

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



CUANTIFICACION DE SESQUITERPENLACTONAS TOTALES
PROCEDENTES DEL EXTRACTO CLOROFORMICO DE HOJAS DE *Calea*
urticifolia (JUANISLAMA) RECOLECTADAS EN EL PERIODO
CORRESPONDIENTE DE JULIO A DICIEMBRE DE 2012

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
JUAN PABLO SANCHEZ PEREZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

ENERO DE 2014

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZAVALETA. DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ.

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE 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 Dios, por la salud y la vida, quien me ha bendecido con una gran familia, el mejor grupo de trabajo y buenos amigos.

Al equipo del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales:

A la MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz y Dr. Marvin José Núñez Rivas, por ser los mejores docentes directores, por dirigir este trabajo de graduación y estar conmigo en cada etapa brindándome su conocimiento y apoyo, gracias por confiar en mí.

A la Maestra. Ana Miriam Santamaría de Campos, una gran profesora, quien ha estado siempre dispuesta a ayudarme de la mejor manera, gracias por todo.

A la Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza, poseedora de gran experiencia, de la cual he aprendido mucho, quien además ha aportado a este trabajo de la mejor forma posible como coordinadora de área.

A la Licda. Susana Hernández Doño, quien en el laboratorio me dio todo su apoyo y gentilmente me ayudo cada vez que necesite algo enseñándome muchas cosas

Al Lic. Josué Roberto Villacorta Hernández, quien con su experiencia amablemente me asesoro sobre esta investigación.

Al laboratorio Físicoquímico de Aguas: por permitirme realizar todas las mediciones espectroscópicas en sus instalaciones, en especial a la Licda. Rosa Miriam Lara quien me ayudo con el manejo del equipo.

A la MSc. Mirna Lorena Sorto, por su asesoramiento en la parte estadística, muchas gracias.

A la Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo Directora General de procesos de graduación y MSc. Ena Edith Herrera Salazar, por sus aportes para que este trabajo quedara de la mejor manera, gracias.

A la Licda. Katya Eunice Leyton, administradora académica que siempre está dispuesta a ayudar a los estudiantes.

Al proyecto CIC-UES 05.09 titulado: Estrategia multidisciplinar en la búsqueda de nuevos agentes analgésicos y antiinflamatorios procedentes de la Familia Compositae. Por financiar este trabajo de graduación.

A todos los profesores de la facultad que me formaron y de los que aprendí innumerables cosas.

A los laboratoristas y personal administrativo de la Facultad, quienes de una u otra forma aportaron a mi desarrollo en la facultad.

A mis amigos y compañeros a los cuales si mencionara sería una lista extensa y de no acabar, gracias por su amistad, apoyo y ratos de relax.

A mi familia: a mi abuela (mamá Nubia), por despertarme cada mañana para que pudiera ir a la universidad, por sus desayunos y todas sus infinitas atenciones. A mis hermanas (Bea y Sofí) quienes con sus locuras me sacaron risas y animaron los días en este largo camino. A mi madre y padre, por preocuparse día a día por sus tres hijos, por enseñarme tantas cosas, cada uno de sus sacrificios es el motor que me impulsa a seguir adelante.

DEDICATORIA

A mi familia.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales.

A mis amigos, compañeros y todas aquellas personas que creyeron en mí y me brindaron su apoyo.

INDICE

	Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xxi
Capítulo II	
2.0 Objetivos	24
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	26
3.1 GENERALIDADES DE LAS SESQUITERPENLACTONAS	26
3.1.1 Definición de sesquiterpenlactonas	26
3.1.2 Clasificación	28
3.1.3 Nomenclatura	28
3.1.4 Biogénesis	29
3.1.5 Formación de la lactona sesquiterpénica	32
3.1.6 Distribución y estado natural de sesquiterpenlactonas	33
3.1.7 Extracción de sesquiterpenlactonas	33
3.1.8 Pruebas de identificación de sesquiterpenlactonas	33
3.1.9 Separación y análisis cromatográfico	34
3.1.10 Características espectrales	36
3.2 ESPECTROSCOPÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV-VIS)	36
3.2.1 Generalidades	36
3.2.2 Características de las sesquiterpenlactonas en la espectroscopía ultravioleta	37
3.3 GÉNERO <i>Calea</i>	38
3.3.1 Generalidades	38
3.4 ESPECIE <i>Calea urticifolia</i>	40
3.4.1 Información taxonómica	40
3.4.2 Distribución de <i>Calea urticifolia</i>	43
3.4.3 Distribución geográfica de <i>Calea urticifolia</i> en El Salvador	44
3.4.4 Usos etnobotánicos de <i>Calea urticifolia</i>	45

3.4.5 Metabolitos secundarios aislados de <i>Calea urticifolia</i>	47
3.4.6 Sesquiterpenlactonas aisladas de <i>Calea urticifolia</i>	47
3.4.7 Actividades biológicas de <i>Calea urticifolia</i>	53
Capítulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	61
4.1 Tipo de estudio	61
4.2 Investigación bibliográfica	61
4.3 Investigación de campo	61
4.3.1 Recolección del material vegetal	61
4.4 Parte experimental	62
4.4.1 Preparación de las muestras a investigar	62
4.4.2 Obtención de extracto clorofórmico seco (ECS) de <i>C. urticifolia</i>	63
4.4.3 Identificación de las sesquiterpenlactonas en el extracto clorofórmico por cromatografía en capa fina	63
4.4.4 Identificación por espectroscopía ultravioleta de las sesquiterpenlactonas de <i>C. urticifolia</i>	64
4.4.5 Cuantificación de sesquiterpenlactonas (STLs) totales mediante espectroscopía visible	64
4.4.6 Diseño estadístico	67
4.4.6.1 Desviación típica estándar	68
4.4.6.2 Intervalo de confianza al 95%	69
4.4.6.3 Análisis de varianza	70
4.4.7 Esquema de trabajo de la parte experimental	71
Capítulo V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	73
5.1 Identificación de la especie vegetal	73
5.2 Recolección y preparación del material vegetal	73
5.3 Preparación del extracto clorofórmico seco (ECS)	74

5.4 Resultados de la identificación de las sesquiterpenlactonas en el extracto clorofórmico por cromatografía en capa fina	74
5.5 Resultados de la identificación por espectroscopía ultravioleta de las sesquiterpenlactonas de <i>C. urticifolia</i>	78
5.6 Resultados de la cuantificación de sesquiterpenlactonas totales Mediante espectroscopia visible	80
5.6.1 Cantidad de sesquiterpenlactonas totales expresadas como mg de Juanislamina presentes en las alícuotas usadas para las lecturas en espectroscopía visible	80
5.6.2 Porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina presentes en extracto clorofórmico seco (ECS)	84
5.6.2.1 Porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en extracto clorofórmico seco durante los doce meses del año 2012	88
5.6.3 Porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en material vegetal seco	90
5.6.3.1 Porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresados como Juanislamina en material vegetal seco durante los doce meses del 2012	93
5.6.4 Estudio de toxicidad oral a dosis repetidas de 28 días en ratones NIH del extracto clorofórmico de <i>C. urticifolia</i>	95
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	98
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	100

Bibliografía	101
Glosario	109
Anexos	112

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Documento que autentica la especie estudiada como ***Calea urticifolia***.
2. Preparación de reactivos, materiales y equipo.
3. Espectros ultravioleta de las muestras de *Calea urticifolia*.
4. Análisis de varianza.

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	N° Pág.
1. Fases móviles (eluyentes) usados en la cromatografía de sesquiterpenlactonas	35
2. Usos etnobotánicos de <i>Calea urticifolia</i>	46
3. Códigos asignados a las colectas de <i>C. urticifolia</i> realizadas durante el 2012	62
4. Condiciones para realizar la cromatografía de capa fina	63
5. Código de colecta literal asignado para la identificación en la placa cromatográfica	74
6. Resultados R_f obtenidos de la cromatografía en capa fina de todas las manchas reveladas con el reactivo de Baljet	77
7. Absorbancias, peso y factor de dilución en las alícuotas de las muestras de <i>C. urticifolia</i>	81
8. Contenido de las sesquiterpenlactonas totales presentes en las alícuotas expresadas como mg de Juanislamina, promedios, desviaciones estándar, e intervalo de confianza 95%	83
11. Contenido de las sesquiterpenlactonas totales presentes en los extractos clorofórmicos secos de las muestras expresadas como gramos de Juanislamina, para cada una de las cinco repeticiones y sus promedios	85

12. Porcentajes de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina presentes en los ECS de las muestras, para cada una de las cinco repeticiones junto con sus promedios, desviación estándar e intervalo de confianza al 95%.	86
13. Porcentaje promedio de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina presentes en ECS e intervalos de confianza al 95% en las 24 muestras del año 2012	88
14. Porcentajes de sesquiterpenlactonas totales expresados como Juanislamina en el material vegetal seco para las trece muestras	91
15. Porcentaje promedio de STLs totales expresados como Juanislamina presentes en material vegetal seco en las 24 muestras del año 2012	93

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	N° Pág.
1. Biogénesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen	27
2. Estructuras y enumeración de los carbonos en seis núcleos de sesquiterpenlactonas	29
3. Biogénesis de los sesquiterpenos cíclicos, a partir del catión <i>E</i> , <i>E</i> -farnesilo y <i>E-Z</i> -farnesilo	30
4. Formación de diversos esqueletos esquiterpenlactónicos a partir del esqueleto de germacranólido.	31
5. Biogénesis de formación del (+)-Custunólido.	32
6. Ejemplos de especies del género <i>Calea</i> .	39
7. Imagen del arbusto de <i>C. urticifolia</i> .	41
8. Imagen del tallo de <i>C. urticifolia</i> .	42
9. Imagen de las flores de <i>C. urticifolia</i> .	42
10. imagen del fruto de <i>C. urticifolia</i>	43
11. imagen de la zona de mayor distribución de <i>C. urticifolia</i> desde México hasta Panamá (países con pinchos amarillos)	44
12. Imagen de la distribución de <i>C. urticifolia</i> en El Salvador presentes en los departamentos marcados con el fichero	45
13. Sesquiterpenlactonas aisladas de <i>Calea urticifolia</i> en 1979.	48
14. Sesquiterpenlactonas aisladas de <i>Calea urticifolia</i> por Werner.	49
15. Sesquiterpenlactonas procedentes de <i>C. urticifolia</i> en 1981.	50

16. Sesquiterpenlactonas aisladas de <i>Calea urticifolia</i> en 1989.	51
17. Sesquiterpenlactonas aisladas de las partes aéreas de <i>C. urticifolia</i>	52
18. Sesquiterpenlactona más activa evaluada frente a células U937.	54
19. Metabolito más citotóxico frente a células SW480 y HL60	55
20. Sesquiterpenlactona más activa evaluada frente a células B16.	56
21. Sesquiterpenlactona con una mayor actividad potenciadora de ARE.	57
22. Sesquiterpenlactona más activa en la inhibición de adipogénesis.	58
23. Procedimiento experimental desarrollado en esta investigación	71
24. Secado de hojas de <i>C. urticifolia</i>	73
25. Cromatografía de capa fina de <i>C. urticifolia</i> y sus marcadores usando reactivo de Baljet como revelador.	75
26. Cromatografía de capa fina de <i>C. urticifolia</i> y sus marcadores usando reactivo de Kedde como revelador.	76
27. Espectro ultravioleta de la muestra de <i>C. urticifolia</i> código 02-07.	78
28. Espectro ultravioleta de la muestra de <i>C. urticifolia</i> código 01-10.	79
29. Espectro ultravioleta de la muestra de <i>C. urticifolia</i> código 30-12.	79
30. Porcentaje de STLs totales en cada uno de los ECS.	87
31. Porcentaje promedio de STLs totales expresadas como	

- Juanislamina en cada uno de los ECS de las veinticuatro muestras correspondientes a los doce meses del 2012, junto con sus intervalos de confianza al 95%. 89
32. Porcentaje de STLs totales expresados como Juanislamina en material vegetal para las trece muestra con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. 92
33. Porcentaje promedio de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en material vegetal para cada una de las veinticuatro muestras recolectadas en los doce meses del 2012 junto con sus intervalos de confianza al 95%. 94

INDICE DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de varianza

CCF: Cromatografía en capa fina

CIC-UES: Consejo de Investigaciones Científicas de la Universidad de El Salvador.

cm: centímetro

DEV STD: Desviación estándar.

ECS: Extracto clorofórmico seco

Fig.: Figura

g: gramos

IC 50: Índice citotóxico al 50%

IC 95%: Intervalo de confianza al 95%

IR: Infrarrojo

mg: Miligramos

mL: Mililitros

N: Normalidad

nm: Nanómetros

OPP: Difosfato

R_f : Factor de retención

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

STLs: Sesquiterpenlactonas

Tnf- α : Factor de necrosis tumoral

UV: Ultravioleta

%: porcentaje

λ : Longitud de onda

μ M: Micromoles

RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación fue la cuantificación de sesquiterpenlactonas totales presentes en los extractos de las hojas de ***Calea urticifolia*** en el periodo comprendido entre julio y diciembre de 2012. Con el propósito de en un futuro iniciar con la formulación de un fitofármaco a partir de un extracto estandarizado.

En primer lugar, la investigación de campo consistió en la recolección dos veces por mes de hojas de ***C. urticifolia***, que fue identificada por un botánico experto. Posteriormente las hojas se secaron al ambiente para luego ser molidas.

La extracción se llevó a cabo por el método Soxhlet hasta agotar la muestra. Luego, se eliminó el solvente para obtener el extracto seco. A partir de este, se procedió para la identificación de sesquiterpenlactonas, tanto en cromatografía en capa fina usando el revelador de Baljet, como por medio de espectroscopía UV, comparando con tres marcadores en ambas técnicas los resultados fueron positivos para los metabolitos secundarios activos.

Posteriormente se procedió a la cuantificación de sesquiterpenlactonas totales, la cual se realizó por espectroscopia visible midiendo la absorbancia de las muestras realizando el procedimiento por quintuplicado. Con esos datos se calculó:

- Porcentaje de sesquiterpenlactonas totales extracto seco.
- Porcentaje de sesquiterpenlactonas totales en material vegetal seco.

Posteriormente se agruparon los datos obtenidos en esta investigación con los obtenidos de la cuantificación de enero a Junio de 2012, para reportar resultados generales en cuanto a producción de metabolitos secundarios activos por parte de ***C. urticifolia***.

Se realizó también un análisis de varianza, utilizando un modelo estadístico unifactorial aleatorio el cual demostró que había diferencia significativa de una forma general entre las concentraciones de sesquiterpenlactonas en las diferentes muestras, brindando información importante para concluir los periodos del año donde había más diferencia y donde no era significativa.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Calea urticifolia (Juanislama) es una especie vegetal muy utilizada en la medicina tradicional salvadoreña, para padecimientos tales como: artritis, fiebre, cáncer, cólicos intestinales, diabetes, entre otros. Por ser una especie perteneciente a la Familia Asteraceae, quimiotaxonómicamente posee sesquiterpenlactonas como metabolitos secundarios mayoritarios, los cuales son responsables de sus distintas actividades biológicas. La concentración de estos metabolitos varía del 0.01 al 8% del peso seco de la planta, siendo el órgano de la planta que más los contiene, las hojas ^{(13),(25)}.

Por la importancia etnobotánica de ***C. urticifolia***, el presente trabajo tuvo como finalidad la cuantificación del contenido de sesquiterpenlactonas totales presente en las hojas recolectadas en el periodo comprendido entre julio y diciembre de 2012. Los resultados obtenidos en esta investigación y los ya presentados por el Lic. Villacorta ⁽⁴²⁾ permitieron concluir en que época del año se produce mayor cantidad de sesquiterpenlactonas. Esto será de mucha importancia al momento de la recolección del material vegetal para la fabricación de un fitofármaco base de ***C. urticifolia***.

La parte experimental del presente trabajo se dividió en tres etapas:

1. Extracción selectiva: por medio del método Soxhlet.
2. Identificación de las sesquiterpenlactonas: por cromatografía en capa fina y espectroscopía UV.
3. Cuantificación de las sesquiterpenlactonas: por medio de espectroscopía visible. Determinando la desviación estándar y el intervalo de confianza de los datos obtenidos además de un análisis de varianza.

