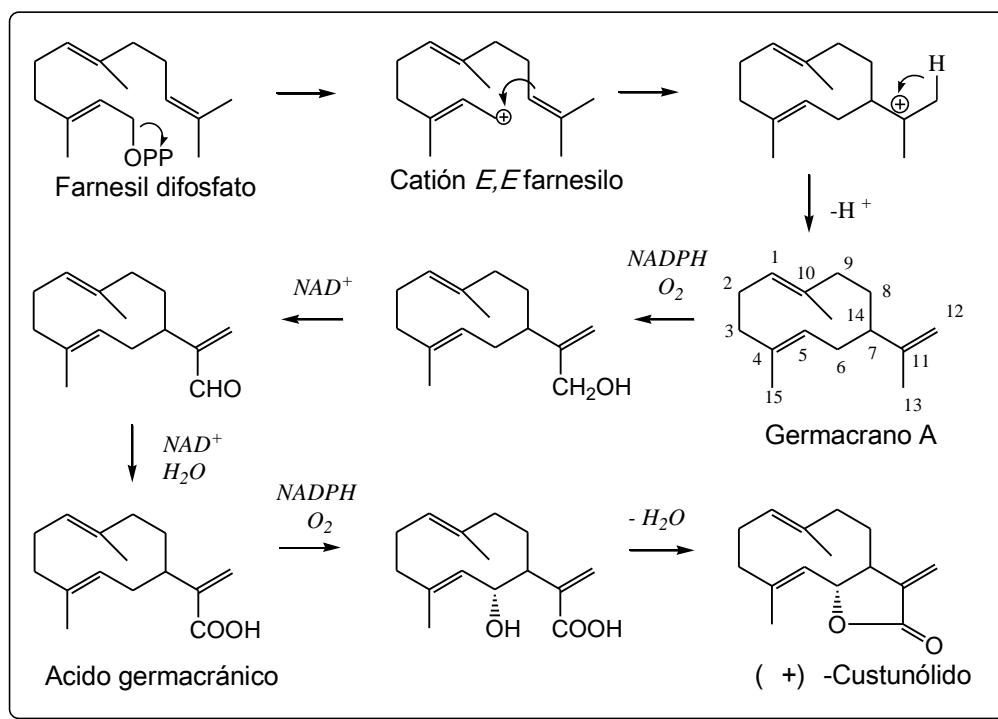


Fig. N° 5 Propuesta biogénica de formación del (+)-Custunólido.

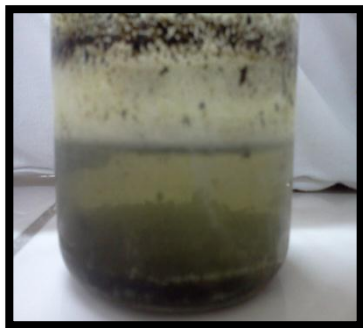
3.1.6 Distribución y estado natural de sesquiterpenlactonas

Las sesquiterpenlactonas son constituyentes característicos de plantas de la Familia Asteraceae (Compuestas), aunque se han encontrado en otras pocas plantas de Familias como Magnoliáceas, Umbelíferas y Lauráceas. Hasta 2011 se habían reportado unas 3000 sesquiterpenlactonas naturales y las concentraciones de sesquiterpenlactonas pueden variar entre el 0.01 y el 8% del peso seco, siendo las concentraciones mayores generalmente en las hojas, aunque están en toda la planta. Principalmente se les puede encontrar en forma libre y raramente en forma glicosídica. ^{(6), (7), (19)},

3.1.7 Extracción de sesquiterpenlactonas

Debido a que la gran mayoría de sesquiterpenlactonas naturales que se encuentran, están en forma libre, las propiedades de solubilidad características están relacionadas con la gran mayoría de terpenoides y por lo tanto son solubles en solventes relativamente apolares como cloroformo, diclorometano, benceno, éter etílico, etc.; siendo el cloroformo el más utilizado para su extracción. ⁽⁷⁾ Estas son algunas de las formas de extracción de sesquiterpenlactonas:

- El material seco y molido se extrae por medio del método soxhlet, utilizando como solvente el cloroformo. El extracto concentrado se redissuelve en etanol caliente y se añade solución acuosa de acetato de plomo al 5%, con lo cual se precipitan sustancias más polares. Luego de filtrar, el filtrado se concentra y se somete a cromatografía (Marcha de Clark). (Ver figura N° 6). ⁽³⁾



1. Precipitación con acetato de plomo



2. Filtrado



3. Concentración del filtrado



4. Cromatografía de capa fina

Fig. N° 6 Marcha de Clark

- El material vegetal seco y molido se macera durante 48 horas con cloroformo. Se elimina el solvente a presión reducida y el residuo se extrae con etanol caliente. La fase etanólica se diluye con una solución acuosa de acetato de plomo y de ácido acético. La suspensión se deja reposar 2 días y se filtra. El filtrado se concentra y el residuo se extrae completamente con cloroformo. El extracto clorofórmico se lava con agua, se seca con sulfato de sodio anhidro y se somete a cromatografía.

(7)

- El material vegetal seco y molido, se macera con etanol. La solución etanólica se concentra y posteriormente se diluye con agua y se extrae

con éter de petróleo. La fase agua-etanol se extrae exhaustivamente con cloroformo. Los extractos clorofórmicos se secan y concentran. El residuo se cromatografía con alúmina. ⁽⁷⁾

- El material seco y molido se extrae por medio del método Soxhlet utilizando cloroformo como solvente extractor, hasta agotamiento de la muestra. (Ver Fig. N° 7) Luego se procede a la separación de las sesquiterpenlactonas por medio de cromatografía de columna. ^{(23), (34)}



Fig. N° 7 Aparato de extracción Soxhlet.

3.1.8 Pruebas de identificación de sesquiterpenlactonas

- Como todas las **γ -lactonas** son difíciles de saponificar, se recurre a la de **hidroximatos férricos de color púrpura**. Una gota de solución etanólico o etérea del compuesto se coloca en un tubo de 4 x 50 mm o en un microcrisol, se añade una gota de solución metanólica 2N de hidróxido de potasio. La mezcla se calienta durante 1-2 min. En seguida se enfría, se acidula con ácido clorhídrico 0.5 N y se añade una gota de cloruro férrico 1%; se observa la coloración violácea. Las santoninas dan un color rosa violeta y la alantolactona violeta oscuro. Las cumarinas, otras lactonas y en general los esteres, dan positiva esta prueba. ⁽⁷⁾
- **Las lactonas γ,β -insaturadas dan la prueba de Legal** con la evidencia de una coloración rosa, aunque también las β,γ -lactonas dan coloración si no se controla bien el pH, ya que estas se isomerizan en medio alcalino. Unos 2 mg de sustancia se disuelven en 2 a 3 gotas de piridina; en seguida se le añade una gota de una solución reciente de nitroprusiato de sodio 0.5% y después se le añade gota por gota, 4 gotas de hidróxido de potasio 2N y se observa las una coloración roja oscura. ⁽⁷⁾
- **En la prueba de Baljet**, se utilizan dos soluciones que se mezclan en iguales volúmenes antes de utilizarse. La solución A, contiene 1g de ácido pícrico en 100 mL de etanol y solución B, 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. Para esta prueba se colocan 2-3 mg de compuesto y unas 3 a 4 gotas de reactivo, siendo positiva si se forma coloración anaranjada o roja oscura. ⁽⁷⁾

3.1.9 Separación y análisis cromatográfico

Las sesquiterpenlactonas pueden separarse y analizarse bien sea por cromatografía en columna o cromatografía en capa fina, utilizando sílica gel y eluyentes como: CHCl_3 :MeOH (9:1), cloroformo:metanol; CHCl_3 :MeOH (19:1), cloroformo:metanol; CHCl_3 :Et₂O (4:1), cloroformo:éter etílico; CHCl_3 :Et₂O (5:1), cloroformo:éter etílico; *n*-Hex:AcOEt (100:0; 0:100) *n*-hexano:acetato de etilo; Cl_2CH_2 :Me₂CO (8:2), diclorometano:acetona; Et₂O:Me₂CO (9.5:0.5), éter etílico:acetona; Cl_2CH_2 :*i*-proOH (9:1), diclorometano:isopropanol; Cl_2CH_2 :Dio (8:2), diclorometano:dioxano; Tol:Dio (8:2), tolueno:dioxano; CCl_4 :Dio (8:2), Tol:AcOEt (6:4) tolueno:acetato de etilo; entre otras. ^{(23), (26)}

Actualmente, se pueden separar y analizar mezclas de sesquiterpenlactonas en poco tiempo, por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). ⁽²³⁾

Como agentes reveladores para los análisis por cromatografía en capa fina pueden utilizarse:

Selectivos:

- **Reactivo Legal** (el reactivo revelador está constituida por: piridina, nitroprusiato de sodio 0.5% e hidróxido de sodio 2N) las lactonas insaturadas presentan una coloración rojo oscuro.
- **Reactivo Baljet** (el reactivo revelador tiene una mezcla similar en volúmenes de ácido pícrico/etanol al 95% e hidróxido de sodio al 10%) las lactonas insaturadas presentan una coloración naranjas a rojo. ⁽⁷⁾

No selectivos:

- Ácido sulfúrico concentrado y calentamiento
- Vapores de yodo.
- Luz ultravioleta a 254 nm

- permanganato de potasio al 1%. ⁽⁷⁾

3.1.10 Características espectrales

La estructura química de las sesquiterpenlactonas es elucidada a partir de datos obtenidos por espectroscopía infrarroja (IR), ultravioleta (UV-vis), espectrometría de masas (MS), rayos X y principalmente de Resonancia Magnética nuclear 1D (RMN-¹H, ¹³C, DEPT) y 2D (HMBC, HSQC, HSQC editado, HMBC, COSY y ROESY). ⁽²³⁾

En el presente estudio las características espectrales de las sesquiterpenlactonas serán analizadas por medio de espectroscopia UV-vis.