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 espectroscopía UV-VIS en el Laboratorio Físico-Químico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia.

Este trabajo de graduación fué financiado por el proyecto de investigación del CIC-UES (09.05), titulado: *Estrategia multidisciplinar en la búsqueda de nuevos agentes analgésicos y antiinflamatorios procedentes de la Familia Compositae.*

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Cuantificar las sesquiterpenlactonas totales procedentes del extracto clorofórmico de hojas de *Calea urticifolia* (Juanislama) recolectadas en el periodo correspondiente de julio a diciembre de 2012.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Identificar las sesquiterpenlactonas mediante cromatografía en capa fina y espectroscopia UV.
- 2.2.2 Determinar el contenido de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina presentes en el extracto clorofórmico seco de las muestras recolectadas en el periodo de julio a diciembre de 2012 mediante espectroscopía visible.
- 2.2.3 Obtener el porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina presente en el material vegetal seco de las muestras recolectadas en el periodo de julio a diciembre de 2012.
- 2.2.4 Realizar el análisis de varianza para comprobar si existe diferencia significativa en las concentraciones de sesquiterpenlactonas.
- 2.2.5 Especificar el periodo del año en el cual se produce mayor cantidad de sesquiterpenlactonas.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 GENERALIDADES DE LAS SESQUITERPENLACTONAS

Las sesquiterpenlactonas son compuestos activos, que han sido aislados de una serie de especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional, que pertenecen fundamentalmente a la Familia Asteraceae (Compositae), se han reportado más de 3000 sesquiterpenlactonas diferentes en la literatura científica. Las concentraciones de sesquiterpenlactonas pueden variar entre el 0.01 y el 8% del peso seco y se encuentran generalmente en hojas y partes floridas. Se pueden encontrar en forma libre principalmente y raramente en forma glicosídica ⁽¹²⁾.

3.1.1 Definición de sesquiterpenlactonas

Son una clase de sesquiterpenoides de origen vegetal, que poseen un esqueleto fundamental de 15 átomos de carbono, que derivan de la unión cabeza-cola de tres fragmentos de isopreno, contienen un anillo lactónico en su estructura, y provienen biogénicamente del farnesil difosfato. (Ver **Fig. N° 1**)

^{(22), (25), (29)}.

Son compuestos lo suficientemente polares para ser insolubles en éter de petróleo pero no tan polares para solubilizarse en agua. Son solubles en etanol y metanol caliente, son muy solubles en cloroformo, diclorometano y éter etílico

⁽¹²⁾.

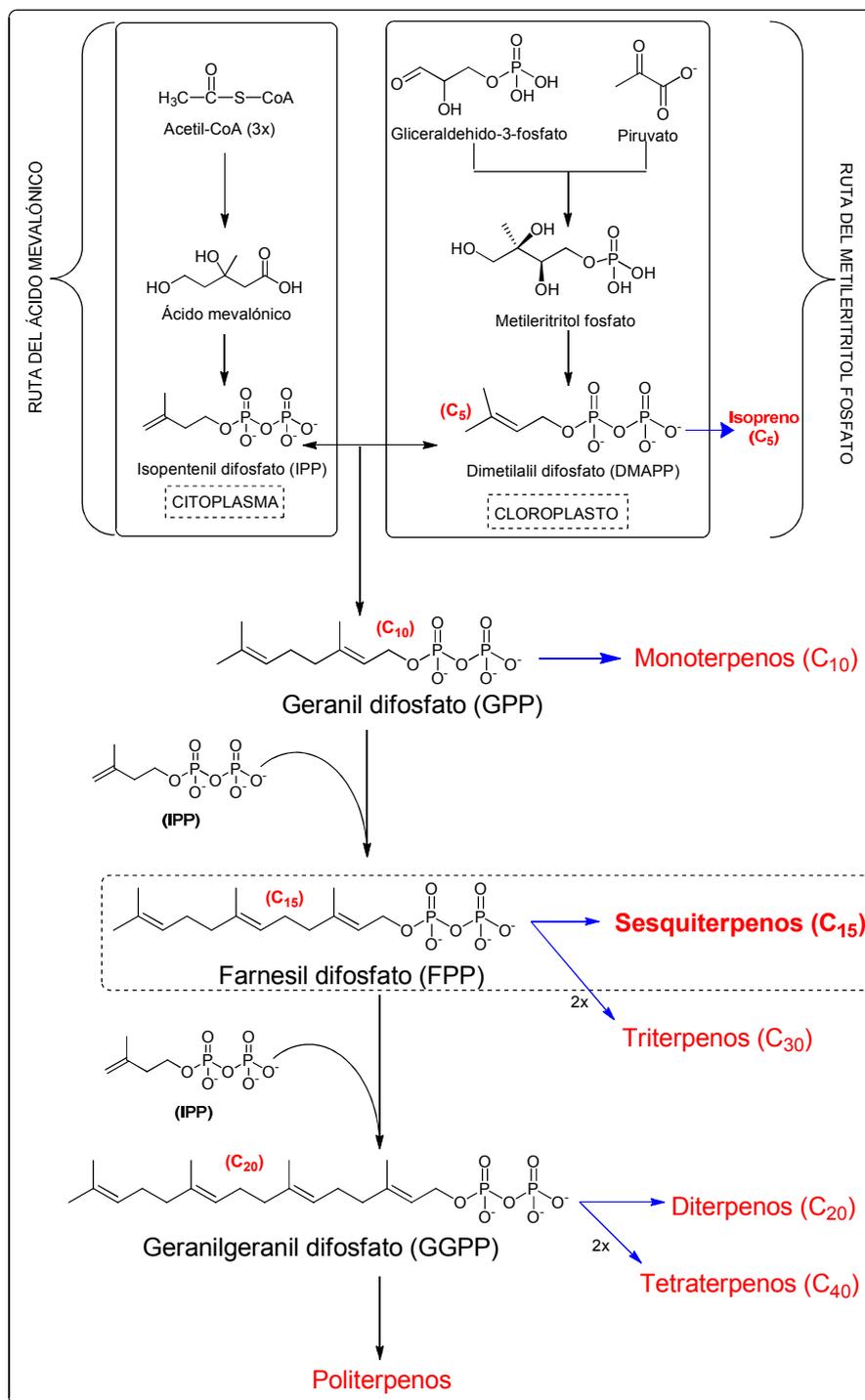


Fig. N° 1. Biogénesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen.

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. ⁽²⁹⁾.

3.1.3 Nomenclatura

Debido a la gran diversidad estructural de las sesquiterpenlactonas, no se cuenta con unas normas claras para su nomenclatura, por esto se acostumbra denominarlas con nombres vulgares p.ej. Helenalina, Mexicanina, Artemisinina, etc.; aunque algunos autores las nombran relacionando el núcleo básico y los sustituyentes. La **Figura N° 2** muestra algunos ejemplos de núcleos de sesquiterpenlactonas y la manera como se enumeran los átomos de carbono del núcleo básico ⁽²⁹⁾.

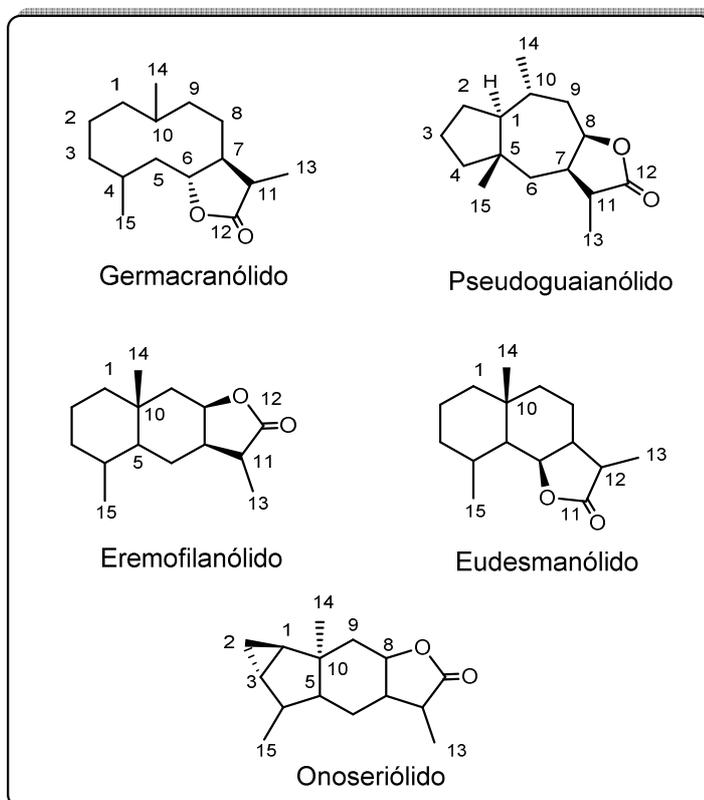


Fig. N° 2. Estructuras y enumeración de los carbonos en seis núcleos de sesquiterpenlactonas.

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, los cuales a través de adiciones electrofílicas y protonaciones de doble enlace, nos conducirían a los cationes guailo y eudesmilo. A partir del catión *E, E*-farnesilo y por medio del giro del enlace 3,4, se formaría el catión *E, Z*-farnesilo, 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⁾.

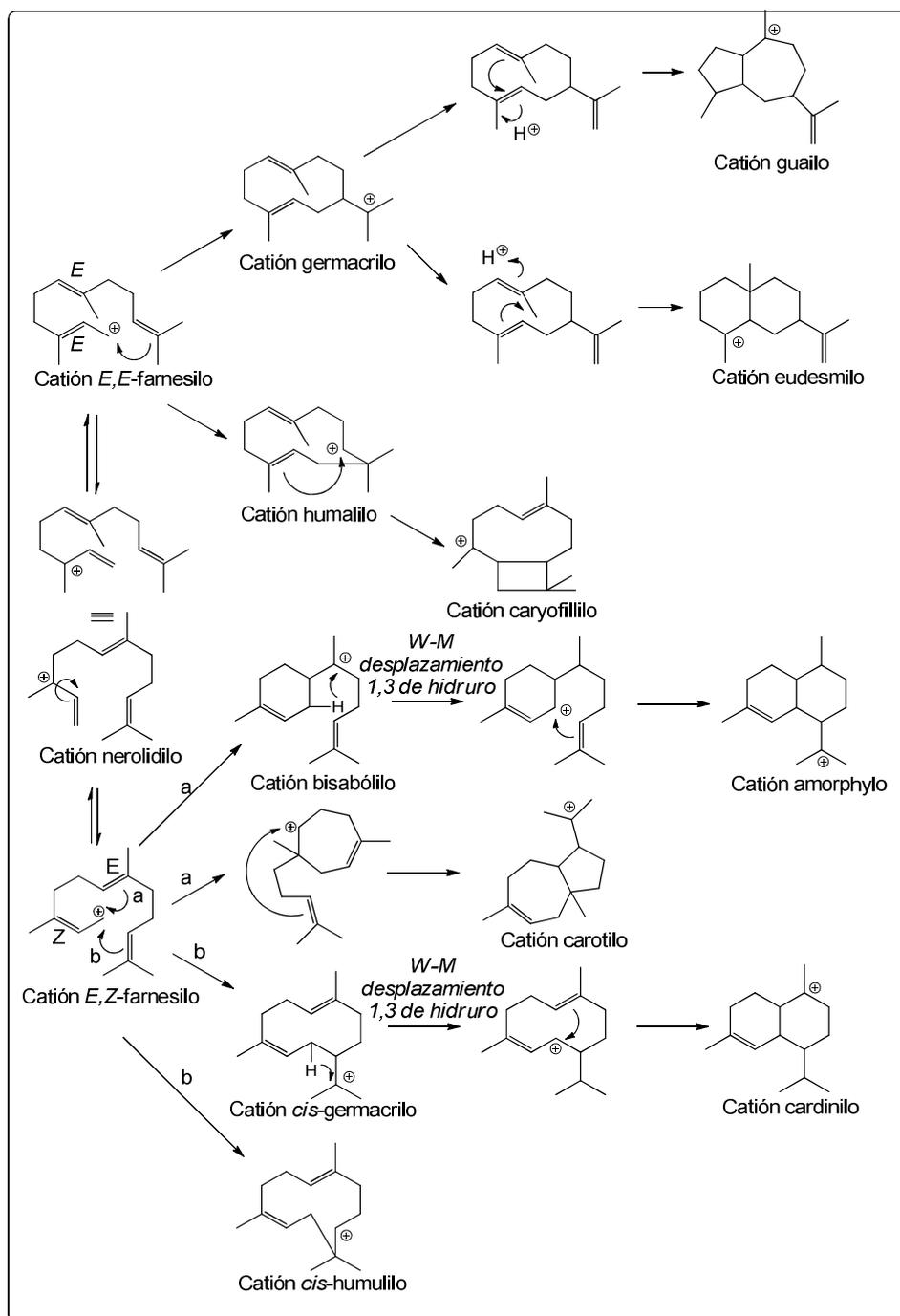


Fig. N° 3. Biogénesis de los sesquiterpenos cíclicos, a partir del catión *E, E*-farnesilo y *E-Z*-farnesilo.

Se ha demostrado también que a partir del germacranólido por efecto de diferentes tipos de reacciones y modificación estructural se da origen a los diferentes esqueletos estructurales de las sesquiterpenlactonas (ver **Fig. N° 4**)

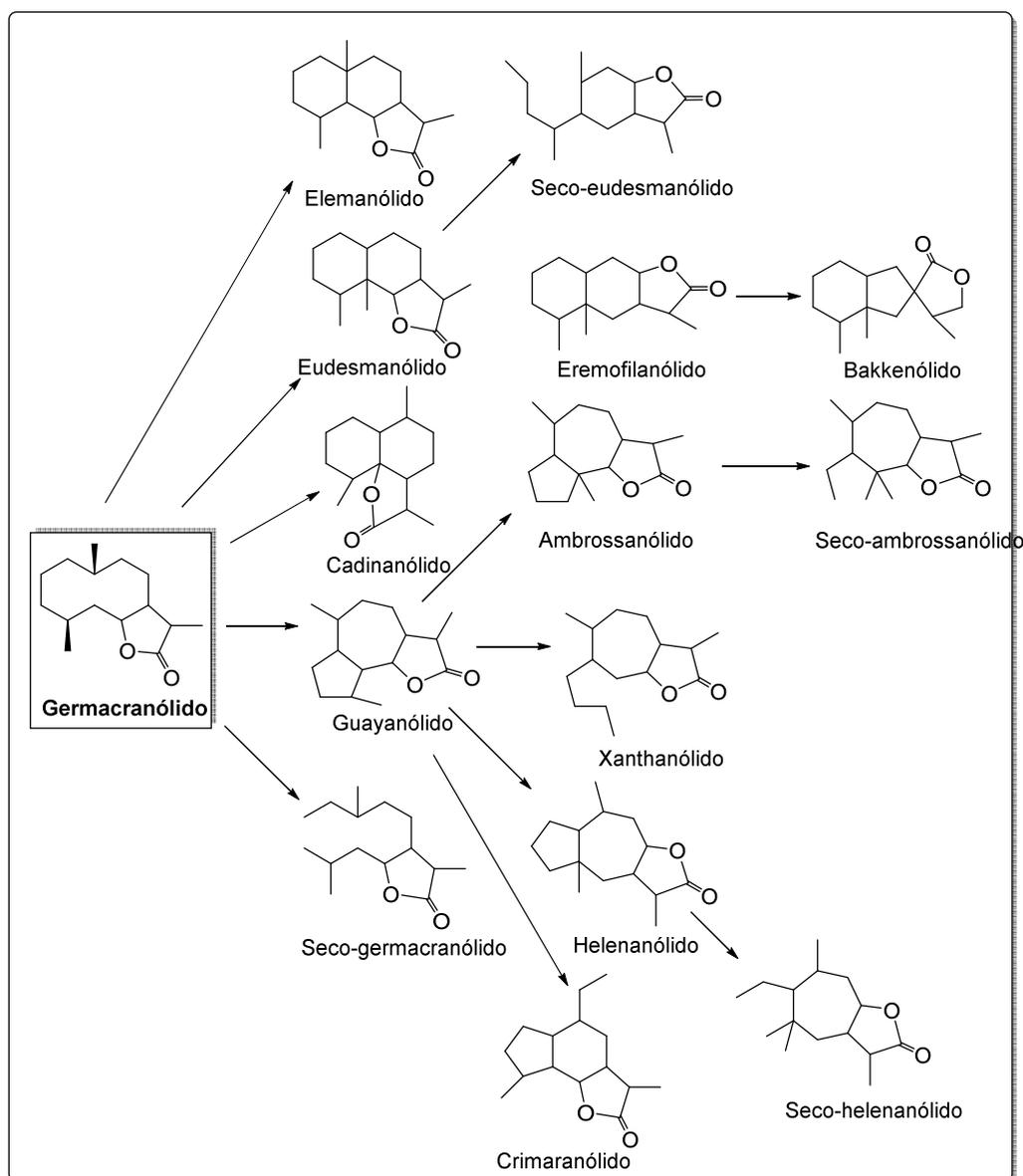


Fig. N° 4. Formación de diversos esqueletos sesquiterpenlactónicos a partir del esqueleto de germacranólido.

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^+ (dinucleótido de adenina nicotinamidasas) nos producirá el ácido germacránico (Ver **Fig. N° 5**), posterior hidroxilación regio y estereoselectiva con NADPH (dinucleótido de adenina nicotinamidareductasa) en presencia de O_2 y esterificación intramolecular se generaría el (+)-Custunólido ^{(5), (18)}.

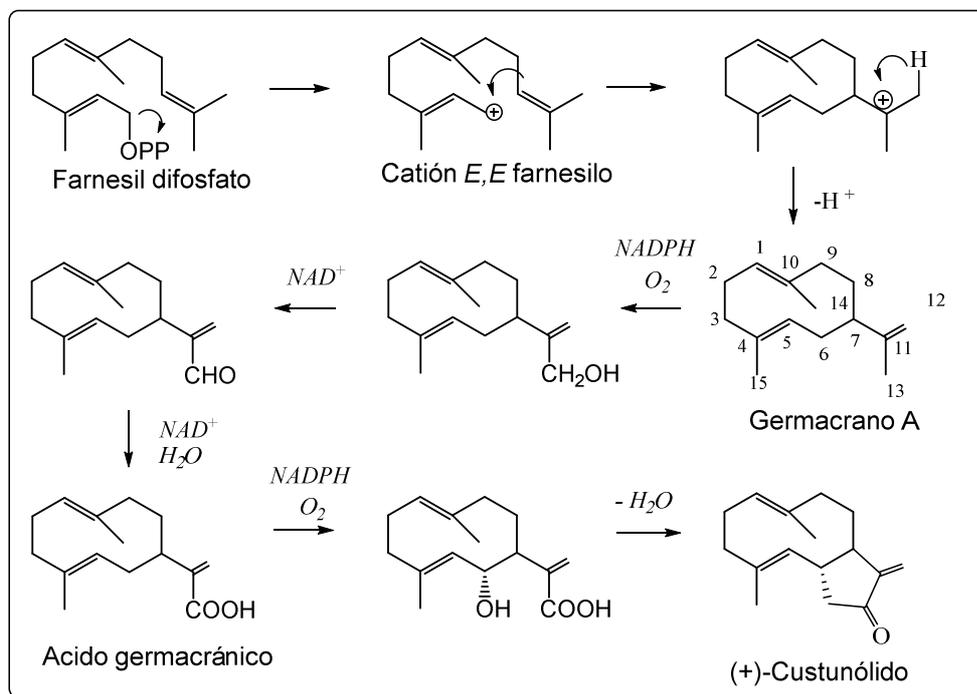


Fig. N° 5. Biogénesis de formación del (+)-Custunólido.

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 principios de 2012 se habían reportado alrededor de 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 ^{(9), (7), (24)}.

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. Entre los métodos más usados esta la maceración y extracción por soxhlet, partiendo de la droga seca y molida ⁽⁷⁾.

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 ésteres, 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 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 una serie de eluyentes, Algunos de los cuales se muestran en la **Tabla N° 1**.

Tabla N° 1. Fases móviles (eluyentes) usados en la cromatografía de sesquiterpenlactonas ^{(29), (32)}.

Fase móvil	Abreviatura	Proporción
cloroformo-metanol	CHCl ₃ -MeOH	(9:1)
cloroformo-metanol	CHCl ₃ -MeOH	(19:1)
cloroformo-éter etílico	CHCl ₃ -Et ₂ O	(4:1)
cloroformo-éter etílico	CHCl ₃ -Et ₂ O	(5:1)
<i>n</i> -hexano-acetato de etilo	<i>n</i> -hex-AcOEt	(7:3)
diclorometano-acetona	Cl ₂ CH ₂ -Me ₂ CO	(8:2)
éter etílico-acetona	Et ₂ O-Me ₂ CO	(9.5:0.5)
diclorometano-isopropanol	Cl ₂ CH ₂ - <i>i</i> -proOH	(9:1)
diclorometano-dioxano;	Cl ₂ CH ₂ -Dio	(8:2)
tolueno-dioxano	Tol-Dio	(8:2)
tetracloruro de carbono-dioxano	CCl ₄ -Dio	(8:2)
tolueno-acetato de etilo	Tol-AcOEt	(6:4)

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⁾.
- **Reactivo de Kedde** (ver **ANEXO N° 2**)

No selectivos:

- Ácido sulfúrico concentrado y calor.
- Vapores de yodo.
- Luz ultravioleta a 254 nm
- permanganato de potasio al 1% ⁽⁷⁾.

Actualmente, se pueden separar y analizar mezclas de sesquiterpenlactonas en poco tiempo, por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) ⁽²⁹⁾.

3.1.10 Características espectrales

La estructura química de las sesquiterpenlactonas se elucida a partir de datos obtenidos por espectroscopia infrarrojo (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) ⁽²⁹⁾.

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

3.2 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV-VIS)**3.2.1 Generalidades.**

La espectroscopia 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 ⁽²⁴⁾.

La absorción de la radiación ultravioleta y visible por las moléculas orgánicas se debe a la excitación de dos tipos de electrones: (1) los electrones compartidos por varios átomos y que participan directamente en los enlaces, y (2) los electrones externos no compartidos que se localizan principalmente en los átomos de oxígeno, halógenos, azufre y nitrógeno ⁽⁴⁾.

La longitud de onda en la que absorbe una molécula orgánica va a depender de la fuerza con la que se sujeten sus electrones ⁽⁴⁾.

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 ⁽²⁵⁾.

En contraste con las técnicas Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectroscopía Infrarroja (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 ⁽²⁸⁾.

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 ⁽²⁸⁾.

3.2.2 Características de las sesquiterpenlactonas en la espectroscopía ultravioleta

Las sesquiterpenlactonas presentan algunas características particulares al ser sometidas a espectroscopía ultravioleta. Por ejemplo:

- a) Las sesquiterpenlactonas saturadas no absorben por encima de 200 nm.

- b) Las sesquiterpenlactonas α , β -insaturadas absorben fuertemente entre 205-225 nm ($\epsilon= 5000-14000$).
- c) 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), (25), (45)}.
- d) Las lactonas α,β -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 las estructuras moleculares desplazando las longitudes de onda máxima a valores mayores, entre los 265 y 275 nm ^{(2),(3),(25)}.

Es importante destacar que la espectrofotometría UV-VIS tiene una aplicación importante en la cuantificación de sustancias que se basa en relación que existe entre la concentración de una solución y la capacidad que existe para absorber radiación ⁽⁴⁾.

3.3 GÉNERO *Calea*

3.3.1 Generalidades del Género *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) ^{(20), (38)}.

Algunas de las especies pertenecientes a este género son:

- *Calea jamaicensis*
- *Calea zacatechichi*
- *Calea uniflora*

- *Calea glomerata*
- *Calea venosa*
- *Calea granítica*
- *Calea urticifolia*



Calea jamaicensis



Calea zacatechichi



Calea uniflora



Calea venosa



Calea glomerata



Calea granítica

Fig. N° 6. Ejemplos de especies del género *Calea*.

3.4 ESPECIE *Calea urticifolia*

3.4.1 Información taxonómica ⁽²⁷⁾

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

Sinónimos

Solidago urticifolia Miller ⁽²⁶⁾, ***Calea urticifolia*** (Miller) DC ⁽³⁷⁾.

Nombres comunes de *Calea urticifolia*

- Juanislama (El Salvador y Ecuador); Amargón, Juanislama, Calea, Hoja de empacho (El Salvador); Chirivito (Hondura); 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). ^{(11), (9), (13), (16), (24), (34), (37), (38)}

Descripción botánica

Es un arbusto o planta perenne que llega a medir hasta 3.5 m de alto.

- **HOJAS:** hojas opuestas, peciolo hasta de 8 mm de largo, lamina ovada o deltoide a veces lanceolada de 3 a 14 mm de largo de 1 a 7 mm de ancho, aguda en el ápice, redondeada a truncada y algunas veces abruptamente cuneada en la base, margen cerrado o en ocasiones crenado o sub entero, de textura membranácea a cactácea, verde

oscura, por lo general rasposa y rugosa en el haz, retículo-nervada y cortamente pilosa o vilosa en el envés. ⁽³⁴⁾ (Ver **Fig. N° 7**)

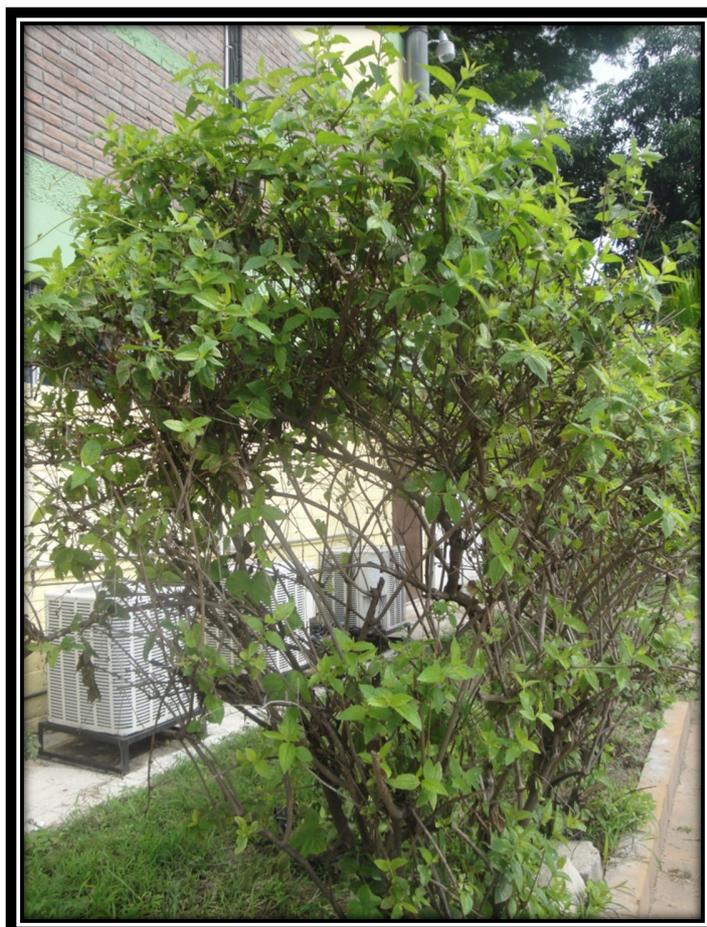


Fig. N° 7. Arbusto de *C. urticifolia*.

- **TALLO:** Densamente pubescentes con tricomas patentes cafés, tallos cortamente pilosos o hirsutos. (Ver **Fig. N° 8**) ^{(11), (9), (20), (34), (37)}.



Fig. N° 8 Tallos de *C. urticifolia*.

- **FLORES:** Capitulescencias de fascículos de 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 ⁽³⁷⁾ (Ver **Fig. N° 9**).



Fig. N° 9 Flores de *C. urticifolia*.

- **FRUTOS:** en aquenio cilíndricos, 1.5-3 cm de largo con vilano de escamas angostas (Ver **Fig. N° 10**) ^{(11), (19), (34)}.



Fig. N° 10 Frutos de *C. urticifolia*.

3.4.2 Distribución de *Calea urticifolia*

Es una planta ampliamente distribuida, podemos encontrarla desde Panamá, Centroamérica hasta el norte de México. Esta planta no presenta problemas de supervivencia, florece de octubre a febrero. Es una planta de clima cálido y semicalido, asociada a ecosistemas de selva baja caducifolia, bosques tropicales subcaducifolio, subperennifolio, perennifolio y bosques de encino y pino. Normalmente se encuentra en terrenos abiertos y a orillas de caminos a una altura que ronda entre los 22 y los 1800 msnm. (**Fig. N° 11**) ^{(34) (40)}.



Fig. N° 11 Zona de mayor distribución de *C. urticifolia* desde México hasta Panamá (países con pinchos amarillos) ⁽³⁴⁾ ⁽⁴⁰⁾.

3.4.3 Distribución geográfica de *Calea urticifolia* en El Salvador

No existe una distribución específica de *C. 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. Realizadas en Sonsonate, Santa Ana, La Libertad, Chalatenango, San Salvador, Morazán y San Miguel (Ver **Fig. N° 12**) ⁽¹⁹⁾.

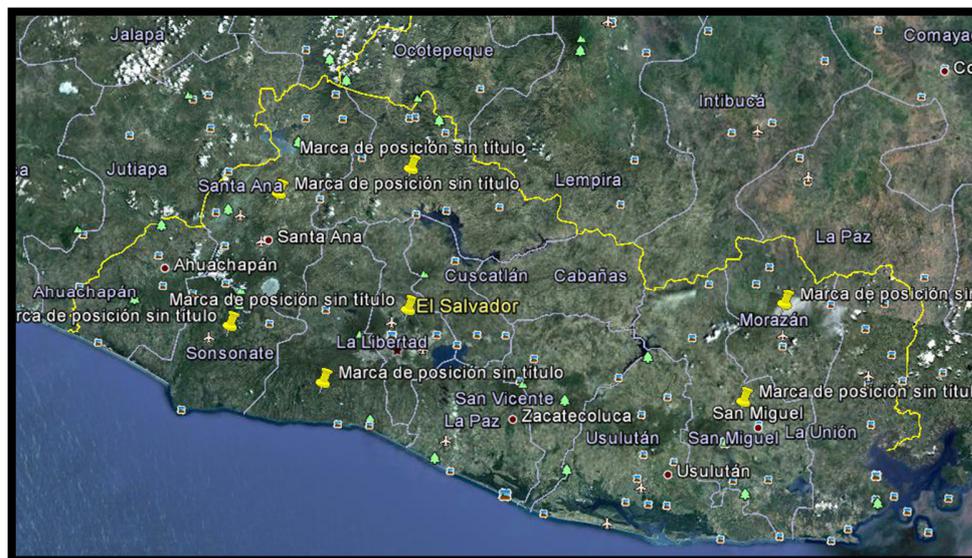


Fig. N° 12 Distribución de *C. urticifolia* en El Salvador presentes en los departamentos marcados con el fichero ⁽¹⁹⁾.

3.4.4 Usos etnobotánicos de *Calea urticifolia*

La medicina tradicional salvadoreña posee una amplia gama de remedios naturales destinados al alivio de padecimientos comunes entre la población, todo esto como resultado de años de tradición que va pasando la información de generación en generación. Entre la gran variedad de plantas usadas como remedio a enfermedades, la población Salvadoreña emplea *C. urticifolia* conocida popularmente como Juanislama cuyos usos populares se enlistan en la **Tabla N° 2** ⁽¹³⁾.

Tabla N° 2 Usos etnobotánicos de *Calea urticifolia* ^{(11), (13), (14)}

	Enfermedad	Órgano vegetal utilizado	Procedimiento para la elaboración	Vía de administración	Posología
<i>Calea urticifolia</i>	Artritis	Hojas secas	Cocimiento de unas 9 hojas	- Oral - Baños locales calientes y fomentos	3 taza/d 3-4 veces/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 carrasposas	- 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
	Mazamoras	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/d

Tabla N° 2 (continuación)

	Enfermedad	Organo vegetal utilizado	Procedimiento para la elaboración	Vía de administración	Posología
<i>Calea urticifolia</i>	<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

3.4.5 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**

(14), (34).