3.1.11 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS)

La espectroscopía UV-VIS permite determinar la absorción de luz en una muestra. Cuando la radiación incide sobre una sustancia, no toda ella se ve afectada por la misma, al átomo o conjunto de átomos que absorben radiación se le denominaba cromóforo. En las moléculas existen también átomos o grupos de átomos que no absorben radiación, pero hacen que se modifique alguna de las características de la absorción del cromóforo, se denominaban a tales grupos auxocromos. ⁽¹⁹⁾

La absorción de la energía se registra de 190 a 380 nm para la región ultravioleta y de 380 a 700 nm para la región visible. ⁽²⁰⁾

En contraste con las técnicas RMN e IR, las señales en el espectro UV son muy anchas debido a los múltiples cambios de estados vibracionales y rotacionales que acompañan a las transiciones electrónicas ⁽²¹⁾.

Para que se observe una absorción máxima debe existir en la molécula un cromóforo (aquellos grupos funcionales que sin unión o conjugación con otros

grupos, muestran absorción electrónica en la región del visible y ultravioleta), de esta manera la técnica permite detectar la presencia de un determinado cromóforo el cual origina prácticamente el mismo patrón espectral, independientemente de la estructura total de la molécula. ⁽²¹⁾

La absorción en el ultravioleta depende de las insaturaciones conjugadas que posee la molécula. Las sesquiterpenlactonas saturadas no absorben por encima de **200 nm**, las sesquiterpenlactonas α,β -insaturadas absorben fuertemente entre **205-225 nm** ($E= 5000-14000$). La presencia de sistemas ciclohexanona o de ciclopentanona origina máximos de absorción a **214-230 nm** ($\epsilon = 10000$) que cumplen las Reglas de Woodward. ^{(2), (3), (20), (35)}

3.2 GENERALIDADES DEL Género *Calea*

3.2.1 Género *Calea*

El género ***Calea*** pertenece a la Familia Asteracea y se encuentra extendido en casi todos los climas del mundo pero preferentemente en climas tropicales. Hasta el momento hay 291 especies pertenecientes al género ***Calea***, pero solo 148 han sido aceptados (Ver Fig. N° 8). ^{(15), (32)} Algunas de las especies pertenecientes a este género son:

- ***Calea glomerata***
- ***Calea uniflora***
- ***Calea zacatechichi***
- ***Calea ternifolia***
- ***Calea venosa***
- ***Calea granitica***
- ***Calea urticifolia***



Calea glomerata



Calea uniflora



Calea zacatechichi



Calea ternifolia



Calea venosa



Calea granitica

Fig. N° 8 Algunas especies del género *Calea*.

3.2.2 Especie *Calea urticifolia*

Familia

- Asteraceae (Compositae) ⁽²²⁾,

Sinónimos

- *Solidago urticifolia* Miller ⁽²²⁾

Nombres comunes de *Calea urticifolia*

- Juanislama (El Salvador y Ecuador); Amargón, Juanislama, **Calea**, Hoja de empacho (El Salvador); Chirivito (Hondura); Murupo, Murupo de perro (Nicaragua); Jaral de castilla, Chilchaca, Jarilla, Tacote, Hierba del negro, Negro, Negrito chichiquizo, Matacucuyuchi (México). ^{(4), (6), (10), (12), (19), (28), (29), (30), (35)}

3.2.3 Descripción botánica

Arbusto erecto de 0.6-3.5m de altura, común en diferentes zonas de El Salvador.

- **HOJAS:** simples, opuestas, de borde aserrado o crenado, de ovaladas a lanceoladas, pilosas, trinerviadas, ovaladas u oblongas, ásperas o escamosas en la haz, en general densamente pilosas en el envés, 3-14 cm de largo y 1.5-3 cm de ancho, ápice agudo a acuminado, base aguda a redondeada, en general densamente pilosas en el envés; pecíolos 2-15 mm de largo e hirsutos (Ver Fig. N° 9). ^{(4), (6), (10), (15), (16), (29), (30), (34)}



Fig. N° 9 Arbusto de *Calea urticifolia* y detalles de sus hojas.

- **TALLOS:** en general densamente pubescentes con tricomas patentes café, el tallos cortamente pilosos o hirsutos, especialmente en la parte superior (Ver Fig. N° 10). (4), (6), (15), (28), (29)

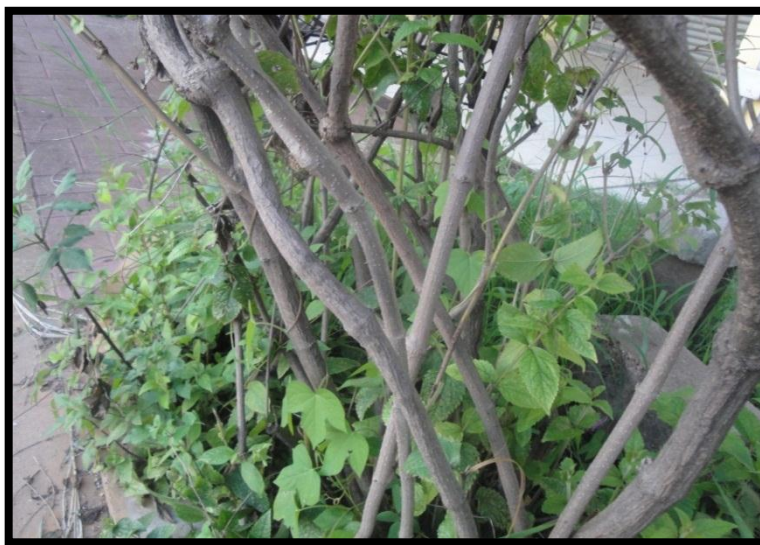


Fig. N° 10 Tallos de *Calea urticifolia*.

FLORES: amarillas reunidas en capítulos, dispuestas en inflorescencia umbeliformes, capítulos abiertos o amontonados; filarias en 4–5 series, las exteriores escabrosas y herbáceas, internas escariosas; páleas lanceoladas, flósculos del radio 3–8, fértiles, del disco 15–30, las corolas amarillas (Ver Fig. N° 11). (4), (6), (28), (30)



Fig. N° 11 Flores de *Calea urticifolia*.

- **FRUTOS:** en aquenio cilíndricos, 1.5-3 cm de largo con vilano de escamas angostas (Ver Fig. N° 12). ^{(4), (11), (28), (31)}



Fig. N° 12 Frutos de *Calea urticifolia*.

3.2.4 Distribución de *Calea urticifolia*

Está ampliamente distribuida por todo el mundo (cosmopolita), pero se encuentra mejor representada en regiones semiáridas, tropicales y subtropicales creciendo entre 0-1400 msnm. Principalmente lo podemos encontrarla desde *Panamá hasta el norte de México y Centroamérica*. ⁽¹⁸⁾

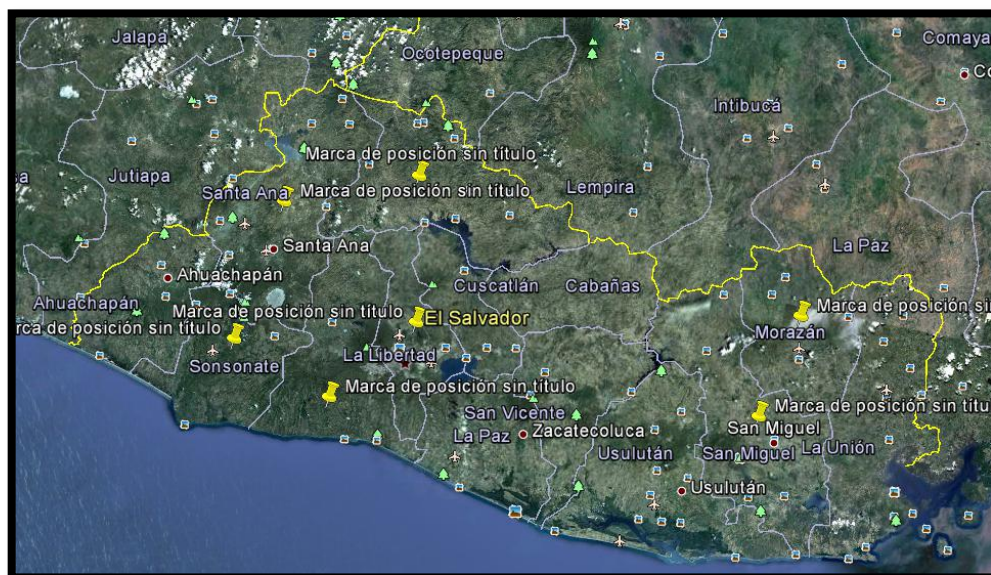
Esta planta es favorecida por el disturbio (ella es dominada por otras especies) y no presenta problemas de supervivencia. Es una planta de clima cálido y semicálido, asociada a ecosistemas de selva baja caducifolia, bosques tropicales subcaducifolio, subperenifolio, perenifolio y bosques de encino y pino. Normalmente se encuentra en terrenos abiertos y a orillas de caminos y florece de octubre a febrero. (Ver mapa N° 1). ^{(6), (28)}



Mapa. N° 1 Zona de mayor distribución de *Calea urticifolia* desde México hasta Panamá (países con pinchos amarillos). (12)

3.2.5 Distribución geográfica de *Calea urticifolia* en El Salvador

No existe una distribución específica de *Calea urticifolia* en El Salvador, pero existen reportes de colectas reportadas por botánicos expertos que laboran en el Jardín Botánico La Laguna, Antiguo Cuscatlán, La Libertad. Se han reportado, así, en Sonsonate, Santa Ana, La libertad, Chalatenango, San Salvador, Morazán y San Miguel (Ver Mapa N° 2). (11)



Mapa N°2 Distribución de *Calea urticifolia* en El Salvador presentes en los departamentos marcados con el fichero. ⁽¹¹⁾

3.2.6 Usos etnobotánicos de *Calea urticifolia*

Entre los valores autóctonos que constituyen el acervo cultural de El Salvador se encuentra ciertos comportamientos que los salvadoreños manifiestan al enfrentar distintas clases de enfermedades. Tales conductas se evidencian a través del empleo de remedios empíricos elaborados con material botánico. Esta práctica medico popular realizada por medio de la automedicación y el curanderismo y comprende variados y peculiares métodos de preparación, administración y dosificación. Entre tantas plantas medicinales por la población salvadoreña, se encuentra la famosa “Juanislama” *Calea urticifolia*, del cual existen muchas aplicaciones terapéuticas las cuales se resumen en la tabla N° 1. ⁽¹⁰⁾