3.4.6 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 de ocho germacranólidos, que fueron elucidados por medio de diferentes técnicas espectroscópicas y se denominaron como germacranólidos 20-23 y 27-30 (Ver **Fig. N°13**) ⁽¹⁾.

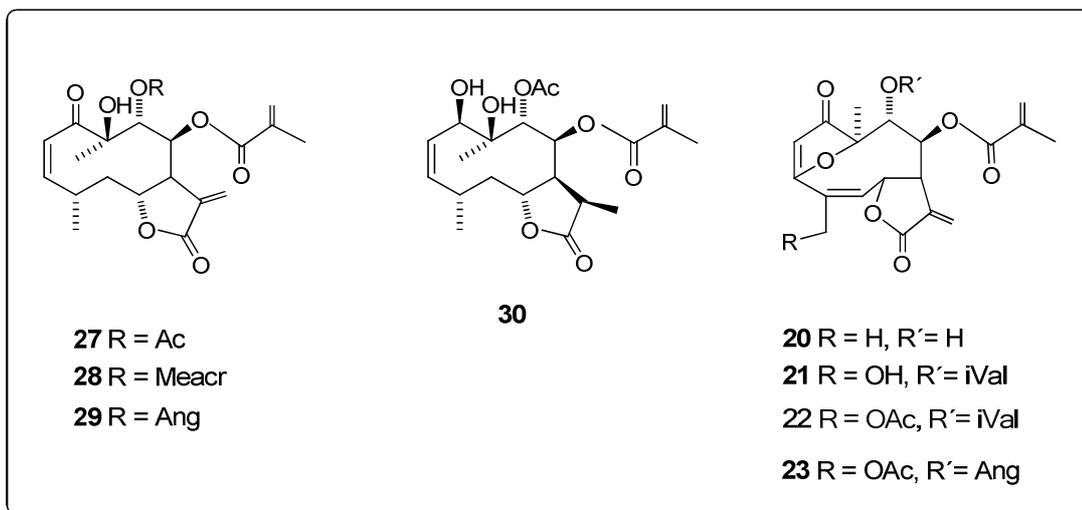


Fig. N°13. Sesquiterpenlactonas aisladas de *Calea urticifolia* en 1979.

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 **Fig. N° 14**) ⁽¹⁷⁾.

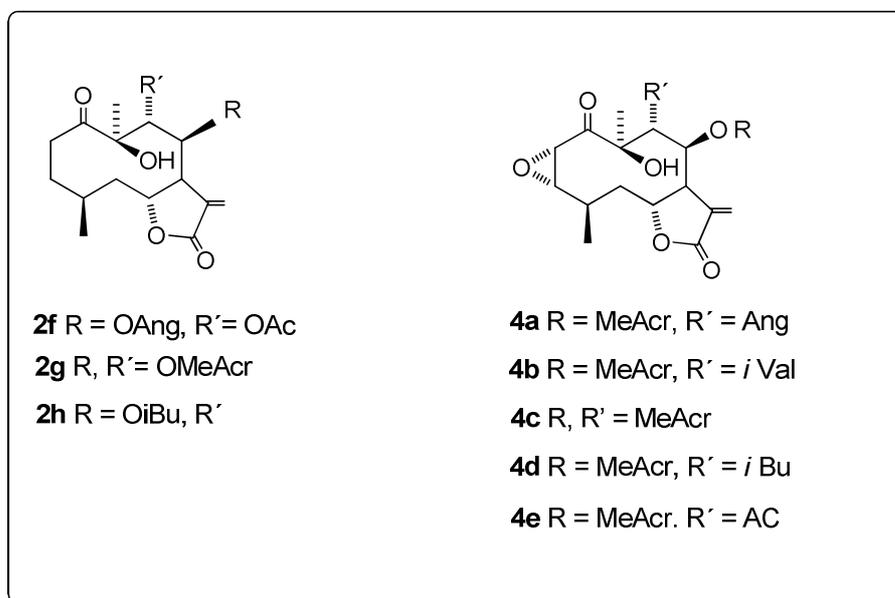


Fig. N° 14. Sesquiterpenolactonas aisladas de *Calea urticifolia* por Werner.

A nivel nacional, se aislaron y elucidaron, en 1980 cuatro germacranólidos (Juanislamina, 2,3-epoxijuanislamina, Caleína D y 2,3-epoxicaleína D) de las hojas de *C. urticifolia* (Ver Fig. 15) ⁽²³⁾.

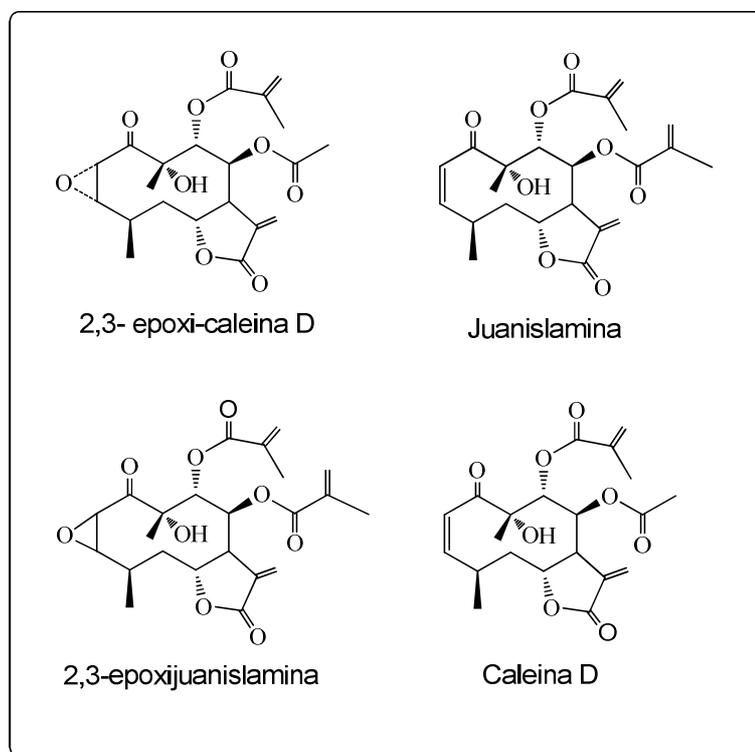


Fig. N° 15. Sesquiterpenlactonas procedentes de *C. urticifolia* en 1981.

En 1981, se estudiaron las hojas de *C. urticifolia*, aislando y elucidando dos sesquiterpenlactonas las cuales se identificaron por medio de RMN de ^1H y ^{13}C , y se les denominaron Caleína D y 2,3-epoxi-caleina D (**Ver Fig. 15**) ⁽²⁾.

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 α -epoxiacetato de caleurticolida y 2,3 α -epoxicaleurticolida, elucidadas espectroscópicamente (**Ver Fig. 16**) ⁽⁴²⁾.

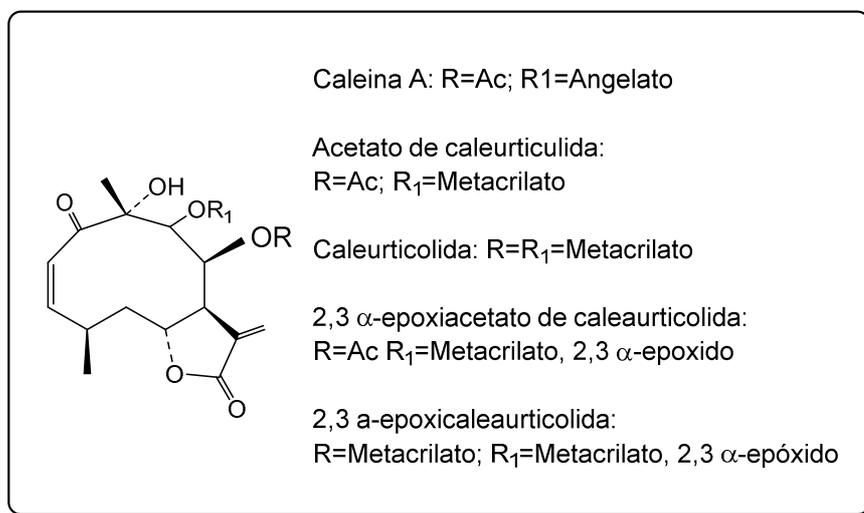


Fig. N° 16. Sesquiterpenlactonas aisladas de *Calea urticifolia* en 1989

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 **Fig. N° 15 y 17**

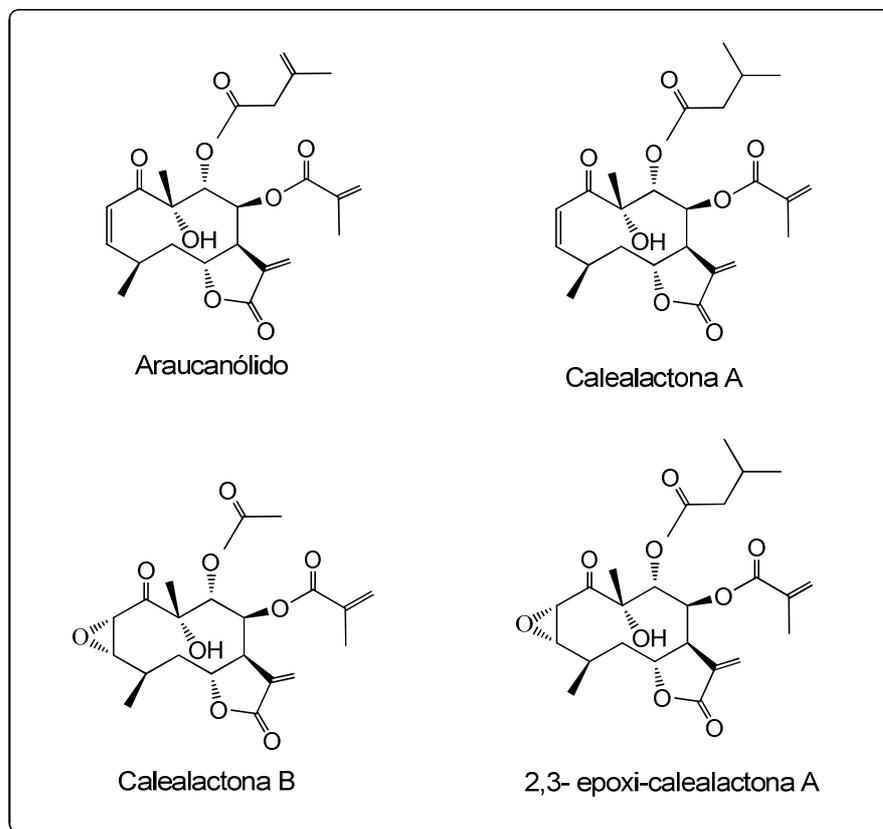


Fig. N° 17 Sesquiterpenolactonas aisladas de las partes aéreas de *C. urticifolia*

Otro estudio usando el extracto acetónico de hojas de *C. urticifolia* colectadas en El Salvador en 2004, permitió que se aislaran siete sesquiterpenolactonas denominadas como: Calealactona A-C, 2,3-epoxi-calealactona A, Caleína D, Juanislamina y 2,3-epoxijuanislamina, las cuales se identificaron por medio de RMN 2D y espectrofotometría de masas (Ver **Fig. N° 15 y 17**)⁽⁴⁶⁾.

En 2005, se estudiaron las partes aéreas de *C. urticifolia*, aislando siete sesquiterpenolactonas las cuales al elucidarlas con diferentes técnicas analíticas resultaron ser Calealactona A, Calealactona B, Calealactona C, 2,3-

epoxicalealactona A, Caleína D, Juanislamina y 2,3-epoxijuanislamina (Ver **Fig. N° 15 y 17**)⁽³⁰⁾.

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 germacránolido (Ver **Fig. N° 15 y 17**)⁽⁴¹⁾.

En el 2009 se aislaron de las hojas de *C. urticifolia*, cinco sesquiterpenlactonas (Calealactona B, Arucanólido, 2,3-epoxyjuanislamina, 2,3-epoxycalealactona A, y Calealactona A) anteriormente descritas. (Ver **Fig. N° 15 y 17**)⁽³³⁾.

3.4.7 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 *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 (IC₅₀) 3.5, >5, >5, 1.0, >5, 3.0 y 1.8 µM., utilizando como control positivo el Partenólida que presentó un valor de IC₅₀ = 1.9 µM, obteniendo resultados que confirman su potente actividad citotóxica sobre las células tratadas principalmente de la sesquiterpenlactona 2,3-epoxijuanislamina (Ver **Fig. N° 18**)⁽⁴⁶⁾.

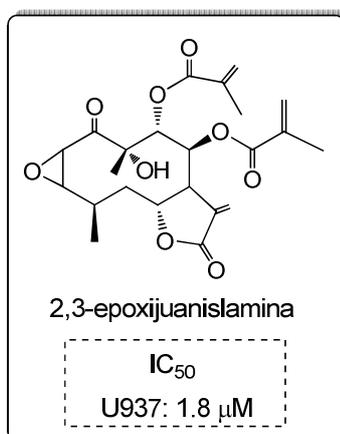


Fig. N° 18. Sesquiterpenlactona más activa evaluada frente a células U937.

Además, en 2005 se obtuvieron del extracto acetónico de las partes aéreas de *C. 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, 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 **Fig. N° 19**). 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-κB) ⁽³¹⁾.

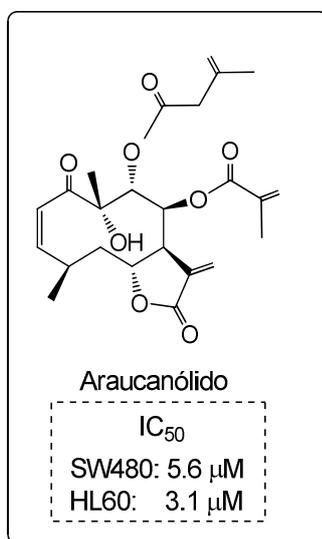


Fig. N° 19. Metabolito más citotóxico frente a células SW480 y HL60

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 ensayaron 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 μM (Ver **Fig. N° 20**)⁽³⁰⁾.

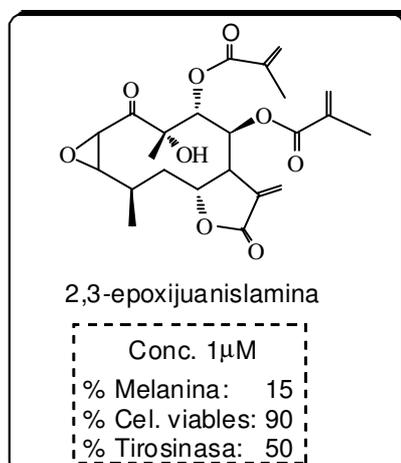


Fig. N° 20. Sesquiterpenlactona más activa evaluada frente a células B16.

- **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 *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 activo frente a la potenciación de la ARE ⁽⁴¹⁾ (Ver **Fig. N° 21**).

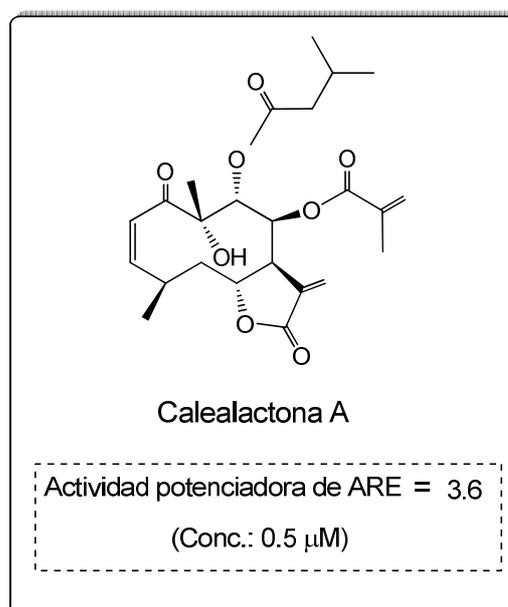


Fig. N° 21. Sesquiterpenlactona con una mayor actividad potenciadora de ARE.