Tabla N° 1 Usos etnobotánicos de *Calea urticifolia*

| | Enfermedad | Órgano vegetal utilizado | Procedimiento para la elaboración | Vía de administración | Posología |
|-------------------------------|---------------------|--------------------------|---|---|--------------------------|
| <i>Calea urticifolia</i> (10) | Artritis | Hojas secas | Cocimiento de unas 9 hojas | - Oral - Baños locales calientes y fomentos | - 3 taza/d - 3-4 al d |
| | 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 sea soportable lo amargo | - Oral | |
| | Coloradias (ácaros) | Hojas secas o frescas | Extractos de varias hojas bien deshechas porque son garrasposas | - Restregamiento | - 1-2 |
| | Diabetes | Hojas secas o frescas | Unas 7-10 hojas enteras | - Oral | - 2-3 taza/d |
| | Dismenorrea | Hojas secas o frescas | Cocimiento, usar 1 a 2 hojas | - Oral, ¡Cuidado si se toma mucho arde el estómago! | |
| | Leucorrea | Hojas secas | Cocimiento de unas 2-3 hojas por botella; no ocupar más porque es muy amarga | - Oral, cuidado | - 3-4 taza/d |
| | Mazamorra | Hojas secas o frescas | Picar unas 20 hojas sanas; agregar unos 3-5 chiles rojos y ¼ panca de sábila; mezclar con manteca de cuche o vaselina simple y freír. | - Tópico | - 1-2 veces/d |

Tabla N° 1 (continuación)

| | Enfermedad | Órgano vegetal utilizado | Procedimiento para la elaboración | Vía de administración | Posología |
|--|---|--------------------------|---|-----------------------|-----------------------------|
| <i>Calea urticifolia</i> (4), (22) | <ul style="list-style-type: none"> - Cólicos - Dolor de estomago - Ulceraciones - Heridas infectadas - Hiperacidez - Cáncer - Diabetes - Artritis - Enfermedades hepáticas y de riñones - Diarreas - Anginas - Basca - Bronquitis - Empacho | Hojas secas o frescas | 7 hojas se colocan en media botella de agua y se macera | Oral | Se toma como agua de tiempo |

3.2.7 Metabolitos secundarios aislados de *Calea urticifolia*

En las partes aéreas y tallo se han identificado alcaloides, taninos, flavonoides, monoterpenos (2-isopropil-4-metil-fenol, timol, timolisobutirato, 4,6-dimetoxi-2-isobutiroxifenol), compuestos alquénicos los cuales se identificaron de igual manera en la raíz, además de derivados bencénicos y **sesquiterpenlactonas**.

(22), (28)

3.2.8 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. Ej. IR, rayos X, RMN, entre otros.

Bohlmann y Jakupovic publicaron en 1979 el aislamiento de ocho germacranólidos, todos estos fueron elucidados por medio de diferentes técnicas espectroscópicas y se denominaron como germacranólidos 20-23 y 27-30 (Ver Fig. N°13). ⁽¹⁾

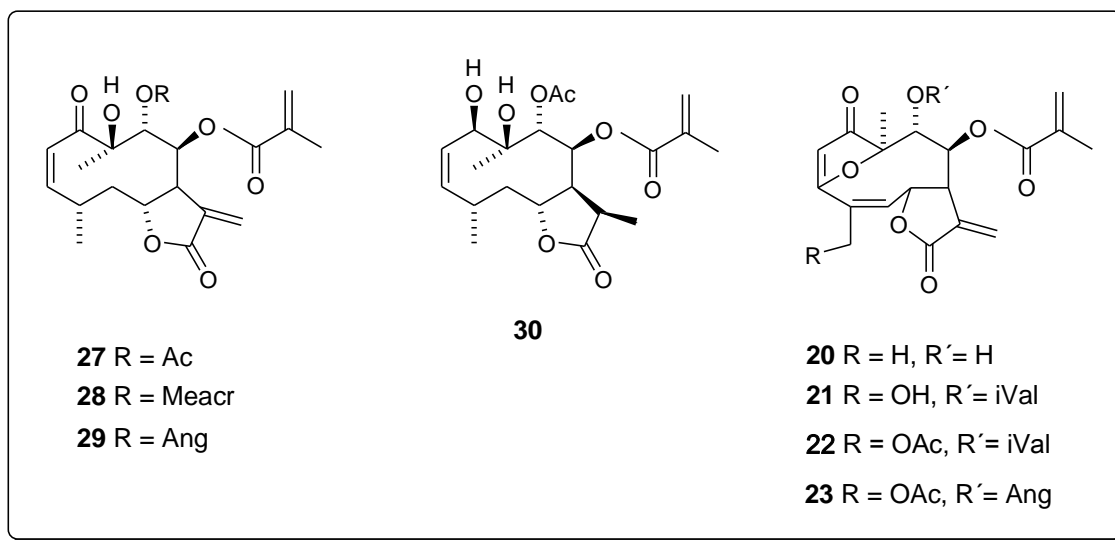


Fig. N°13 Sesquiterpenlactonas aisladas de *Calea urticifolia* por Bohlmann.

Continuando con la investigación de ***Calea urticifolia***, Werner y *colaboradores*, en 1980, aislaron ocho sesquiterpenlactonas del extracto de las partes aéreas denominadas como: 2f, 2g, 2h, 4a, 4b, 4c, 4d y 4e (Ver Fig. N° 14). ⁽¹³⁾

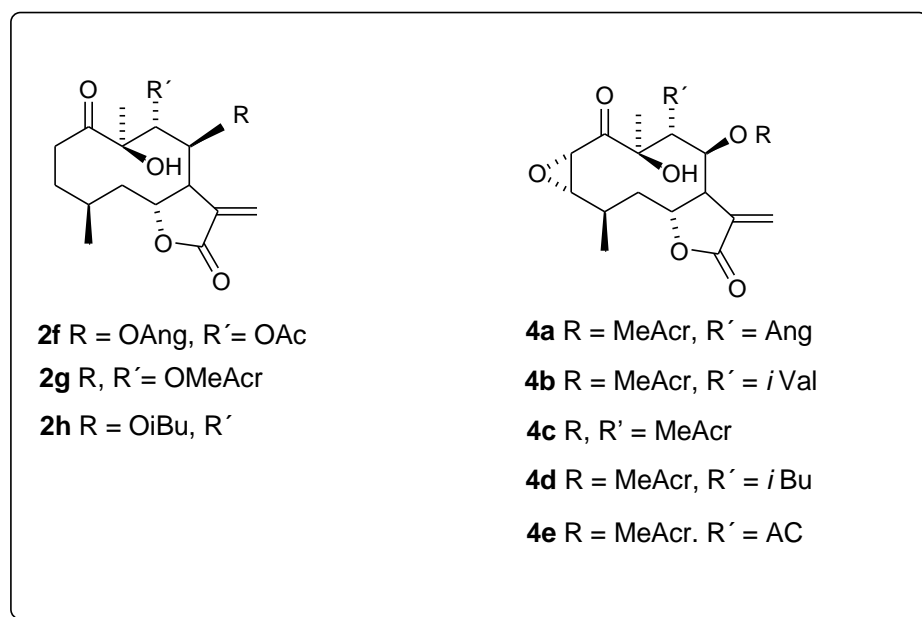


Fig. N° 14 Sesquiterpenlactonas aisladas de ***Calea urticifolia*** por Werner.

En El Salvador Genovez y *colaboradores*, aislaron y elucidaron 4 germacranólidos (Juanislamina, 2,3-epoxijuanislamina, Caleína D y 2,3-epoxicaleína D) de las hojas de ***Calea urticifolia*** (Ver Fig. 15). ⁽¹⁸⁾

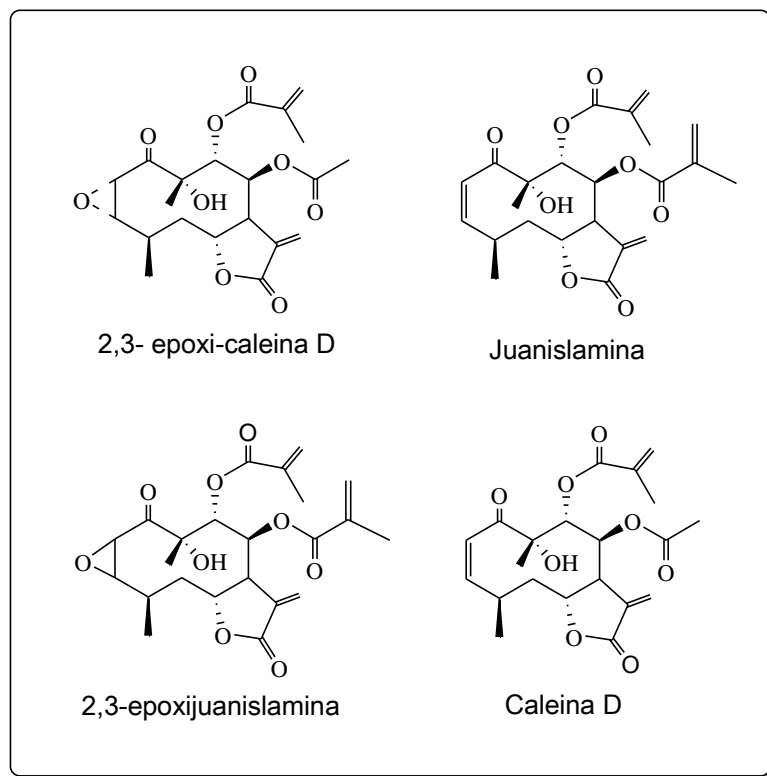


Fig. N° 15 Sesquiterpenlactonas procedentes de las hojas de *Calea urticifolia*

En 1981, Borges del Castillo y *colaboradores*, aislaron y elucidaron de las hojas de *Calea urticifolia* dos sesquiterpenlactonas las cuales se identificaron por medio de RMN de ^1H y ^{13}C , y se les denominaron Caleina D y 2,3-epoxi-caleina D (Ver Fig. 15). ⁽²⁾