- 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 *C. urticifolia* siete sesquiterpenlactonas, las cuales fueron evaluadas frente a la inhibición de la adipogénesis a concentraciones entre 1.25-5 μ M, resultando ser la más activa la Calealactona B, con valores de inhibición de lípidos de CME de 1.25 μ M y IC₅₀ de 7.0 μ 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. ⁽³⁰⁾ (Ver Fig. N° 22)

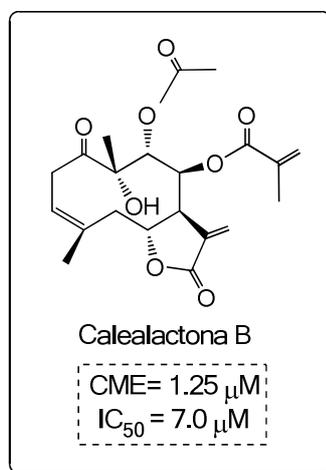


Fig. N° 22. Sesquiterpenlactona más activa en la inhibición de adipogénesis.

- 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 al 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. Así, el extracto etanólico de *C. 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 ⁽³⁴⁾.

- **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 ***C. 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***, que constituye una importante y abundante plaga en la mayoría de los cultivos. 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 ⁽¹⁶⁾.

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 ***C. urticifolia*** y cuyo fin fue determinar en qué periodo de los meses de julio a diciembre de 2012 existe una mayor producción de sesquiterpenlactonas de dicha especie vegetal y a partir de esos resultados obtenidos junto con los de la cuantificación de los meses de enero a junio de 2012 concluir en qué periodo del 2012, ***C. urticifolia*** produce mayor cantidad de sesquiterpenlactonas tanto en extracto clorofórmico seco como en material vegetal seco.

4.2 Investigación bibliográfica

Se realizaron consultas en artículos científicos, libros, trabajos de graduación y demás en los siguientes lugares:

- Biblioteca “Dr. Benjamín Orozco” de la Facultad de Química y Farmacia
- Internet.

4.3 Investigación de campo

4.3.1 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 julio a diciembre de 2012. ***C. urticifolia*** fue identificada por un botánico experto en la investigación titulada:

CUANTIFICACION DE SESQUITERPENLACTONAS PROVENIENTES DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* (JUANISLAMA) RECOLECTADAS EN EL PERIODO DE ENERO A JUNIO DE 2012 ⁽⁴³⁾.

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

Tabla. N° 3. Códigos asignados a las colectas realizadas durante el 2012.

Fecha de Colecta	Código
2 de julio	02-07
18 de julio	18-07
31 de julio	31-07
14 de agosto	14-08
30 de agosto	30-08
17 de septiembre	17-09
1 de octubre	01-10
15 de octubre	15-10
31 de octubre	31-10
19 de noviembre	19-11
30 de noviembre	30-11
14 de diciembre	14-12
30 de diciembre	30-12

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 cubiertas con papel filtro, para posteriormente ser secadas en la claridad. Después el material vegetal fue molido y luego almacenado en un lugar fresco y seco con su debida identificación y codificación.

4.4.2 Obtención de extracto clorofórmico seco (ECS) de *C. urticifolia*

Las hojas secas y finamente molidas se pesaron, se extrajeron por medio del aparato Soxhlet, usando cloroformo como solvente de extracción. Posteriormente se eliminó el solvente en cámara de extracción, obteniendo así los extractos secos.

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

La cromatografía en capa fina se realizó bajo las condiciones que se muestran en la **Tabla N° 4**.

Para conocer la preparación del reactivo revelador ver **ANEXO N° 2**

Tabla N° 4. Condiciones para realizar la cromatografía de capa fina

Fase estacionaria	Sílica gel POLYGRAM®SILG/UV 254
Fase móvil	Benceno-Éter etílico (2:8)
Muestra	Extractos clorofórmicos secos de <i>C. urticifolia</i> de las diferentes colectas (13 muestras)
Marcadores	Juanislamina, Caleína D y 2,3-epoxicaleina D
Revelador	Reactivo de Baljet
Evidencia	Manchas color naranja

4.4.4 Identificación por espectroscopía ultravioleta de las sesquiterpenlactonas de *C. urticifolia*

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

Las determinaciones espectroscópicas se llevaron a cabo en el Laboratorio Físicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia.

4.4.5 Cuantificación de sesquiterpenlactonas (STLs) totales mediante espectroscopía visible

- Pesar la muestra de extracto seco.
- Disolver la muestra en alcohol etílico absoluto y llevar a volumen de 10.0 mL.
- Tomar una alícuota de 5.0 mL y llevar a volumen de 10.0 mL con alcohol etílico absoluto.
- A 5.0 mL de la solución anterior agregar 3.0 mL de solución alcalina de picrato de sodio.
- Usar como blanco una mezcla de 5.0 mL de alcohol etílico absoluto y 3.0 mL de solución alcalina de picrato de sodio ^{(10), (32)}.
- Realizar por quintuplicado para cada una de las muestras.

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:

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

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 se realizaron en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (Shimadzu UV-1880).

A las concentraciones obtenidas en el proceso de cuantificación se le determinó la desviación estándar ⁽¹⁰⁾.

Se determinaron además los porcentajes de sesquiterpenlactonas totales expresadas como el marcador mayoritario tanto en el extracto clorofórmico seco como en el material vegetal seco.

- **Cantidad en peso de sesquiterpenlactonas (STLs) en extracto clorofórmico seco**

Antes de calcular porcentajes de sesquiterpenlactonas, es necesario conocer la cantidad en gramos de ellas que está presente en el extracto clorofórmico seco para luego establecer las relaciones respectivas.

$$C_{\text{STLs}} = \frac{\left(\text{Cantidad de STLs totales en alicuota de la muestra} \right) \left(\text{Peso extracto seco (g)} \right)}{\text{Peso mx (g)}}$$

En donde:

C_{STLs} = Cantidad de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto clorofórmico seco

- **Porcentaje de sesquiterpenlactonas (STLs) totales expresadas como Juanislamina presentes en extracto clorofórmico seco (ECS)**

Es el porcentaje que establece la cantidad en gramos de STLs presentes por cada cien gramos de ECS.

El porcentaje de STLs totales expresadas como Juanislamina en ECS, se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ STLs en ECS} = \frac{\text{Peso de sesquiterpenlactonas en la mx expresadas como Juanislamina (g)}}{\text{Peso del extracto clorofórmico seco (g)}} \times 100$$

En donde:

%STLs en ECS = % de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina presente en extracto clorofórmico seco.

- **Porcentaje de sesquiterpenlactonas (STLs) totales expresadas como Juanislamina presentes en material vegetal seco (MVS)**

Es el porcentaje que establece la cantidad en gramos de STLs presentes por cada cien gramos de material vegetal seco.

El porcentaje de STLs totales expresadas como Juanislamina en material vegetal seco, se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ STLs en MVS} = \frac{\text{Peso de sesquiterpenlactonas en la muestra expresadas como Juanislamina (g)}}{\text{Peso del material vegetal seco (g)}} \times 100$$

En donde:

%STLs en MVS= % de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina presentes en material vegetal seco.

Además, los resultados obtenidos se agruparon con los datos presentados en un trabajo de graduación anterior para analizar la cantidad de STLs totales tanto en ECS como en material vegetal seco, para poder concluir de forma general el comportamiento de ***C. urticifolia*** en cuanto a producción de sesquiterpenlactonas durante el 2012 ⁽⁴³⁾.

4.4.6 Diseño estadístico

El diseño estadístico se define como "diseño unifactorial completamente aleatorio", en general, el uso de este diseño es recomendable en aquellos experimentos en donde el material de ensayo es suficientemente homogéneo. Es decir, cuando todas las unidades de experimentales reúnen prácticamente las mismas características, de modo que el efecto de un tratamiento sobre la variable bajo estudio, es el mismo, independientemente la unidad experimental donde se mide, salvo por variaciones aleatorias debido a las fuentes del error

en la investigación. Tal condición de homogeneidad en el material experimental, permite que cada tratamiento pueda ensayarse con el número de repeticiones que se desee. Definiendo, como factor aleatorio aquel cuyos niveles se pueden considerar como muestra aleatoria de cierta población de tratamiento y cuyos niveles no son escogidos a propósito. ⁽⁴⁶⁾

En el diseño estadístico se analizaron los datos, utilizando la desviación típica estándar y sus respectivos intervalos de confianza para determinar qué tan dispersas se encuentran entre sí cada una de las cinco repeticiones de las colectas que se llevaron a cabo.

Posteriormente se realizó un análisis de varianza, que es de utilidad para comprobar si hay diferencia significativa entre las cantidades de sesquiterpenlactonas de las colectas realizadas.

Lo anterior se llevó a cabo para las colectas hechas en el periodo de julio a diciembre de 2012 y luego para todas las colectas realizadas durante todo el 2012, de enero a diciembre.

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.

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

Donde:

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.

La desviación típica estándar fue calculada mediante Microsoft Office Excel 2007.

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

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

Donde:

IC (μ) = 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 al 95%, permitirán evidenciar que tan dispersos se encuentran los datos de los valores promedios. Las mismas fueron calculadas mediante Microsoft Office Excel 2007.

4.4.6.3 Análisis de varianza

El análisis de varianza es de utilidad para comprobar si hay diferencia significativa entre las cantidades de sesquiterpenlactonas de las colectas realizadas, este se desarrolló en el programa STATGRAPHICS centurion XV versión 15.2.11.

Y los parámetros a evaluar fueron:

- Que el valor de P (*P-Value*) sea igual a cero.
- Prueba de suposición de la normalidad: una gráfica de este tipo es la representación de la distribución acumulada de los residuos sobre papel de probabilidad normal, donde la escala de ordenadas es tal que la distribución normal acumulada sea una recta.
- Que los residuos demuestren independencia: si la suposición de independencia no se cumple, la gráfica de residuos contra el tiempo mostrará una mayor dispersión en un extremo que en el otro.
- Test de rangos múltiples para los porcentajes: el método que se utiliza actualmente para discriminar entre los medios es la **mínima diferencia significativa de Fisher** (LSD). Valores grandes de diferencia entre los porcentajes de sesquiterpenlactonas de las distintas muestras evidencia diferencia significativa.

4.4.7 Esquema de trabajo de la parte experimental

A continuación, en la **Fig. N° 23** se presenta un esquema de trabajo, en el cual se muestra en resumida cuenta las operaciones más importantes realizadas durante el desarrollo del presente trabajo de graduación.

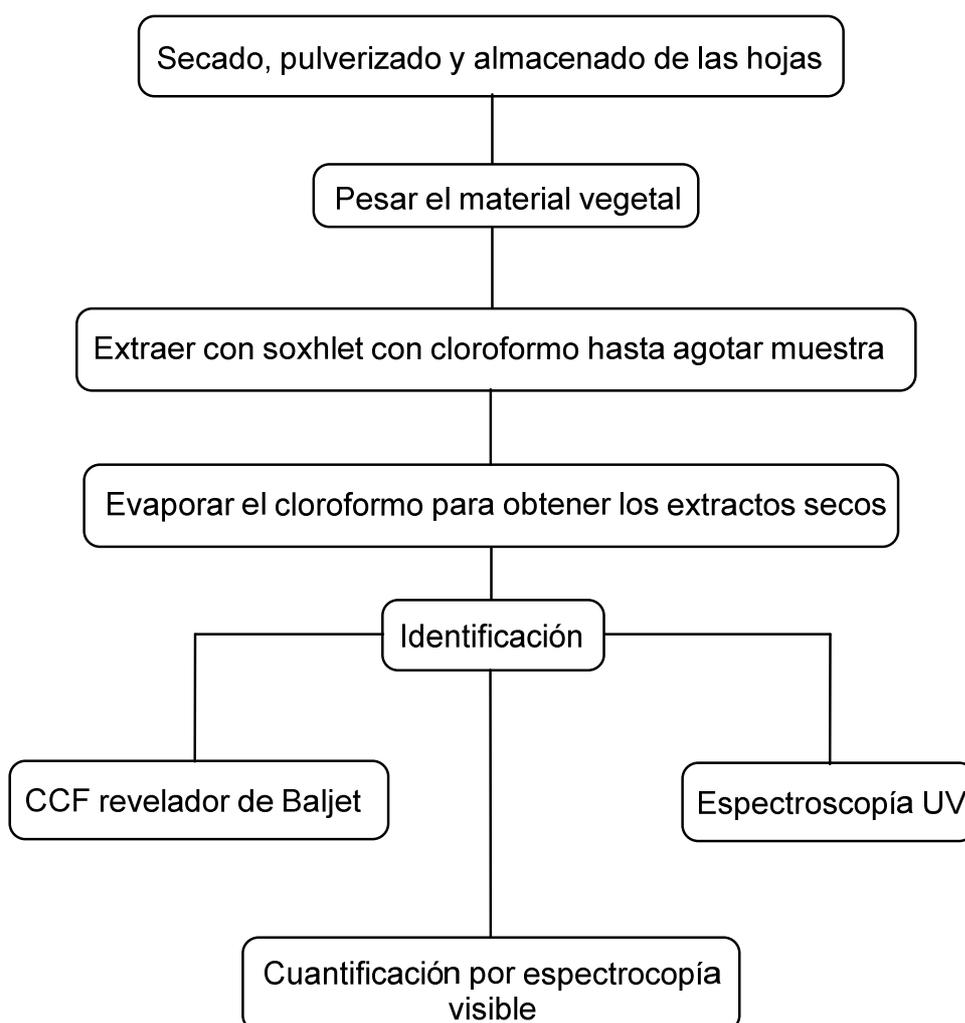


Fig. N° 23. Procedimiento experimental desarrollado.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Identificación de la especie vegetal

C. urticifolia fue identificada por el botánico encargado del herbario del Jardín Botánico La Laguna; con número de voucher RAC00717, realizado con muestras colectadas el 12 de febrero de 2012 (ver **Anexo N° 1**) ⁽⁴³⁾.

5.2 Recolección y preparación del material vegetal

Las hojas de *C. urticifolia*, fueron colectadas dos veces por mes y secadas a la claridad (Ver **Fig. N° 24**), luego se asignó a cada colecta un código de acuerdo al día y mes de recolección (ver **Tabla N° 1**) ⁽⁴³⁾.



Fig. N° 24. Secado de hojas de *C. urticifolia*

5.3 Preparación del extracto clorofórmico seco (ECS)

La extracción se llevó a cabo hasta agotamiento de la muestra por método Soxhlet. Luego se procedió a eliminar el solvente en una cámara extractora de gases y así obtener el extracto seco de cada una de las colectas. Estas muestras fueron utilizadas para la identificación y cuantificación de las sesquiterpenlactonas en el material vegetal colectado.

5.4 Resultados de la identificación de las sesquiterpenlactonas en el extracto clorofórmico por cromatografía en capa fina

Al revelar la placa cromatográfica, se identificó la presencia de sesquiterpenlactonas, evidenciado por el apareamiento de manchas color naranja similares a las presentadas por los marcadores que se observaron al rociar la placa con el revelador de Baljet (Ver **ANEXO N° 2**) todo esto se realizó en una cámara extractora de gases. (Ver **Fig. N° 25** y **Tabla N° 5**)

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 ⁽²⁵⁾

Tabla N° 5 Código de colecta literal asignado para la identificación en la placa cromatográfica

Literal de identificación	Código de muestra
l.	02-07
m.	18-07
n.	31-07
ñ	14-08
o.	30-08
p.	17-09
q.	01-10
r.	15-10
s.	31-10

Tabla N° 6 (continuación)

Literal de identificación	Código de muestra
t.	19-11
u.	30-11
v.	14-12
w.	30-12
x.	Marcador 1
y.	Marcador 2
z.	Marcador 3

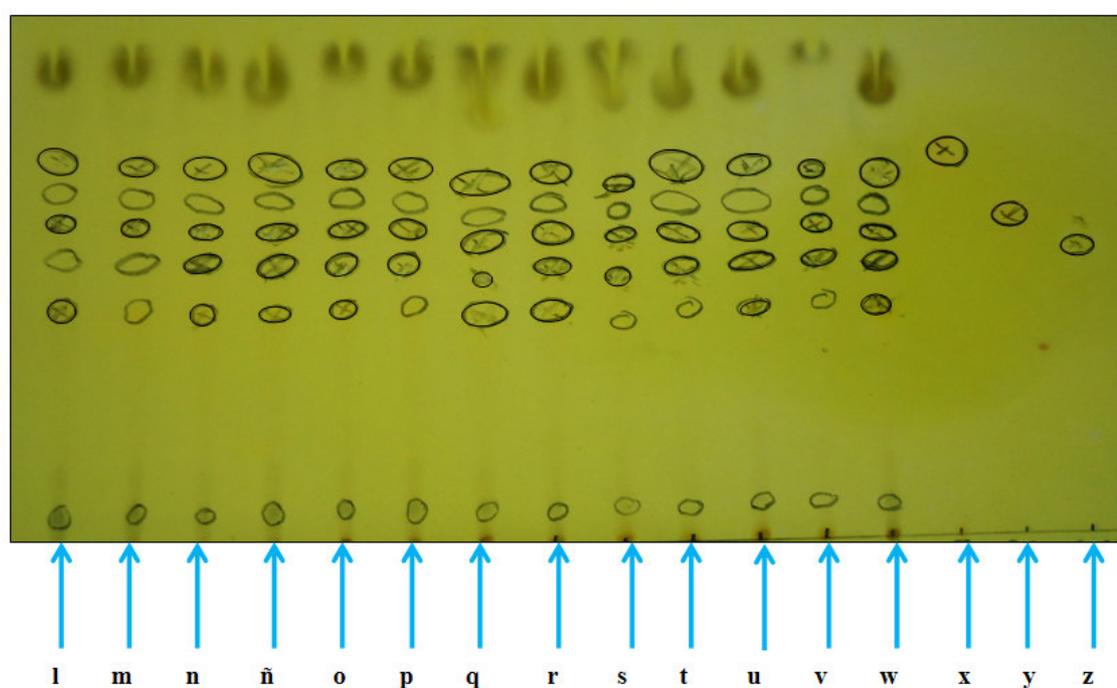


Fig. N° 25. Cromatografía de capa fina de *C. urticifolia* y sus marcadores usando reactivo de Baljet como revelador.