Del extracto acetónico de las partes aéreas de *Calea urticifolia*, recolectada en El Salvador, se obtuvieron seis sesquiterpenlactonas: Arucanólido, Calealactona A, 2,3-epoxi-calealactona A, Calealactona B, 2,3-epoxijuanislamina y Partenolida. Ver Fig. N° 15 y 16. ⁽²⁵⁾

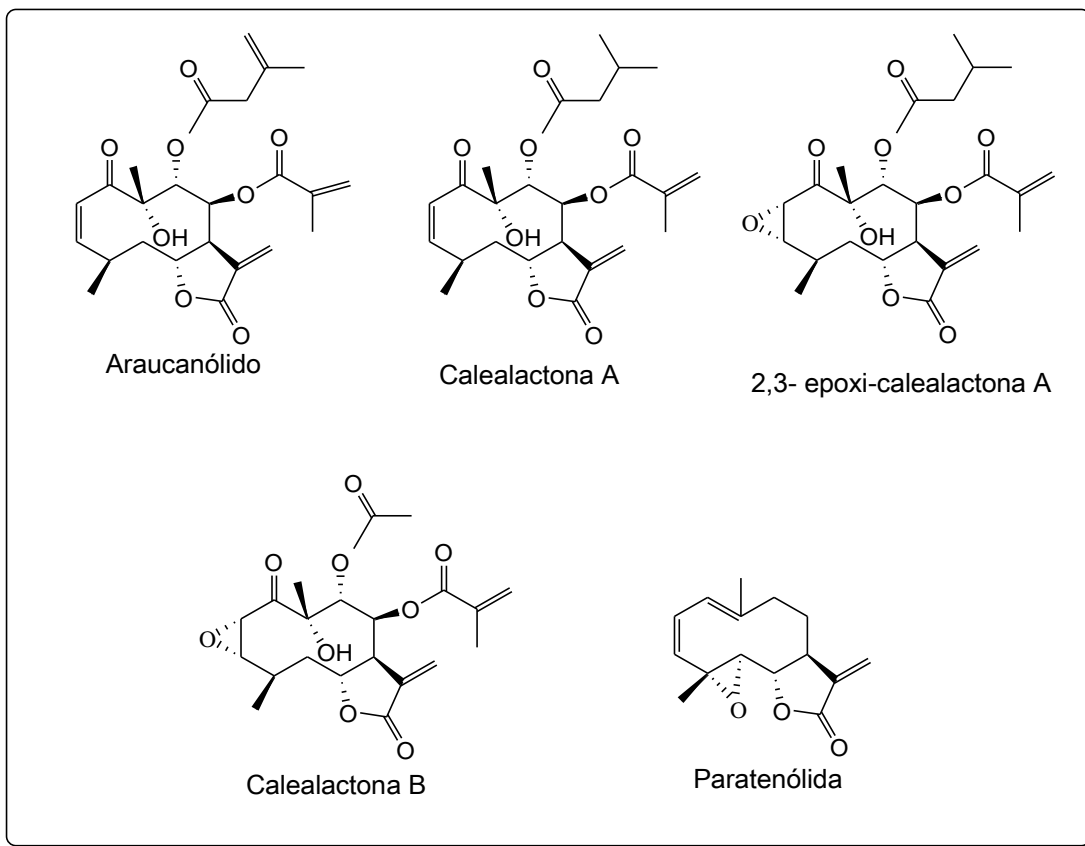


Fig. N° 16 Sesquiterpenlactonas aisladas por Nakagawa a partir de las partes aéreas de *Calea urticifolia*

En 2004, Yamada y *colaboradores*, aislaron del extracto acetónico de las hojas *Calea urticifolia* colectadas en El Salvador siete sesquiterpenlactonas denominadas como: Calealactona A-C, 2,3-epoxi-calealactona A, Caleina D, Juanislamina y 2,3-epoxijuanislamina, las cuales se identificaron por medio de RMN 2D y espectrofotometría de masas (Ver Fig. N° 15 y 16). ⁽³⁵⁾

Siguiendo con los estudios de ***Calea urticifolia***, Matsuura y colaboradores, en 2005 aislaron siete sesquiterpenlactonas de sus partes aéreas, las cuales al elucidarlas con diferentes técnicas analíticas resultaron ser Calealactona A, Calealactona B, Calealactona C, 2,3-epoxicalcalactona A, Caleina D, Juanislamina y 2,3-epoxijuanislamina (Ver Fig. N° 15 y 16). ⁽²⁴⁾

En 2008, se investigó el extracto acetónico de ***Calea urticifolia*** y de *Ambrosia cumanensis* colectadas ambas en El Salvador, aislaron seis sesquiterpenlactonas; cinco de estas procedían de ***C. urticifolia*** (Arucanólido, Calealactona A, 2,3-epoxi-calcalactona A, Calealactona B y 2,3-epoxijuanislamina) y una se aisló de *A. cumanensis* (partenolida). Todas las sesquiterpenlactonas del tipo de germacranólidos (Ver Fig. N° 15 y 16). ⁽³³⁾

Recientemente, se aislaron de las hojas de ***Calea urticifolia***, cinco sesquiterpenlactonas (Calealactona B, Arucanólido, 2,3-epoxi-juanislamina, 2,3-epoxi-calcalactona A, y Calealactona A) anteriormente descritas. Ver Fig. N° 15 y 16. ⁽²⁷⁾

3.2.9 Actividades biológicas de *Calea urticifolia*

Actividad citotóxica

La actividad citotóxica es 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 *Calea 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 μM ., utilizando como control positivo el partenolida 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 Fig. N° 19). ⁽³⁵⁾

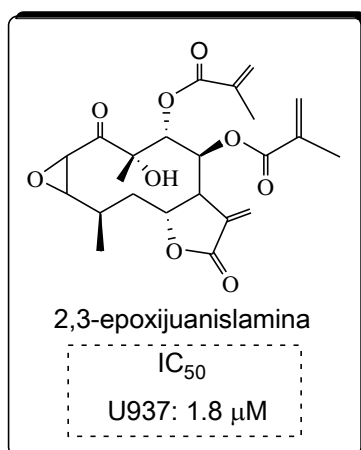


Fig. N° 17 Sesquiterpenlactona más activa evaluada frente a células U937.

Además, Nakagawa y *colaboradores*, en 2005 obtuvieron del extracto acetónico de las partes aéreas de ***Calea urticifolia***, 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, Araucanólido ejerció un efecto citotóxico marcado a menos de 10 μM frente a ambas líneas celulares y su actividad citotóxica fue mayor que partenolida utilizada como control positivo (Ver Fig. N° 18). 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*). ⁽²⁵⁾

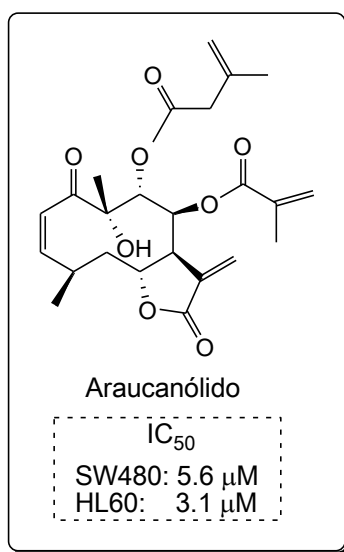


Fig. N° 18 Metabolito más activo como citotóxico aislado por Nakagawa y *col.* de ***Calea urticifolia***

Se aislaron de las hojas de *Calea 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 μ M 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 1 μ M (Ver Fig. N° 20). ⁽²⁴⁾

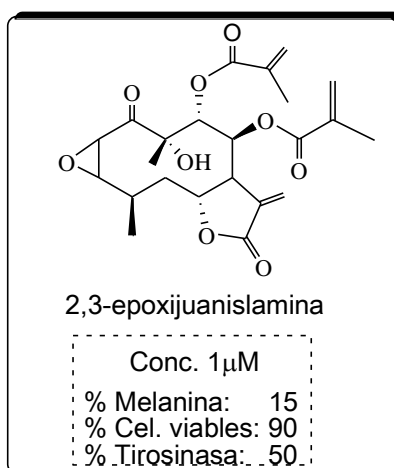


Fig. N° 19 Sesquiterpenlactona más activa evaluada frente a células B16.

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 *Calea urticifolia*, evaluándose su actividad antioxidante en la ruta Nrf2/ARE (Elemento Responsable Antioxidante). Se midió la actividad de 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 ⁽³³⁾

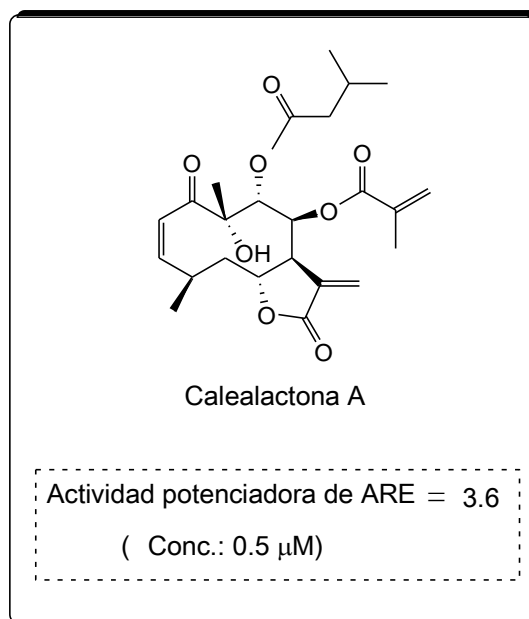


Fig. N° 20 Sesquiterpenlactona de *Calea urticifolia* con una mayor actividad potenciadora de ARE.

Actividad antiadipogénesis

Las enfermedades relacionadas con la obesidad son hoy en día un problema de salud muy grave a nivel mundial. Por todo esto Nobuyasu y colaboradores, aislaron del extracto etanólico de las partes aéreas de *Calea urticifolia* siete sesquiterpenlactonas, las cuales fueron evaluadas frente a la inhibición de la adipogénesis a concentraciones entre 1.25-5 μM , resultando ser la más activa la Calealactona B, con valores de inhibición de lípidos de CME de 1.25 μM y IC_{50} de 7.0 μM , 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 germacrólidos son inhibidores específicos de diferenciación de preadipocitos. ⁽²⁴⁾

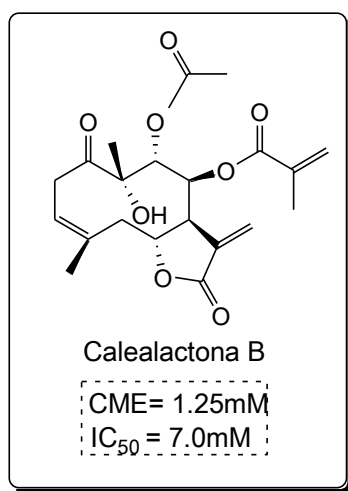


Fig. N° 21 Sesquiterpenlactona más activa frente a la inhibición de adipogénesis.

Actividad hipoglucemiante e hipolipemiante

Dos grandes problemas de actualidad son la *diabetes* y *las enfermedades relacionadas a la obesidad*, las cuales generan un gasto gigantesco a los gobiernos y peor aún, pérdidas humanas. Recientemente se administraron una vez día por 6 meses, macerados etanólicos de la hojas de ***Calea urticifolia***, a ratones de experimentación y fueron analizados los parámetros bioquímicos por métodos enzimáticos colorimétricos. Así, el extracto etanólico de ***Calea urticifolia***, mostro efecto *hipoglucemiante*, *hipolipemiante* y *antiinflamatorio* en el proceso inflamatorio derivado del tejido adiposo, a través de la inhibición de la secreción de TNF- α . 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 β pancreática. ⁽²⁸⁾

Actividad antiparasitario

Los parásitos son un serio problema de mortalidad principalmente infantil en los países en vía de desarrollo. Recientemente se investigó el extracto acuoso de las hojas y raíz de ***Calea urticifolia***, evaluándolos a diferentes concentraciones (blanco, 50% y 100%) y diferentes tiempos de exposición del extracto (0, 24, 48 y 72 horas) frente al nematodo ***Meloidogyne incognita*** (nematodo de las agallas), es una especie de nematodos que constituyen una importante y abundante plaga en la mayoría de los cultivos. El efecto que presentaron los extractos de diferentes partes de la ***Calea 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. ⁽¹²⁾

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

La presente investigación se catalogó como un estudio *experimental* y *exploratorio*, debido a que en el país no se han abordado problemáticas, enfocadas a la cuantificación de principios activos de la especie vegetal ***Calea urticifolia*** y cuyo fin es determinar en qué periodo de los meses de enero a junio de 2012 hay una mayor producción de sesquiterpenlactonas en dicha especie vegetal.

4.2 Investigación bibliográfica

- Se realizaron consultas en revistas científicas, libros, trabajos de graduación, etc.
- Biblioteca “Dr. Benjamín Orozco” de la Facultad de Química y Farmacia, Biblioteca Central y Biblioteca de la Facultad de Biología de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer.
- Internet.
- Publicaciones científicas proporcionadas por los docentes directores.

4.3 Investigación de campo

4.3.1 Identificación del material vegetal

Previo a la recolección se presentó una muestra de la especie vegetal en el Herbario del Jardín Botánico de La Laguna, para su identificación por un botánico experto.

4.3.2 Recolección del material vegetal

La recolección de las hojas se realizó dos veces por mes en el Campus Central de la Universidad de El Salvador, a un costado del parqueo de la Facultad de Química y Farmacia, durante los meses de enero a junio de 2012.

A cada una de las 11 colectas se le asignó un código, el cual se muestra en la siguiente tabla:

Tabla. N° 2 Códigos asignados a cada colecta realizada.

| Fecha de Colecta | Muestras |
|------------------|----------|
| 17 de enero | 17-01 |
| 2 de febrero | 02-02 |
| 15 de febrero | 15-02 |
| 1 de marzo | 01-03 |
| 15 de marzo | 15-03 |
| 30 de marzo | 30-03 |
| 15 de abril | 15-04 |
| 2 de mayo | 02-05 |
| 15 de mayo | 15-05 |
| 1 de junio | 01-06 |
| 15 de junio | 15-06 |

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, para posteriormente ser secadas a la claridad (con luz natural). Después de 15 días, el material vegetal fue molido y luego almacenado en un lugar fresco y seco con su debida identificación de fecha de recolección y código.

4.4.2 Obtención de extracto seco clorofórmico de *Calea urticifolia*

La obtención de extractos se llevó a cabo a partir de las hojas secas y molidas de *C. urticifolia*. Las muestras vegetales secas y molidas se pesaron cada una y luego se extrajeron las sesquiterpenlactonas por medio del aparato Soxhlet hasta agotamiento de la muestra usando como solvente, cloroformo. Posteriormente se eliminó el solvente por medio del rotaevaporador obteniendo así los extractos secos.

4.4.3 Identificación de las sesquiterpenlactonas en el extracto clorofórmico por cromatografía en capa fina.

Para llevar a cabo esta cromatografía en capa fina, se tiene que realizar bajo las condiciones que se muestran en la tabla N° 5.

Tabla N° 3 Condiciones para realizar la cromatografía de capa fina

| | |
|--------------------------|---|
| Fase estacionaria | Sílica gel POLYGRAM®SILG/UV 254 |
| Muestra | Extractos clorofórmicos de <i>C. urticifolia</i> de las diferentes colectas (11 colectas) |
| Marcadores | Sesquiterpenlactonas puras |
| Revelador | Reactivo de Baljet |
| Evidencia | Manchas color naranja |

Se desarrolló la cromatografía de las 11 muestras en placas de cromatografía de capa fina (gel de sílice 20 x 10 cm de 0.25 mm de espesor), para lo cual se ensayaron diferentes fases móviles, con el objeto de encontrar la que desarrollara un mejor perfil cromatográfico. Luego de realizar la elución, se roció la placa con el reactivo revelador de Baljet. Las muestras fueron comparadas con tres marcadores ⁽⁸⁾, obtenidas previamente de *Calea urticifolia* en el

proyecto del PCI/AECID 2011 ⁽²⁶⁾, determinándose además el R_f de cada mancha revelada.

Preparación del reactivo revelador de Baljet

- **Sol. A:** 1.0 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol al 95%.
- **Sol. B:** 10.0 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua.

4.4.4 Identificación por espectroscopía ultravioleta de las sesquiterpenlactonas de *Calea urticifolia*

- Preparar una dilución del extracto seco en alcohol etílico adsoluto.
- Leer en espectrofotómetro UV-Vis.

4.4.5 Cuantificación de sesquiterpenlactonas mediante espectroscopía visible.

- Pesar y disolver la muestra (extracto seco) en alcohol etílico absoluto y llevar con el mismo solvente hasta 50.0 mL.
- Diluir 5.0 mL de la solución anterior a 100.0 mL con alcohol etílico absoluto.
- Preparar una solución de referencia de igual manera, usando un marcador analítico (estándar de trabajo).⁽⁸⁾
- A 5.0 mL de cada solución agregar 3.0 mL de solución alcalina de picrato de sodio.
- Usando como blanco una mezcla de 5.0 mL de alcohol etílico absoluto y 3.0 mL de solución alcalina de picrato de sodio preparada al mismo tiempo. ^{(9), (26)}

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

$$C_{mx} = \frac{(C_{st})(A_{mx})}{A_{st}} FD$$

C_{mx} = Concentración de muestra

C_{st} = Concentración del estándar

A_{st} = Absorbancia de estándar

A_{mx} = Absorbancia de muestra

FD = Factor de dilución

4.4.6 Diseño estadístico

Los resultados se analizaron, utilizando la desviación típica estándar, intervalos de confianza al 95%.

4.4.6.1 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. En nuestros cálculos solo fue útil para obtener el intervalo de confianza.

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

Dónde:

S = Desviación típica estándar.

X_i = Muestra individual.

\bar{X} = Promedio de muestras.

n = Numero de muestras.

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

4.4.6.2 Intervalo de confianza

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 mostrará que tan confiable son los resultados ya que se hicieron por quintuplicado.

$$IC(\mu) = \bar{X} \pm t_{n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Dónde:

IC (μ) = intervalo de confianza.

\bar{X} = Promedio de muestras.

t = *t* de student.

n-1 = Grados de libertad.

S = Desviación típica estándar.