Al observar las manchas reveladas se nota la presencia de unas manchas que aparecen en la parte inferior de las muestras por debajo del nivel de la mancha del Marcador 3, que es el marcador que reporta R_f menor, por lo que para corroborar si se trataba de una sesquiterpenlactona se eluyó otra placa cromatográfica con todas las muestras recolectadas preparada de la misma

forma que la anterior, pero revelada con el reactivo de Kedde (ver **ANEXO N° 2**) el cual se usa para determinar compuestos con lactonas en su estructura y la evidencia de reacción es el apareamiento de manchas color morado.

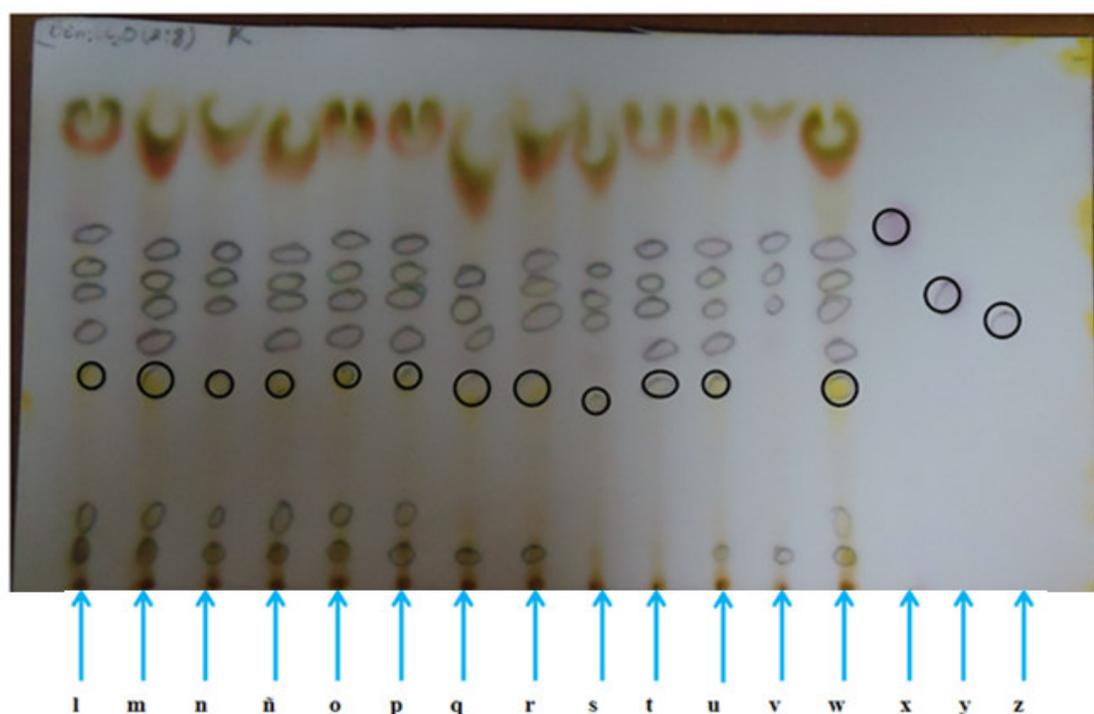


Fig. N° 26. Cromatografía de capa fina de *C. urticifolia* y sus marcadores usando reactivo de Kedde como revelador.

Al analizar la placa cromatográfica revelada con el reactivo de Kedde (**Fig. N° 26**) se observa que las manchas dudosas no se tornaron moradas, sino que se quedaron color amarillo, posiblemente debido a la presencia de ácidos grasos, por lo que se descarta que sean sesquiterpenlactonas.

Luego del revelado, se procedió a obtener los R_f de las distintas manchas eluidas. (Ver **Tabla N° 6**)

Tabla N° 6. Resultados R_f obtenidos de la cromatografía en capa fina de todas las manchas reveladas con el reactivo de Baljet

Código de muestra	R_f de la mancha	Código de muestra	R_f de la mancha
02-07	0.71 0.59	31-10	0.67 0.58 0.51
18-07	0.69 0.58	19-11	0.71 0.58 0.51
31-07	0.69 0.58 0.52	30-11	0.71 0.58 0.52
14-08	0.69 0.58 0.51	14-12	0.69 0.59 0.53
30-08	0.69 0.58 0.51	30-12	0.68 0.58 0.53
17-09	0.69 0.58 0.52	♣ Marcador 1	0.73
01-10	0.66 0.55 0.48	♣ Marcador 2	0.6
15-10	0.69 0.58 0.52	♣ Marcador 3	0.54

Frente del solvente: 8.5 cm

♣ Marcadores

Después de revelar las placas cromatográficas con el reactivo de Baljet, se observa la presencia de 3 manchas con R_f similares a los obtenidos con los 3 marcadores (**Tabla N° 6**) ⁽⁸⁾

5.5 Resultados de la identificación por espectroscopía ultravioleta de las sesquiterpenlactonas de *C. urticifolia*

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° 27, 28 y 29**.

Para ver los espectros UV de las muestras restantes consultar el **ANEXO N° 4**.

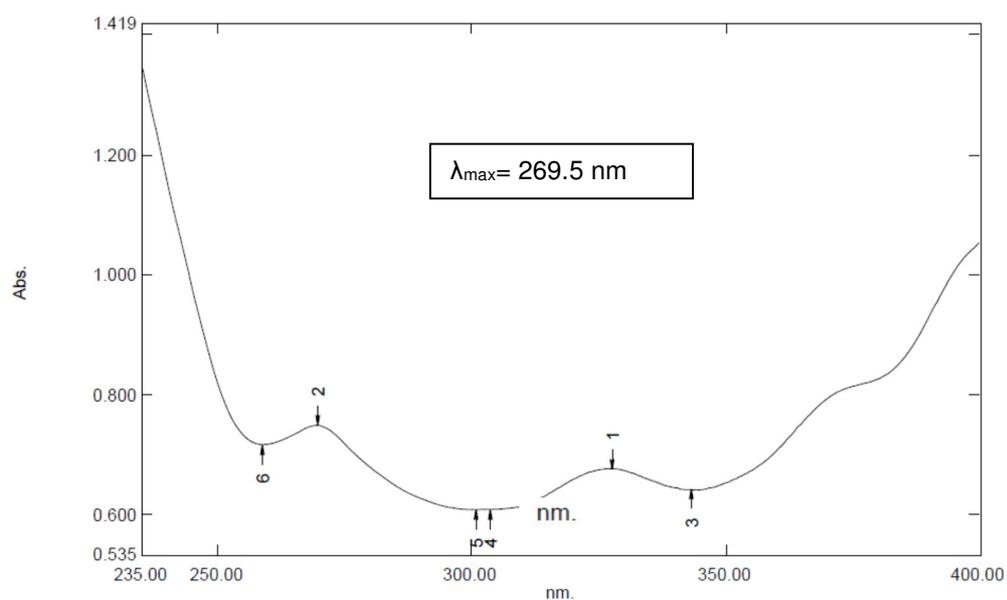


Fig. N° 27. Espectro ultravioleta de la muestra de *C. urticifolia* código 02-07.

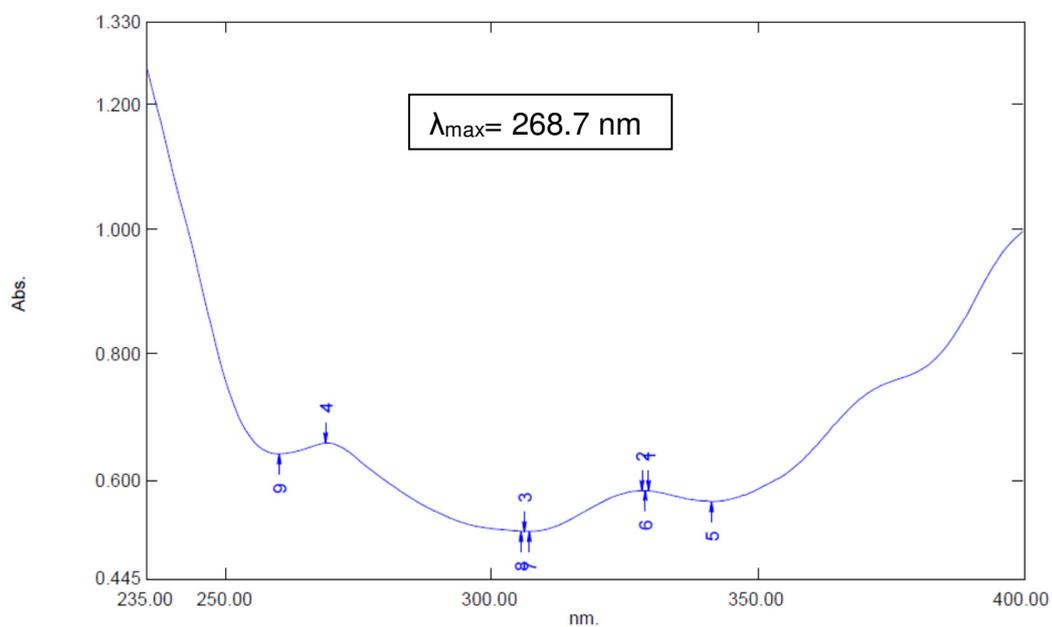


Fig. N° 28. Espectro ultravioleta de la muestra de *C. urticifolia* código 01-10.

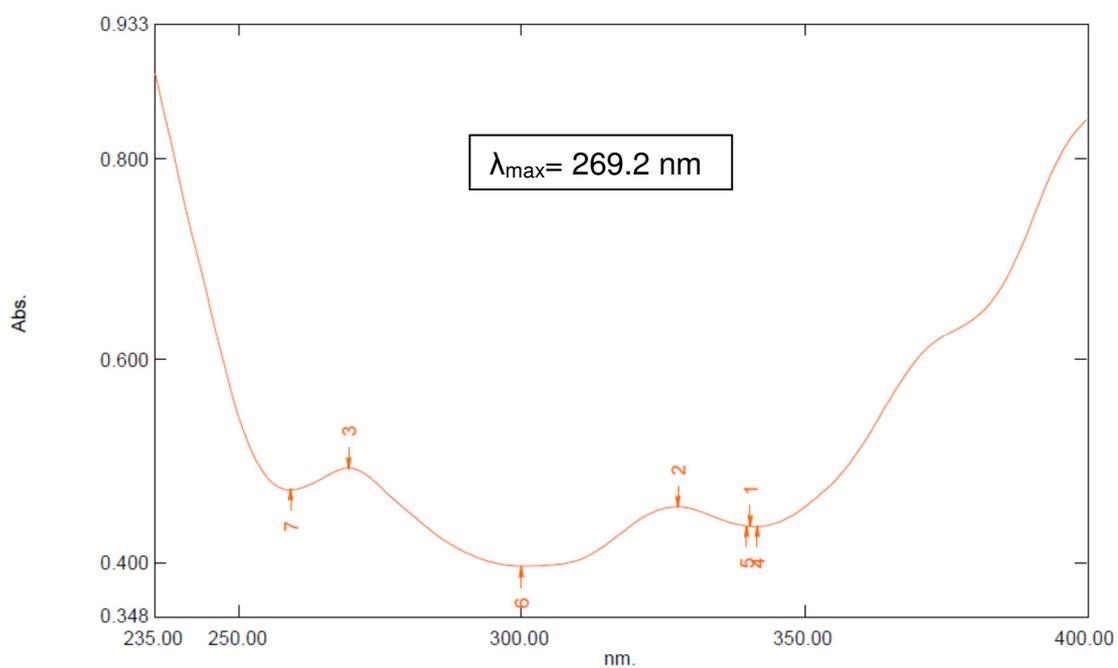


Fig. N° 29. Espectro ultravioleta de la muestra de *C. urticifolia* código 30-12.

Todo lo anterior, unido con los resultados obtenidos en la cromatografía en capa fina nos evidencia la presencia de las sesquiterpenlactonas en los trece extractos clorofórmicos obtenidos de *C. urticifolia*, 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 ⁽¹⁷⁾.

5.6 Resultados de la cuantificación de sesquiterpenlactonas totales mediante espectroscopia visible

5.6.1 Cantidad de sesquiterpenlactonas totales expresadas como mg de Juanislamina presentes en las alícuotas usadas para las lecturas en espectroscopía visible ⁽¹⁰⁾

En la **Tabla N° 7** se presentan las absorbancias obtenidas para cada alícuota en las cinco repeticiones llevadas a cabo con los ECS. También se presentan los pesos utilizados para realizar las soluciones de cada una de las muestras leídas y sus respectivos factores de dilución.

Tabla N° 7. Absorbancias, peso y factor de dilución en las alícuotas de las muestras de *C. urticifolia*

		CODIGO DE LAS MUESTRAS												
	Replica	02-07	18-07	31-07	14-08	30-08	17-09	01-10	15-10	31-10	19-11	30-11	14-12	30-12
Absorbancia a 495 nm	1	0,531	0,541	0,644	0,529	0,541	0,489	0,583	0,572	0,307	0,446	0,550	0,354	0,456
	2	0,542	0,587	0,632	0,550	0,610	0,497	0,577	0,519	0,416	0,414	0,577	0,299	0,520
	3	0,532	0,639	0,653	0,512	0,682	0,614	0,577	0,530	0,401	0,357	0,510	0,300	0,587
	4	0,395	0,593	0,525	0,666	0,633	0,746	0,502	0,478	0,387	0,403	0,453	0,376	0,606
	5	0,598	0,589	0,500	0,613	0,631	0,606	0,464	0,363	0,346	0,558	0,507	0,381	0,551
Peso (mg)	1	10,7	10	11,6	10,1	10	10,1	11,4	10,1	10,1	11,1	11,3	10,2	11,1
	2	10,9	10,3	10,1	10	11,2	10,1	12,9	10,1	10,4	10	11,2	10,1	10,2
	3	11,1	10,8	11,9	10,2	11,1	10,7	13	10,8	10,5	10	10,3	11,2	10,8
	4	10,2	10,7	10,3	11,9	10	12,3	11	10	11,7	10,5	10,5	11,1	10,9
	5	10,9	10,2	10,1	12,1	10,4	10	10,1	10	10,2	10,8	10,3	10,3	10,4

Factor de dilución (FD): 4 (el mismo para todas las muestras)

Luego se calculó el promedio de sesquiterpenlactonas en cada alícuota, se estimaron sus desviaciones estándar y sus respectivos intervalos de confianza 95%

En la **Tabla N° 8** se aprecian los contenidos de sesquiterpenlactonas presentes en cada una de las alícuotas de las muestras de análisis, los resultados se obtuvieron en mg de sesquiterpenlactonas totales expresados como Juanislamina.