n = número de muestras

4.4.7 Parte experimental

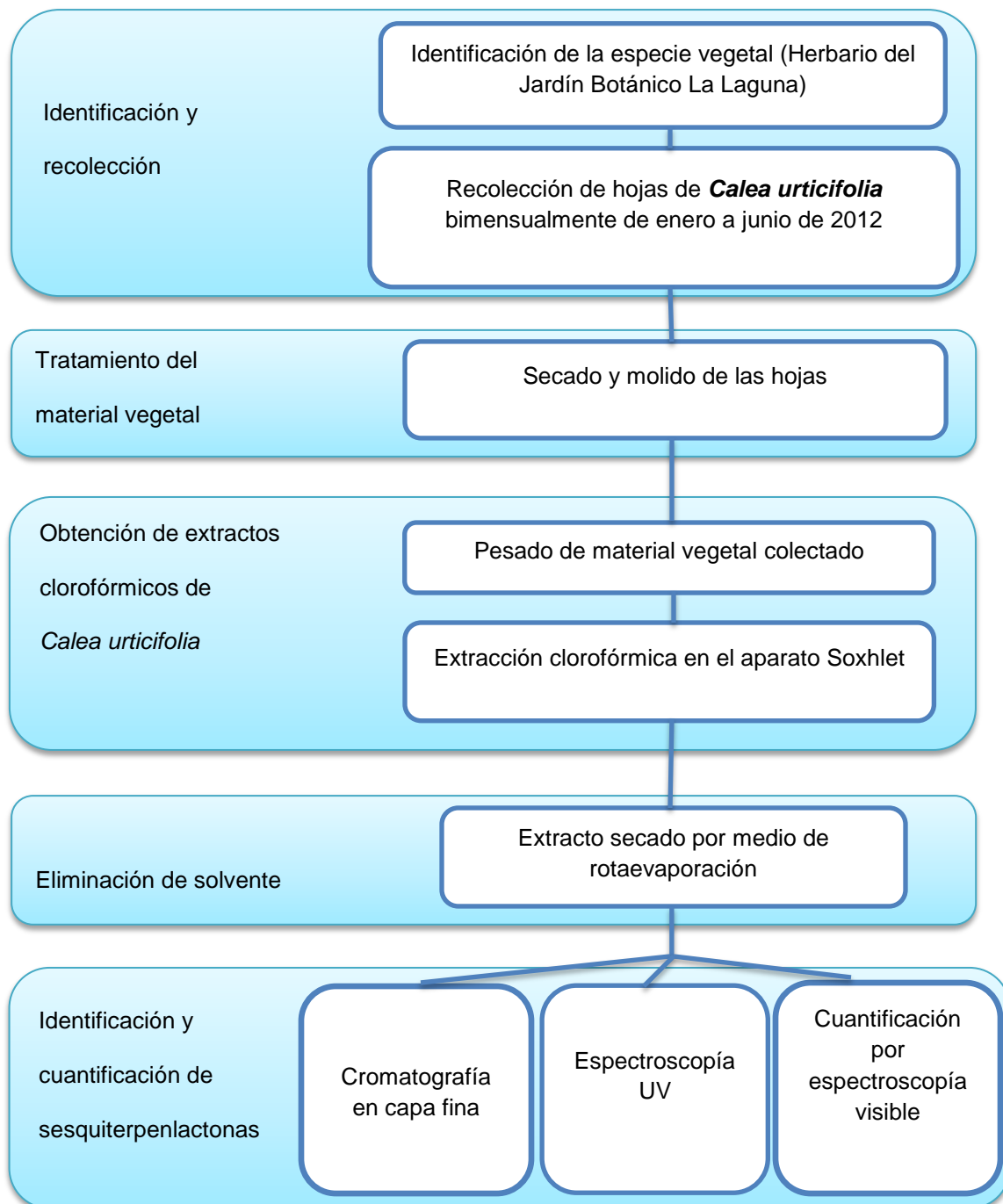


Fig. N° 22 Procedimiento experimental desarrollado

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Identificación de la especie vegetal

La muestra vegetal fue analizada por el botánico experto del Jardín Botánico La Laguna, el cual extendió una carta confirmando que la muestra presentada era ***Calea urticifolia*** “Juanislama”. (Ver anexo N° 4)

5.2 Recolección y preparación del material vegetal

Como anteriormente se describió, las hojas de ***C. urticifolia***, fueron colectadas dos veces por mes y secadas a la claridad (Ver Fig. N° 23), luego se asignó a cada una un código y fecha de recolección.



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

5.3 Preparación del extracto clorofórmico seco

Se realizó la extracción de las sesquiterpenlactonas a partir de las hojas colectadas de *C. urticifolia* previamente pesadas, mediante un aparato soxhlet; utilizando como solvente de extracción, el cloroformo; el cloroformo posteriormente fue eliminado mediante un rotaevaporador para obtener el extracto seco. (Ver Fig. N° 24)



a) Aparato Soxhlet



b) Rotaevaporador



c) Extractos secos de *Calea urticifolia*

Fig. N° 24 Proceso de obtención del extracto seco de *Calea urticifolia*

5.4 Resultados del análisis por cromatografía en capa fina

Cuando se realizó la cromatografía en capa fina, previo a encontrar la fase móvil que desarrollara el mejor perfil cromatográfico, se evaluaron varias de

estas hasta llegar a la más idónea, la cual debe poseer un R_f en torno a 0.5 y a demás presentar separación de las manchas. ⁽¹⁶⁾

Algunas de las fases móviles ensayadas se muestran en la tabla siguiente:

Tabla N° 4 Fases móviles ensayadas en la cromatografía en capa fina.

| | |
|---|---|
| Cloroformo-Metanol (9:1) | <i>n</i> -hexano-Diclorometano (1:1) |
| <i>n</i> -hexano-Acetato de Etilo (7:3) | <i>n</i> -hexano-Tolueno (1:1) |
| Tolueno-Dioxano (8:2) | Benceno-Acetato de Etilo (1:1) |
| Tolueno-Acetato de Etilo (6:4) | Éter etílico-Cloroformo (2:8) |
| Cloroformo-Metanol (19:1) | <i>n</i> -hexano-isopropanol (1:1) |
| Cloroformo -Éter etílico (4:1) | Benceno-Diclorometano (7:3) |
| Cloroformo -Éter etílico (5:1) | <i>n</i> -hexano-Dioxano (1:1) |
| Diclorometano-Acetona (8:2) | Cloroformo-Éter etílico (8.5:1.5) |
| <i>n</i> -hexano-Cloroformo (1:1) | <i>n</i> -hexano-Acetato de etilo (1:1) |
| <i>n</i> -hexano-Acetato de Etilo (1:1) | <i>n</i> -hexano-Éter etílico (7:3) |

Al momento de eluir y revelar la placa cromatográfica, se identificó la presencia de las sesquiterpenlactonas, esto debido a la manifestación de manchas color naranja similar al presentado por los marcadores. (Ver Fig. N° 25 y Tabla N° 5)

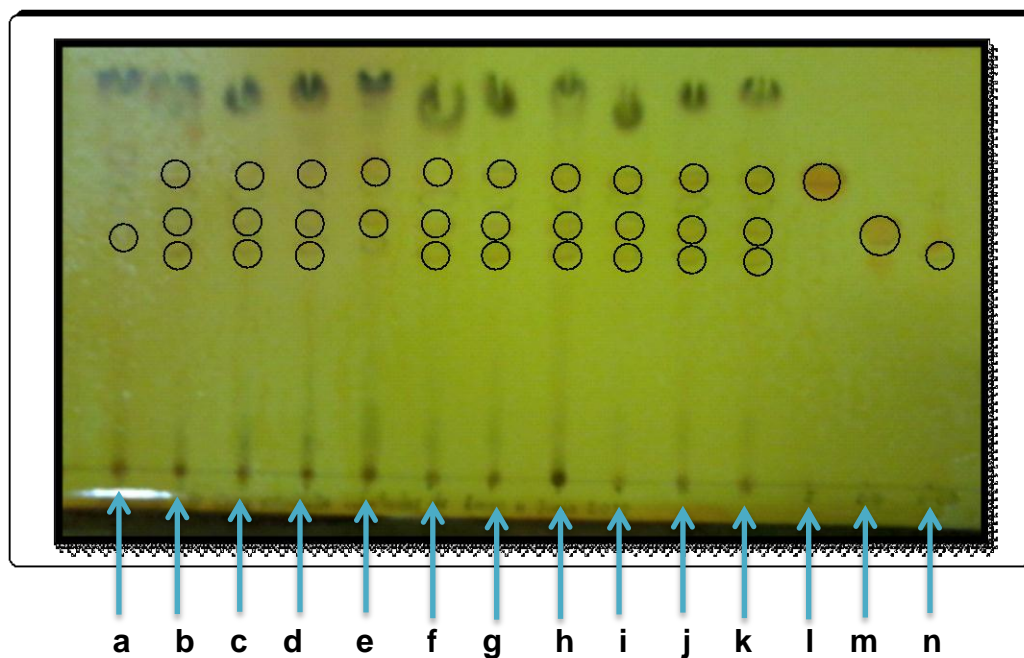


Fig. N° 25 Cromatografía de capa fina de *C. urticifolia* y sus marcadores.

Tabla N° 5 Código de colecta y letra respectiva para la identificación en la placa cromatográfica.

| | |
|-----------------|----------------------|
| a. 17-01 | h. 02-05 |
| b. 02-02 | i. 15-05 |
| c. 15-02 | j. 01- 06 |
| d. 01-03 | k. 15- 06 |
| e. 15-03 | l. Marcador 1 |
| f. 30-03 | m. Marcador 2 |
| g. 15-04 | n. Marcador 3 |

Las manchas naranjas que aparecen en la cromatografía en capa fina, evidencian la presencia de lactonas α,β -insaturadas; que forman parte de la estructura química de las sesquiterpenlactonas.

Luego de la identificación de las sesquiterpenlactonas, se procedió a obtener los R_f de las distintas manchas eluidas. (Ver Tabla N° 7)

Tabla N° 6 R_f obtenidos de la cromatografía en capa fina de todas las machas reveladas

| Muestra | R_f de la mancha | Muestra | R_f de la mancha |
|----------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| 17-01 | 0.56 | 02-05 | 0.54 |
| | | | 0.58 |
| | | | 0.72 |
| 02-02 | 0.48 0.58 0.72 | 15-05 | 0.54 |
| | | | 0.58 |
| | | | 0.72 |
| 15-02 | 0.48 0.58 0.72 | 01-06 | 0.54 |
| | | | 0.58 |
| | | | 0.72 |
| 01-03 | 0.48 0.58 0.72 | 15-06 | 0.54 |
| | | | 0.58 |
| | | | 0.72 |
| 15-03 | 0.58 0.72 | Marcador 1 | 0.72 |
| | | | |
| 30-03 | 0.54 | Marcador 2 | 0.58 |
| 15-04 | 0.54 0.58 0.72 | Marcador 3 | 0.54 |
| | | | |
| | | | |

Frente del solvente: 8.9 cm

Se apreciaron de 1 a 3 manchas que poseen sesquiterpenlactonas en las muestras inyectada; pudiéndose pensar que muchas de estas son sesquiterpenlactonas puras debido a que presentan R_f similares o idénticos a los marcadores. Además, se observaron manchas las cuales poseían un R_f

diferentes a los marcadores; con esto se concluye, que existen otras sesquiterpenlactonas diferente en los extractos eluidos, a las previamente identificadas.

5.5 Resultados de la identificación de las sesquiterpenlactonas por espectroscopía ultravioleta.

Se obtuvieron los espectros UV para la identificación de las lactonas α,β -insaturadas de las sesquiterpenlactonas. Como se puede apreciar en la Fig. N° 26

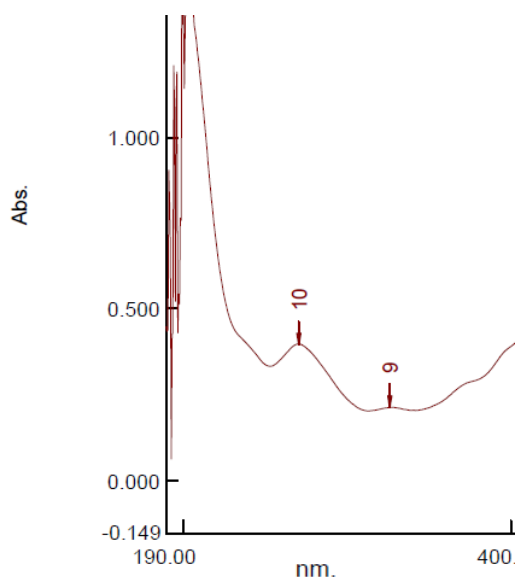


Fig. N° 26 Espectro ultravioleta de la colecta 15-03.