Tabla N° 8. Contenido de las sesquiterpenlactonas totales presentes en las alícuotas expresadas como mg de Juanislamina, promedios, desviaciones estándar, e intervalo de confianza 95%.

		CODIGO DE LAS MUESTRAS												
	Replica	02-07	18-07	31-07	14-08	30-08	17-09	01-10	15-10	31-10	19-11	30-11	14-12	30-12
Cantidad de Sesquiterpenlactonas en alícuotas (mg)	1	6.4836	6.6098	7.8722	6.4695	6.6073	5.9772	7.1214	6.9933	3.7476	5.4507	6.7249	4.3258	5.5681
	2	6.6181	7.1756	7.7243	6.7244	7.4564	6.0774	7.0480	6.3380	5.0861	5.0616	7.0565	3.6561	6.3601
	3	6.4963	7.8125	7.9818	6.2613	8.3396	7.5049	7.0530	6.4764	4.8985	4.3572	6.2309	3.6619	7.1713
	4	4.8324	7.2525	6.4153	8.1352	7.7386	9.1156	6.1387	5.8430	4.7337	4.9249	5.5318	4.5941	7.4087
	5	7.3070	7.1946	6.1112	7.4968	7.7072	7.4036	5.6702	4.4355	4.2292	6.8186	6.2014	4.6570	6.7344
MEDIA mg		6.3475	7.2090	7.2210	7.0175	7.5699	7.2158	6.6063	6.0172	4.5390	5.3226	6.3491	4.1790	6.6485
DEV STD		0.9124	0.4262	0.8856	0.7806	0.6283	1.2805	0.6623	0.9745	0.5451	0.9237	0.5800	0.4907	0.7261
95% IC		0.7998	0.3736	0.7762	0.6842	0.5507	1.1224	0.5806	0.8542	0.4778	0.8096	0.5083	0.4301	0.6364

N (número de repeticiones): 5

95% IC = Intervalo de confianza al 95% **DEV STD** = Desviación estándar

5.6.2 Porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina presentes en extracto clorofórmico seco (ECS)

Se calculó la cantidad de sesquiterpenlactonas totales presentes en cada una de las 13 muestras por quintuplicado y posteriormente su porcentaje en el ECS.

En la **Tabla N° 9** se aprecian los contenidos de sesquiterpenlactonas totales presentes en cada una de los ECS de las muestras, los resultados se obtuvieron en gramos de sesquiterpenlactonas totales expresados como Juanislamina.

Posteriormente en la **Tabla N° 10** se presentan los porcentajes de sesquiterpenlactonas en cada una de las trece muestras con sus respectivos promedios, desviación estándar e intervalos de confianza al 95%.

Tabla Nº 9. Contenido de las sesquiterpenlactonas totales presentes en los extractos clorofórmicos secos de las muestras expresadas como gramos de Juanislamina, para cada una de las cinco repeticiones y sus promedios.

		CODIGO DE LAS MUESTRAS												
	Replica	02-07	18-07	31-07	14-08	30-08	17-09	01-10	15-10	31-10	19-11	30-11	14-12	30-12
Cantida d de STLs totales en g	1	1.0543	1.0714	1.0913	0.9032	1.1028	0.9540	1.0532	1.1466	0.6697	0.8628	0.8998	0.7532	0.7901
	2	1.0565	1.1293	1.2298	0.9481	1.1111	0.9700	0.9212	1.0392	0.8827	0.8893	0.9526	0.6429	0.9821
	3	1.0183	1.1726	1.0786	0.8655	1.2540	1.1307	0.9147	0.9930	0.8421	0.7656	0.9147	0.5807	1.0458
	4	0.8244	1.0987	1.0015	0.9639	1.2916	1.1947	0.9409	0.9676	0.7303	0.8241	0.7966	0.7351	1.0705
	5	1.1664	1.1434	0.9730	0.8736	1.2369	1.1935	0.9465	0.7345	0.7484	1.1093	0.9103	0.8030	1.0199
Media		1.0240	1.1231	1.0748	0.9109	1.1993	1.0885	0.9553	0.9762	0.7746	0.8902	0.8948	0.7030	0.9817

Tabla Nº 10. Porcentajes de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina presentes en los ECS de las muestras, para cada una de las cinco repeticiones junto con sus promedios, desviación estándar e intervalo de confianza al 95%.

		CODIGO DE LAS MUESTRAS												
	Replica	02-07	18-07	31-07	14-08	30-08	17-09	01-10	15-10	31-10	19-11	30-11	14-12	30-12
Porcentaje de sesquiterpenlactonas totales	1	60.59	66.10	67.86	64.05	66.07	59.18	62.47	69.24	37.11	49.11	59.51	42.41	50.16
	2	60.72	69.67	76.48	56.81	66.58	60.17	54.64	62.75	48.90	50.62	63.00	36.20	62.35
	3	58.53	72.34	67.07	53.69	75.13	70.14	54.25	59.97	46.65	43.57	60.49	32.70	66.40
	4	47.38	67.78	62.28	57.17	77.39	74.11	55.81	58.43	40.46	46.90	52.68	41.39	67.97
	5	67.04	70.54	60.51	52.75	74.11	74.04	56.14	44.36	41.46	63.14	60.21	45.21	64.75
Promedio		58.85	69.28	66.84	56.90	71.85	67.53	56.66	58.95	42.92	50.67	59.18	39.58	62.33
N		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DEV STD		7.16	2.42	6.22	4.44	5.19	7.35	3.34	9.15	4.79	7.46	3.86	5.05	7.11
IC 95%		6.28	2.12	5.45	3.89	4.55	6.45	2.93	8.02	4.2	6.54	3.39	4.42	6.23

IC 95% = Intervalo de confianza al 95%

DEV STD = Desviación estándar

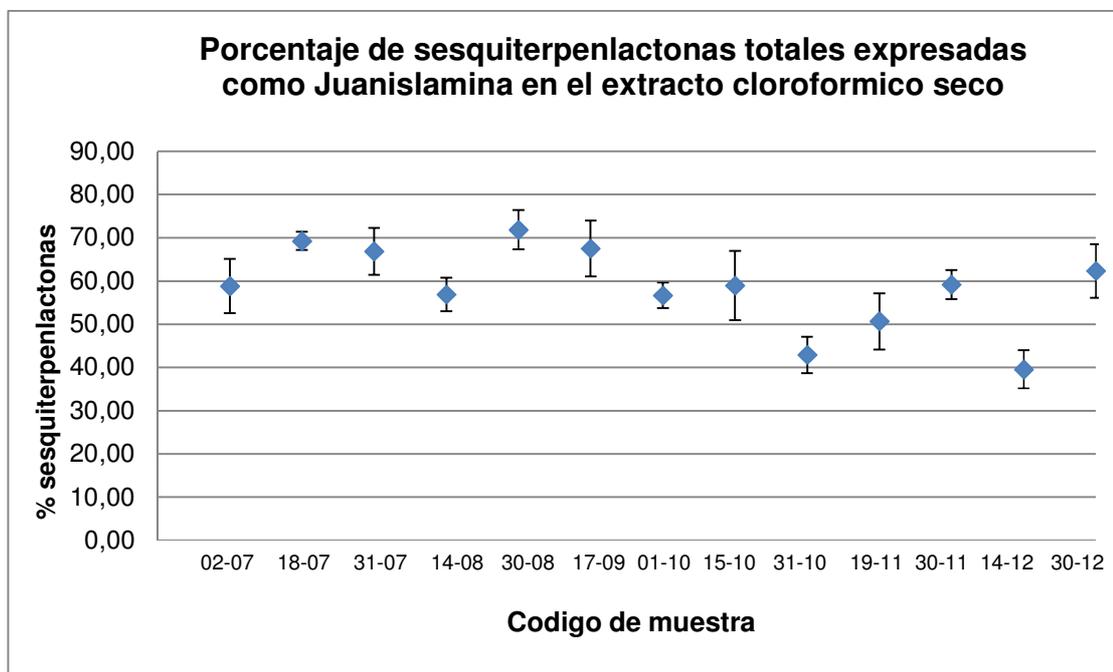


Fig. N° 30. Porcentaje de STLs totales en cada uno de los ECS.

El contenido de sesquiterpenlactonas totales en el ECS es de mucha importancia ya que indica el contenido de marcador activo en el extracto que puede ser usado posteriormente para la formulación y elaboración de un fitofármaco. Así, en la **Tabla N° 9** observamos que los promedios de sesquiterpenlactonas oscilan entre 0.7030 g y 1.1993 g que corresponde a la muestra 14-12 y la muestra 30-08 respectivamente.

En cuanto porcentajes de sesquiterpenlactonas totales expresados como Juanislamina en ECS, en la **Tabla N° 10** y la **Fig. N° 30**, se observan promedios que van de 39.58% hasta 71.85%.

En cuanto al análisis de varianza, este mostro un valor $P= 0.0000$, lo que indica que si existe diferencia significativa en una forma general, entre los porcentajes de sesquiterpenlactonas presentes en cada una de las muestras. La prueba de suposición de la normalidad, mostró una recta al graficar los porcentajes contra

residuos, justificando así el análisis de las varianzas. Los residuos demuestran independencia, ya que la gráfica de residuos contra el tiempo muestra dispersión uniforme en ambos extremos. Y finalmente, el test de rangos múltiples para los porcentajes utilizando el método LSD demuestra los porcentajes que tienen más diferencia significativa entre las distintas muestras y permite reforzar lo concluido anteriormente sobre los mejores porcentajes obtenidos de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en extracto clorofórmico seco. (Ver **ANEXO N° 4**)

5.6.2.1 Porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en extracto clorofórmico seco durante los doce meses del año 2012.

A continuación se analizan los datos obtenidos durante los 12 meses en los que se realizó el estudio, combinando los resultados obtenidos en la investigación anterior⁽⁴⁵⁾ con los obtenidos en la presente investigación.

Tabla N° 11. Porcentaje promedio de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina presentes en ECS e intervalos de confianza al 95% en las 24 muestras del año 2012.

Numero	Código d muestra	Porcentaje promedio	IC 95%
1.	17-01	66,34	4,15
2.	02-02	71,59	4,43
3.	15-02	90,02	10,99
4.	01-03	84,31	4,72
5.	15-03	85,64	4,36
6.	30-03	89,19	3,07
7.	15-04	89,00	4,11
8.	02-05	50,25	5,81
9.	15-05	67,93	3,97
10.	01-06	57,83	2,15
11.	15-06	63,49	1,09

Tabla N° 11. (Continuación)

Numero	Código d muestra	Porcentaje promedio	IC 95%
12.	02-07	58,85	6,28
13.	18-07	69,28	2,12
14.	31-07	66,84	5,45
15.	14-08	56,90	3,89
16.	30-08	71,85	4,55
17.	17-09	67,53	6,45
18.	01-10	56,66	2,93
19.	15-10	58,95	8,02
20.	31-10	42,92	4,20
21.	19-11	50,67	6,54
22.	30-11	59,18	3,39
23.	14-12	39,58	4,42
24.	30-12	62,33	6,23
Promedio	Año 2012	65,71	-----

La **Tabla N° 11** refleja un panorama general del porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresados como Juanislamina presentes en extractos clorofórmicos secos durante los doce meses del año 2012.

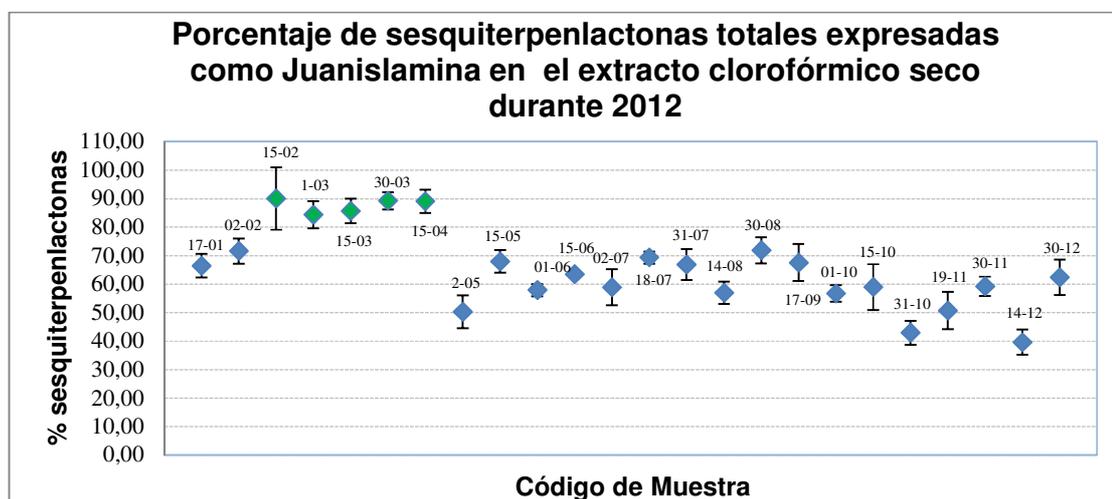


Fig. N° 31. Porcentaje promedio de STLs totales expresadas como Juanislamina en cada uno de los ECS de las veinticuatro muestras correspondientes a los doce meses del 2012, junto con sus intervalos de confianza al 95%.

En la **Fig. N° 31** se muestra gráficamente la variación de STLs totales expresadas como Juanislamina en el ECS durante todo el 2012. Estos datos son de suma importancia si se pretende formular fitofármacos a partir de un extracto estandarizado de *C. urticifolia*, ya que se debe elegir la mejor época del año para realizar las respectivas recolectas vegetales.

También se calculó el promedio de todos los porcentajes obteniéndose un valor de 65.71% de STLs totales expresadas como Juanislamina presente en el ECS durante todo el año 2012.

En cuanto al análisis de varianza, mostro un valor $P= 0.0000$, lo que indica que si existe diferencia significativa en una forma general, entre los porcentajes de las muestras. La prueba de suposición de la normalidad, mostro una recta al graficar los porcentajes contra residuos, justificando así el análisis de las varianzas. Los residuos demuestran independencia ya que la gráfica de residuos contra el tiempo muestra dispersión uniforme en ambos extremos. Y finalmente, el test de rangos múltiples para los porcentajes usando el método LSD demuestra los porcentajes que tienen más diferencia significativa entre las distintas muestras y permite reforzar lo concluido anteriormente sobre los mejores porcentajes obtenidos de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en extracto clorofórmico seco. (Ver **ANEXO N° 4**)

5.6.3 Porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en material vegetal seco

Este dato es importante pues revela la cantidad de sesquiterpenlactonas que produce *C. urticifolia* en sus hojas. Con estos datos se determinó el periodo de mayor producción de metabolitos secundarios activos.

Tabla N° 12. Porcentajes de sesquiterpenlactonas totales expresados como Juanislamina en el material vegetal seco para las trece muestras.