5.6 Resultados de la cuantificación de sesquiterpenlactonas

En la tabla N° 7 podemos apreciar las diferentes absorbancias obtenidas de cada una de los extractos secos, y se llevó a cabo la lectura en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (Shimadzu UV-1880), además se presenta los factores de dilución.

Tabla N° 7 Absorbancias, peso y factor de dilución de las muestras de *Calea urticifolia*

| | | Muestra 17/ Enero (17-01) | Muestra 2/ Febrero (02-02) | Muestra 15/ Febrero (15-02) | Muestra 1/ Marzo (01-03) | Muestra 15/ Marzo (15-03) | Muestra 30/ Marzo (30-03) | Muestra 15/ Abril (15-04) | Muestra 2/ Mayo (02-05) | Muestra 15/ Mayo (15-05) | Muestra 1/ Junio (01-06) | Muestra 15/ Junio (15-06) |
|------------------------------|---|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Vis Absorbancia 495 nm | 1 | 0.412 | 0.462 | 0.507 | 0.607 | 0.568 | 0.601 | 0.560 | 0.612 | 0.694 | 0.587 | 0.631 |
| | 2 | 0.410 | 0.539 | 0.494 | 0.537 | 0.600 | 0.594 | 0.584 | 0.584 | 0.670 | 0.586 | 0.614 |
| | 3 | 0.429 | 0.474 | 0.644 | 0.556 | 0.575 | 0.571 | 0.593 | 0.802 | 0.570 | 0.586 | 0.618 |
| | 4 | 0.423 | 0.445 | 0.669 | 0.561 | 0.545 | 0.573 | 0.570 | 0.640 | 0.674 | 0.528 | 0.589 |
| | 5 | 0.485 | 0.447 | 0.631 | 0.511 | 0.514 | 0.563 | 0.633 | 0.632 | 0.683 | 0.532 | 0.622 |
| Factor de Dilución | | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 10 | 10 | 10 | 10 |

En la siguiente tabla se aprecian los contenidos de sesquiterpenlactonas presentes en cada una de las muestras de análisis, los resultados se obtuvieron en mg de sesquiterpenlactonas.

Tabla N° 8 Contenido de las sesquiterpenlactonas presentes en las muestras expresados como Juanislamina, promedios, desviaciones estándar, e intervalo de confianza 95%.

| | Muestra 17-01 | Muestra 02-02 | Muestra 15-02 | Muestra 01-03 | Muestra 15-03 | Muestra 30-03 | Muestra 15-04 | Muestra 02-05 | Muestra 15-05 | Muestra 01-06 | Muestra 15-06 |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Concentración | 26.396 | 28.939 | 36.006 | 33.891 | 34.258 | 35.480 | 35.945 | 19.990 | 20.118 | 17.233 | 18.792 |
| DEV: STD | 1.880 | 2.355 | 5.017 | 2.161 | 1.988 | 0.993 | 1.722 | 2.614 | 1.533 | 0.944 | 0.481 |
| n | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 95% IC | 2.334 | 2.924 | 6.229 | 2.683 | 2.468 | 1.233 | 2.138 | 3.245 | 1.904 | 1.172 | 0.597 |

× **95% IC** = Intervalo de confianza al 95%

× **DEV STD** = Desviación estándar

En la tabla N° 8, se podría interpretar que la colecta del 15 de febrero (15-02) es el momento donde la especie vegetal produce mayor cantidad de sesquiterpenlactonas, pero para obtener este dato se debe de calcular con respecto al peso total de hojas colectadas en cada periodo, que se mostrara a continuación.

5.6.1 Cantidad de sesquiterpenlactonas presentes en el total de hojas colectadas

En la tabla N° 9 presentamos los datos experimentales que permitieron obtener la cantidad de sesquiterpenlactonas en el total de material vegetal colectado en cada muestra.

Tabla N° 9 Datos para calcular la cantidad total de sesquiterpenlactonas en toda la muestra colectada

| Código | Cantidad de sesquiterpenlactonas en mg |
|---------------|---|
| 17-01 | 26.396 |
| 02-02 | 28.939 |
| 15-02 | 36.006 |
| 01-03 | 33.891 |
| 15-03 | 34.258 |
| 30-03 | 35.480 |
| 15-04 | 35.945 |
| 02-05 | 19.990 |
| 15-05 | 20.118 |
| 01-06 | 17.233 |
| 15-06 | 18.792 |

Podemos observar en el gráfico los valores de la tabla N° 12 representados en la Fig. N° 27.

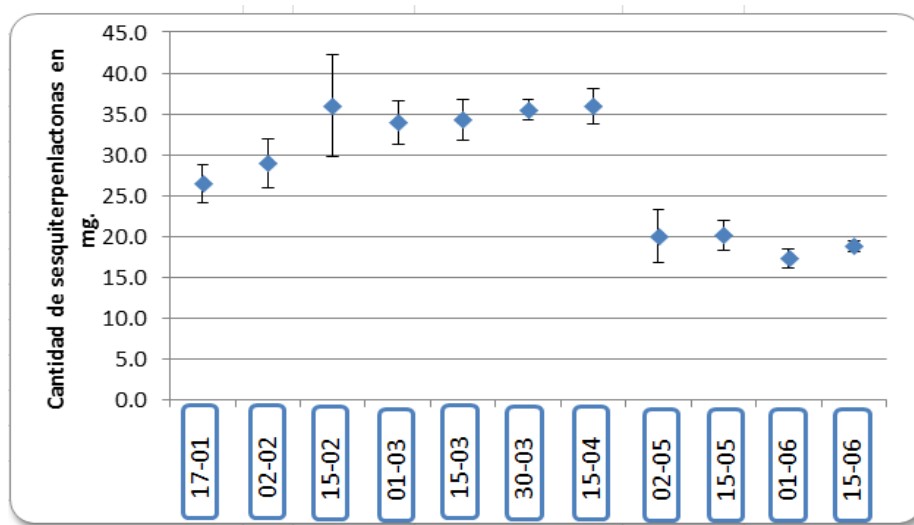


Fig. N° 27 Cantidad de sesquiterpenlactonas presente en el total de cada extracto seco obtenido.

En la Fig. N° 27, observamos gráficamente las cantidades de sesquiterpenlactonas en miligramos para una mejor interpretación.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

- 1) Después del análisis de un botánico experto, la especie vegetal en estudio era en efecto ***Calea urticifolia***; la identificación del material vegetal es de gran importancia para las investigaciones donde se trabaje con planta ya que la hace más confiable.

- 1) Se comprobó la similitud en el perfil cromatográfico, entre varias de las sesquiterpenlactonas presentes en las 11 muestras recolectadas de ***C. urticifolia*** y los marcadores; a través del cálculo del R_f . Además se identificaron otras diferentes a estas.

- 2) El cloroformo resultó ser un solvente selectivo para las sesquiterpenlactonas.

- 3) Se identificaron las sesquiterpenlactonas en los extractos de ***Calea urticifolia*** a través de espectroscopia ultravioleta, obteniendo longitudes de onda máxima, lo cual es característico para ellas.

- 4) Se evidenció la presencia de sesquiterpenlactonas por la cromatografía en capa fina utilizando su respectivo revelador.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

- 2) Realizar una cuantificación e identificación de las sesquiterpenlactonas presentes en ***Calea urticifolia*** por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para una comparación del método espectroscópico UV-Vis y validar este método contrastado con el de HPLC.
- 3) Aislar y elucidar la estructura de las sesquiterpenlactonas con un R_f diferente a los marcadores.
- 4) Completar la cuantificación de sesquiterpenlactonas en el periodo de julio-diciembre, para tener una perspectiva más completa de cómo se comporta la producción de sesquiterpenlactonas en todo el año.
- 5) Realizar cuantificaciones de sesquiterpenlactonas de ***C. urticifolia*** en otras zonas geográficas del país donde se localice; para establecer si la producción de estos metabolitos varía según la zona.

BIBLIOGRAFIA

1. Bohlmann, F. y Jakupovic, J. Neue germacranolide aus ***Calea urticifolia***. *Phytochemistry*. 1978; 18: 119-123.
2. Borges del Castillo, J., Ferrero, M. T. M., Luis F. R., Bueno. P. R., Leonor N. L. y Arevalo S. C. Salvadorian compositae. II. Juanislamin and lactones from ***Calea urticifolia*** 2,3-epoxy-juanislamin, two new sesquiterpenic lactones from ***Calea urticifolia***. *J. Nat. Prod.* 1981; 44: 348-350.
3. Borges del Castillo, J., Ferrero, M. T. M., Luis F. R., Bueno. P. R., Leonor N. L. y Portillo de Rivas R. M. Compuestas salvadoreñas I. caleina D y 2,3-epoxicaleina D, dos germacranólidos de la ***Calea urticifolia***. *Anales de Química*. 1980; 77: 1980-1982.
4. Gallego C. I., Meléndez D. I. y Pérez G. E. 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, 2000, Pág. 4.
5. Dewick, P. M. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. Third Edition, John Wiley & Sons, Ltd. USA. 2009 Pág. 210-213.
6. Diversidad Vegetal-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE) Core eudicotiledóneas asterídeas euasterídeas II:

7. Asterales: Asteraceae (=Compositae) [Fecha de acceso 24 de Marzo de 2012] Disponible en:
<http://exa.unne.edu.ar/biologia/diversidadv/documentos/ANGIOSPERMAS/Asterideas/Euasterideas%20II%20o%20Campanulideas/Asterales/3-Asteraceae.pdf>
8. Domínguez X. A., Métodos de investigación fitoquímica, México, Editorial Limusa.1973. Pág. 93-109.
9. EMEA (European Medicine Agency Inspection). 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). 2007.
10. Farmacopea ufficiale della repubblica Italiana. Ottava edizione. Roma, Italia. Istituto Poligrafico dello stato P.V. II Volume, 390-393, 1972.
11. González Ayala, J. C. Botánica medicinal popular, El Salvador, Centroamérica, CUSCATLANIA, Diciembre 2002 Pág. 32,39, 42, 47, 52, 64, 67, 72, 98, 123. (2ª Edición).
12. Jardín Botánico La Laguna, Sección Herbario Jardín Botánico la Laguna, Herbario LAGU, Antiguo Cuscatlán, La Libertad, El Salvador.
13. Herrera-Parra E., Cristóbal-Alejo J., Tún-Suárez J. M., Gamboa-Angulo y Marbán-Mendoza N. Extractos acuosos de *Calea urticifolia* para el control de *Meloidogyne incognita*. *Nematrópica* 2009; 39: 289-296

14. Herz W. y Kumar N. Sesquiterpene lactones of ***Calea zacatechichi*** and ***Calea urticifolia***. *Phytochemistry*. 1979; 19: 593-597.
15. Jan-Willem K., Maurice C. R. F., Maaiké J., Aede G., y Harro J. B. Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. Demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory. *Plant Physiology*. 2002; 129: 257-268.
16. Jhont P. F. Compositae of the guayana highland-XIV. Four new species of *Calea* (neurolaeneae) from tepui summits in Venezuela. Missouri Botanical Garden. *Phytoneuron*. 2011; 52: 1-9. Published 14 Oct 2011.
17. Kuklinski C.; Farmacognosia: Métodos generales de obtención de los principios activos. Barcelona, España: Ediciones Omega, S.A; 2003. Pág. 32-41.
18. Lagos, J. A. Compendio de botánica sistemática. Tercera edición. Dirección de Publicación e Impresos del Ministerio de Cultura y Comunicaciones. San Salvador, El Salvador. 1987. Pág. 79, 81, 95.
19. Leonor Genovez. A. N. Estudio inicial de cuatro germacranólidos de la ***Calea urticifolia***, [Trabajo de graduación], Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. 1980. Pág. 10.
20. Lixin, L., Ping L., Min Y., Lei Z. y Dean G. Cytotoxic resibufogenin transformation products from cell suspension cultures of platycodon grandiflorum. *Lett. Org. Chem.* 2004. Pág. 176-178.

21. Lock de Ugaz, Olga. Investigación fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales, Perú, Pontificia Universidad Católica del Perú, Segunda edición. 1994. Pág. 53-63; 265-269.
22. Marcano D. y Hasegawa M. Fitoquímica orgánica, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 2002. Pág. 54-57.
23. Mahabir P. Gupta, 270 Plantas medicinales Iberoamericanas, Bogotá Colombia, Editorial Presencia Ltda 1995 Pág. 93-95.
24. Martínez Martínez A., Sesquiterpenlactonas, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquilla, Medellin, Colombia, 2011[Fecha de acceso 24 de Febrero de 2012] Disponible en:
<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/slactonas2001.pdf>
25. Matsuura, N., Yamada M., Suzuki H., Hasegawa N., Kurosaka C., Ubukata M., y col. Inhibition of preadipocyte differentiation by germacranolides from ***Calea urticifolia*** in 3T3-L1 cells. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2005; 69: 2470-2474.
26. Nakagawa, Y., Inuma, M., Matsuura, N., Yi, K., Naio, M., Nakayama, T., y col. A potent apoptosis-inducing activity of a sesquiterpene lactone, arucanolide, in HL60 cells: a crucial role of apoptosis-inducing factor. *J Pharmacol Sci.* 2005; 97: 242-252.
27. Núñez, M. J., Bazzocchi I. L., Martínez M. L., Rodríguez M. L., Torres D. F., Guzmán J. A., y col., Especies de la flora salvadoreña como fuente de

28. nuevos agentes terapéuticos, A/030031/10 Proyecto de Cooperación Interuniversitaria e Investigación Científica PCI/AECID, 2011.
29. Ohguchi S., Ito M., Yokoyama K., Inuma M., Itoh T., Nozawa Y., y col., Effects of sesquiterpene lactones on melanogenesis in mouse B16 melanoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2009; 32: 308-310.
30. Ortiz S., Evaluación del extracto etanólico de ***Calea urticifolia*** (Mill.) dc. sobre la regulación de la secreción de adipocinas asociadas a la resistencia a la insulina, Universidad Autónoma de Luis Potosí, Tesis de Maestría, 2011.
31. Rodríguez F., Oswaldo R., Torríz C., Erictu A.; Betanco V. y Alí R. Plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades en los animales domésticos, reserva natural El Tisey, Universidad Católica Agropecuaria del Trópico Seco Pbro. Francisco Luis Espinoza Pineda; Mexico, 2005.
32. Salguero R. M., Valencia C. M., y Vásquez M. E., Estudio etnobotánico de plantas medicinales en el municipio de Santo Tomás [Trabajo de Graduación], Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador, 1994.
33. Salud contabiliza 11.3% en desabastecimiento de medicamentos [sede Web] San Salvador, Diario El Mundo, 15-11-12 [acceso 28 de Febrero 2012]. Disponible: <http://elmundo.com.sv/salud-contabiliza-113-endesabastecimiento-de-medicamentos>

34. The Plant List [sede Web]. The Plant List USA; 2010. [actualizada en diciembre del 2010, acceso 30 de abril de 2012] Disponible en: <http://www.theplantlist.org/>
35. Umeruma K., Itoh T., Hamada N., Fujita Y., Akao Y., Nozawa Y. y col. Preconditioning by sesquiterpene lactone enhances H₂O₂-induced Nrf2/ARE activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 368: 948-954.
36. Villar del Fresno, Á. Farmacognosia General. Valle Hermoso, Madrid, España: Editorial Síntesis; 1999. Pág. 84-94.
37. Yamada M., Matsuura N., Hiroto S., Chihiro K., Naoko H., Makoto U., y col. Germacranolides from ***Calea urticifolia***. *Phytochemistry.* 2004; 65: 3107-3111.

GLOSARIO

Concentración Inhibitoria 50% (IC₅₀): La concentración mínima necesaria para hacer que el 50 por ciento de células viables disminuya o muera. ⁽³⁵⁾

Dinucleotido de Adenina Nicotinamidas (NAD⁺): Coenzima oxidativa de la fosforilación oxidativa de los organismos. ⁽¹⁶⁾

Dinucleotido de Adenina Nicotinamida Reductasa (NADPH): Enzima utilizada en la respiración celular y producida en la respiración celular. ⁽¹⁶⁾

Elemento Responsable Antioxidante (ARE): Elemento bioquímico responsable de la optimización de procesos antioxidantes. ⁽⁶⁾

Ensayo MTT: Es un ensayo colorimétrico para la medición de la actividad enzimática celular a través de la oxidación o no de la sal de tetrazolium. ⁽³⁵⁾

Espectroscopía Infrarrojo (IR): es la rama de la espectroscopia que trata con la parte infrarroja del espectro electromagnético. ⁽¹⁹⁾

Espectroscopía UV-Vis: es una espectroscopia basada en la emisión de fotones por la adsorción de energía de grupos cromóforos. ⁽¹⁹⁾

Farnesil Difosfato: Precursor biogénico de todas las sesquiterpenlactonas. ⁽⁶⁾

Germacránólidos: Sesquiterpenlactona que posee como esqueleto el germacrano. ⁽⁶⁾

Grupo difosfato (OPP): Son grupos difosfatos que tienen facilidad de separarse de los compuestos orgánicos y llevarse el par de electrones que tienen compartido. ⁽⁶⁾

Marcadores: son constituyentes químicamente definidos o grupos de componentes de una sustancia herbal, un preparado herbal o un producto medicinal herbal, los cuales son de interés para control de calidad, independientemente si tienen o no alguna actividad terapéutica. Los marcadores sirven para calcular la cantidad de sustancia herbal o preparado herbal en los productos medicinales herbales, si ese marcador se ha determinado cuantitativamente, en la sustancia herbal o preparado herbal. ⁽⁸⁾

Marcador analítico: son constituyentes o grupos de constituyentes que sirven para fines analíticos. ⁽⁸⁾

Marcador activo: son constituyentes o grupos de constituyentes que son generalmente aceptados para contribuir a la actividad terapéutica. ⁽⁸⁾

Sesquiterpenlactonas: Son una clase de terpenoides de origen natural (sesquiterpenoides C_{15}) con un anillo lactónico, que provienen biogénicamente del farnesil difosfato, presentando una gran diversidad de estructuras y clasificaciones. ⁽⁶⁾

ANEXO


ANEXO N° 1

Antiguo Cuscatlán, 9 de Febrero de 2012

A quien interese.

El motivo de la presente es para hacer constar que el alumno **Josué Roberto Villacorta Hernández**, estudiante de la carrera de Química y Farmacia de la Universidad Nacional de El Salvador, se hizo presente a nuestra institución con una muestra botánica de la especie comúnmente conocida como "Juanislama" la cual fue reconocida e identificada como ***Calea urticifolia* (Mill.) DC.** la cual pertenece a la familia **ASTERACEAE**.

Para el uso que el interesado estime conveniente, se extiende la presente.


Lic. Dagoberto Rodríguez Delcid
Jardín Botánico La Laguna
Herbario




Fig. N° 39 Carta de autenticación del material vegetal extendida por un botánico experto

MATERIALES Y EQUIPOS

| Reactivos | Cristalería | Equipo |
|--------------------------|----------------------|--|
| Acido pícrico anhidro | Vasos de precipitado | Soxhlet (<i>marca:</i> KONTES, 29/42 Vol. 3000mL), |
| Hidróxido de sodio 10 % | Pipetas volumétricas | |
| Alcohol etílico absoluto | Vidrios reloj | Rotaevaporador (<i>marca:</i> LABCONCO, <i>modelo:</i> No 421-1658), |
| Cloroformo | Balones volumétricos | |
| Metanol | Agitadores de vidrio | Espectrofotómetro UV-Vis (<i>marca:</i> Shimadzu, <i>modelo:</i> UV-1800) |
| n-hexano | | |
| Tolueno | | |
| Dioxano | | |
| Diclorometano | | |
| Acetona | | |
| Éter etílico | | |
| Acetato de etilo | | |
| Benceno | | |
| Isopropanol | | |
| Agua destilada | | |