		CODIGO DE MUESTRAS													
		Replica	02-07	18-07	31-07	14-08	30-08	17-09	01-10	15-10	31-10	19-11	30-11	14-12	30-12
Porcentaje de sesquiterpenlactonas en extracto seo	1	5.27	5.36	5.45	4.51	5.51	4.77	5.26	5.73	3.35	4.31	4.50	3.76	3.95	
	2	5.28	5.64	6.15	4.74	5.55	4.85	4.60	5.19	4.41	4.44	4.76	3.21	4.91	
	3	5.09	5.86	5.39	4.33	6.27	5.65	4.57	4.96	4.21	3.83	4.57	2.90	5.23	
	4	4.12	5.49	5.01	4.82	6.45	5.97	4.70	4.84	3.65	4.12	3.98	3.67	5.35	
	5	5.83	5.72	4.86	4.37	6.18	5.97	4.73	3.67	3.74	5.54	4.55	4.01	5.10	
Media		5.12	5.61	5.37	4.55	5.99	5.44	4.78	4.88	3.87	4.45	4.47	3.51	4.91	
DESV		0.62	0.20	0.50	0.22	0.43	0.59	0.28	0.76	0.43	0.65	0.29	0.45	0.56	
STD															
IC 95%		0.55	0.17	0.44	0.19	0.38	0.52	0.25	0.66	0.38	0.57	0.26	0.39	0.49	

N (número de repeticiones): 5

95% IC = Intervalo de confianza al 95% **DEV STD** = Desviación estándar

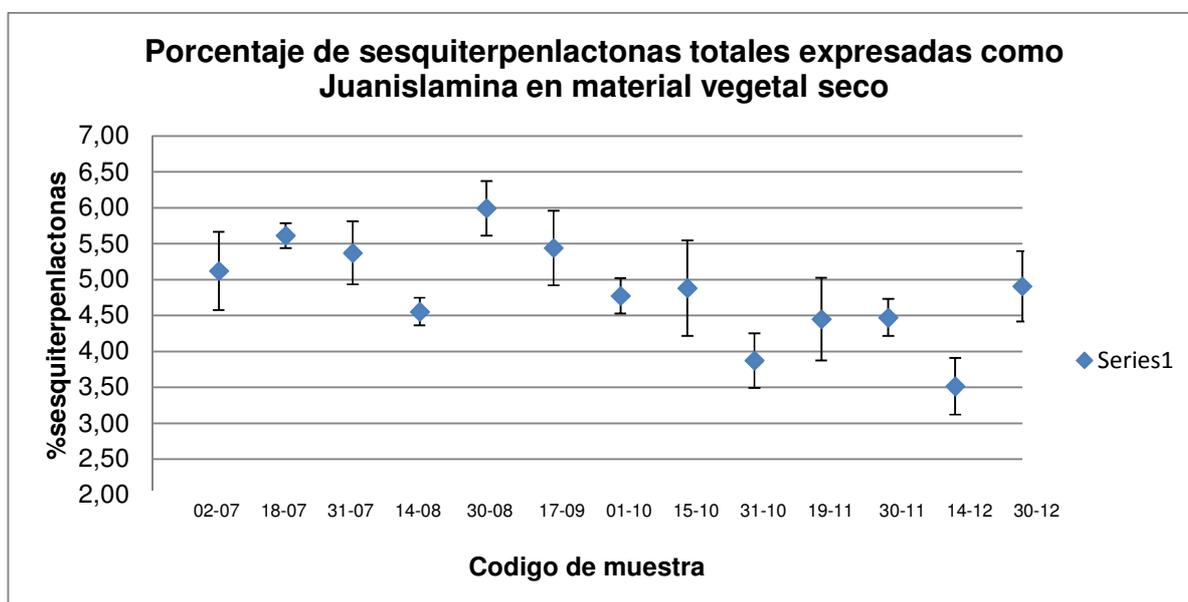


Fig. N° 32. Porcentaje de STLs totales expresados como Juanislamina en material vegetal para las trece muestra con sus respectivos intervalos de confianza al 95%.

En la **Tabla N° 12** y **Fig. N° 32** se puede observar que los promedios de los porcentajes de sesquiterpenlactonas totales expresados como Juanislamina en el material vegetal seco se encuentran entre 3.51% y 5.99%

En cuanto al análisis de varianza, este mostro un valor $P= 0.0000$, lo que indica que si existe diferencia significativa en una forma general, entre los porcentajes de las muestras. La prueba de suposición de la normalidad, mostro una recta al graficar los porcentajes contra residuos, justificando así el análisis de las varianzas. Los residuos demuestran independencia ya que la gráfica de residuos contra el tiempo muestra dispersión uniforme en ambos extremos. Y finalmente, el test de rangos múltiples para los porcentajes usando el método LSD demuestra los porcentajes que tienen más diferencia significativa entre las distintas muestras y permite reforzar lo concluido anteriormente sobre los mejores porcentajes

obtenidos de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en material vegetal seco. Además importante destacar que tanto desviación estándar e intervalo de confianza al 95% no sobrepasaron la unidad por lo que podemos afirmar que los promedios son bastante precisos y existe menos dispersión. (Ver **ANEXO N° 4**)

5.6.3.1 Porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresados como juanislamina en material vegetal seco durante los doce meses del 2012

Tabla N° 13. Porcentaje promedio de STLs totales expresados como Juanislamina presentes en material vegetal seco en el año 2012.

Numero	Código de muestra	Porcentaje promedio	IC 95%
1	17-01	5.66	0.35
2	02-02	4.54	0.28
3	15-02	5.02	0.61
4	01-03	5.77	0.37
5	15-03	6.74	0.34
6	30-03	8.06	0.28
7	15-04	6.63	0.31
8	02-05	3.71	0.43
9	15-05	4.96	0.29
10	01-06	2.84	0.11
11	15-06	4.44	0.08
12	02-07	5.12	0.55
13	18-07	5.61	0.17
14	31-07	5.37	0.44
15	14-08	4.55	0.19
16	30-08	5.99	0.38
17	17-09	5.44	0.52
18	01-10	4.78	0.25
19	15-10	4.88	0.66
20	31-10	3.87	0.38
21	19-11	4.45	0.57
22	30-11	4.47	0.26
23	14-12	3.51	0.39
24	30-12	4.91	0.49
Promedio	Año 2012	5.05	----

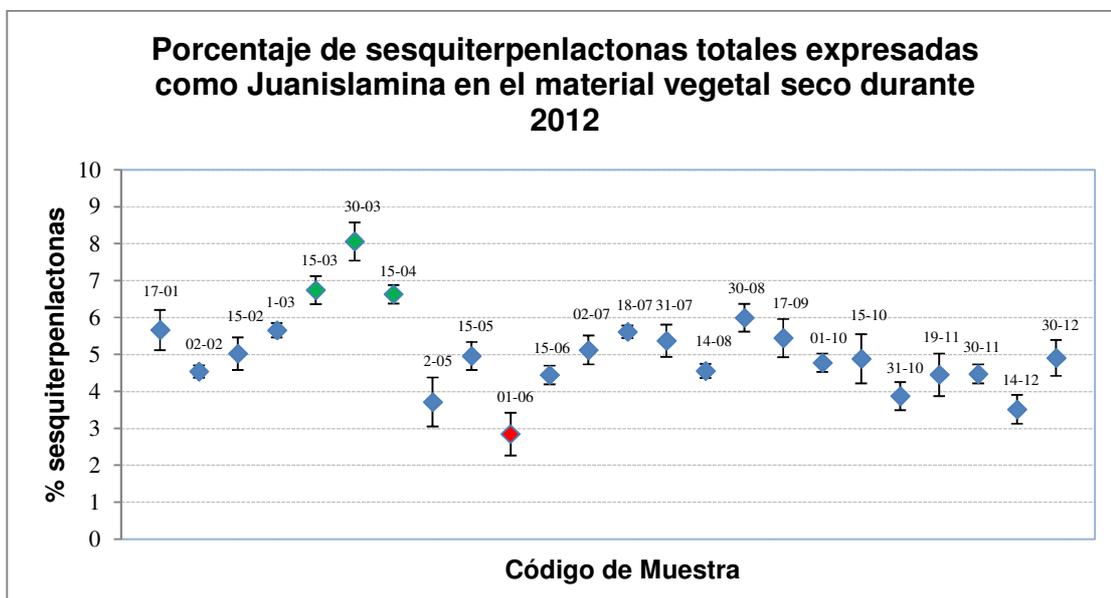


Fig. N° 33. Porcentaje promedio de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en material vegetal para cada una de las veinticuatro muestras recolectadas en los doce meses del 2012 junto con sus intervalos de confianza al 95%.

La **Tabla N° 13** y **Fig. N° 33** muestran el comportamiento de *C. urticifolia* en cuanto a producción de sesquiterpenlactonas durante el año 2012 observamos los promedios de los porcentajes de sesquiterpenlactonas totales expresados como Juanislamina presentes en material vegetal de las muestras recolectadas en el año 2012.

Estos datos son de suma importancia si el fin es la formulación de fitofármacos a través del material vegetal seco molido, ya que se debe elegir la mejor época del año para realizar las recolectas vegetales.

En cuanto al análisis de varianza, este mostró un valor $P= 0.0000$, lo que indica que si existe diferencia significativa en una forma general, entre los porcentajes de las muestras. La prueba de suposición de la normalidad, mostro una recta al

graficar los porcentajes contra residuos, justificando así el análisis de las varianzas. Los residuos demuestran independencia ya que la gráfica de residuos contra el tiempo muestra dispersión uniforme en ambos extremos. Y finalmente, el test de rangos múltiples para los porcentajes usando el método LSD demuestra los porcentajes que tienen más diferencia significativa entre las distintas muestras y permite reforzar lo concluido anteriormente sobre los mayores porcentajes obtenidos de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en material vegetal seco. (Ver **ANEXO N° 4**)

5.6.4 Estudio de toxicidad oral a dosis repetidas de 28 días en ratones NIH del extracto clorofórmico de *C. urticifolia*

Si bien el estudio de la toxicidad del extracto clorofórmico de hojas de *C. urticifolia* no fue parte de esta memoria de Tesis de Licenciatura, es apropiado mencionar los resultados obtenidos en el proyecto 09.05, debido al uso que la población hace de esta especie vegetal en el tratamineto de diversos padecimientos.

El estudio de la toxicidad se llevo a cabo a dosis repetidas (2000 mg/Kg) durante 28 días. Al finalizar se apreció que los grupo tratados con el extracto sufrieron una disminución de peso entre 2.21 y 7.88 %, lo que representa diferencia estadísticamente significativa respecto a la ganancia de peso observada en los animales no tratados con el extracto, mostrando sin lugar a dudas el potencial toxico de esta especie vegetal. Respecto al análisis de los órganos internos, se pudo observar una disminución del peso de corazón, riñón, bazo e intestino delgado en el grupo de animales tratados con el extracto clorofórmico de *C. urticifolia*. Evidenciando un efecto adverso a causa de la administración de la sustancia de ensayo, ya que ha sido sugerido que la

presencia de daños toxicológicos en órganos internos debe ser acompañado por cambios significativos en el peso de los órganos.

En el caso de los valores de la bioquímica sanguínea, llama la atención el **aumento significativo de los valores promedio reportados para creatinina**, lo que permite suponer daño a nivel celular en los riñones; puesto que la creatinina se considera como indicador confiable del daño renal, en casos de que se encuentre aumentado su valor, esto se puede deber a la presencia de sesquiterpenlactonas en el extracto clorofórmico.

Por lo que se determinó suficiente evidencia para no usar esta especie vegetal de manera popular ni en la formulación de fitofármacos debido a los indicios de toxicidad a nivel renal.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

- 1) Todas las muestras presentaron perfiles cromatográficos muy similares, al realizar la identificación de sesquiterpenlactonas totales por cromatografía en capa fina, observándose manchas con R_f muy similares a la de los tres marcadores
- 2) Se identificó la presencia de sesquiterpenlactonas en los extractos de ***Calea urticifolia*** recolectada en el periodo correspondiente a julio a diciembre de 2012 a través de espectroscopía ultravioleta, obteniéndose máximos de absorbancia que están en los rangos característicos para este tipo de compuestos.
- 3) El análisis de varianza demostró en forma general que existe diferencia significativa entre las concentraciones de sesquiterpenlactonas en las diferentes muestras, mostrando los periodos donde es mayor esa diferencia y en donde no es significativa.
- 4) ***Calea urticifolia*** presenta variaciones en la producción de sesquiterpenlactonas a lo largo de los 12 meses del año, posiblemente debido a un mecanismo de defensa de esta especie vegetal frente a herbívoros, microorganismos, en la competencia con otras especies vegetales, además del clima, suelo, floración y fertilización.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

- 1) Realizar cuantificaciones de sesquiterpenlactonas de ***Calea urticifolia*** en otras zonas geográficas del país; para establecer si la producción de estos metabolitos varía según la zona.
- 2) Hacer una cuantificación e identificación de las sesquiterpenlactonas presentes en ***Calea urticifolia*** por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para poder comparar el método espectroscópico UV-Vis y validar los resultados.
- 3) Llevar a cabo estudios de cuantificación de sesquiterpenlactonas, en otras especies del genero ***Calea***, con el fin de explorar la producción de estos metabolitos.
- 4) Se recomienda tomar en cuenta la información obtenida por medio del diseño estadístico para concluir en que época del año ***Calea urticifolia*** produce mayor cantidad de sesquiterpenlactonas.
- 5) Planificar a futuro un estudio a fin de determinar la forma en que afecta la edad de la planta en la producción de sus metabolitos secundarios activos.
- 6) No se recomienda el uso de esta especie vegetal de manera popular ni en la formulación de fitofármacos debido a la presencia de toxicidad a nivel renal, lo que se recoge en el proyecto CIC-UES 09.05, que financio esta memoria de Tesis de Licenciatura.

BIBLIOGRAFIA

1. Bohlmann F. y Jakupovic J. Neue germacranolide aus ***Calea urticifolia***. Phytochemistry. 1978; 18: 119-123.
2. Borges del Castillo J, Ferrero MTM, Luis FR, Bueno PR, Leonor NL y Arevalo SC. 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 MTM, Luis FR, Bueno PR, Leonor NL y Portillo de Rivas RM. Compuestas salvadoreñas I. caleina D y 2,3-epoxicaleina D, dos germacranólidos de la ***Calea urticifolia***. Anales de Química. 1980; 77: 1980-1982
4. Crouch Stanley R, Holler F, James Skoog, Douglas A, West Donald M. **Química Analítica**. 3ª Edición en español. México, D.F. Mc Graw Hill. 2001. Pag. 615.
5. Dewick PM. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. Third Edition, John Wiley & Sons, Ltd. USA. 2009 Pág. 210-213.
6. Dias DA, Urban S, y Roessner U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites* 2012; 2: 303-336.
7. Domínguez XA, Métodos de investigación fitoquímica, México, Editorial Limusa.1973. Pág. 93-109.

8. 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). 2008.
9. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE) CORE EUDICOTILEDÓNEAS- Asterídeas-Euasterídeas II: Asterales: Asteraceae (Compositae) [fecha de acceso 24 de Marzo de 2013] Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/diversidadv/documentos/ANGIOSPERMAS/Asterideas/Euasterideas%20II%20o%20Campanulideas/Asterales/3-Asteraceae.pdf>
10. Farmacopea ufficiale de lla repubblica Italiana. Ottava edizione. Roma, Italia. Instituto Poligráfico de llo statu P.V. II Volume, 390-393, 1972.
11. Gallego CI, Meléndez D I y Pérez GE. 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.
12. Gómez Barrera M. 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; 2010. Pag. 20-39.

13. González Ayala JC. Botánica medicinal popular, El Salvador, Centroamérica, CUSCATLANIA, Diciembre 2002. Pág. 32,39, 42, 47, 52, 64, 67, 72, 98, 123. (2ª Edición).
14. Gupta PM. 270 Plantas medicinales Iberoamericanas, Bogotá Colombia, Editorial Presencia Ltda 1995 Pág. 93-95.
15. Harvey Alan L. **Natural products in drug discovery.** *Drug Discovery Today* [internet] 2008. [fecha de acceso 24 de Marzo de 2013]13: 19-20. Disponible en:
<http://faculty.ksu.edu.sa/18856/Articles/Natural%20products%20in%20drug%20discovery.pdf>
16. Herrera-Parra E, Cristóbal-Alejo J, Tún-Suárez JM, Gamboa-Angulo y Marbán-Mendoza N. Extractos acuosos de ***Calea urticifolia*** para el control de ***Meloidogyne incognita***. *Nematrónica* 2009; 39: 289-296.
17. Herz W. y Kumar N. Sesquiterpenelactones of ***Calea zacatechichi*** and ***Calea urticifolia***. *Phytochemistry*. 1980; 19: 593-597.
18. Jan-Willem K, Maurice CRF, Maaikje J, Aede G, y Harro JB. 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.
19. Jardín Botánico La Laguna, Sección Herbario Jardín Botánico la Laguna, **Herbario LAGU**, Antiguo Cuscatlán, La Libertad, El Salvador.

20. Johnst PF. **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.
21. Kuklinski C. Farmacognosia: Métodos generales de obtención de los principios activos. Barcelona, España: Ediciones Omega, S.A; 2003. Pág. 32-41.
22. Lagos JA. 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.
23. Leonor Genovez AN. Estudio inicial de cuatro germacranólidos de la *Calea urticifolia*, [Trabajo de graduación] San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia; 1980. Pág. 10.
24. 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.
25. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales, Perú, Pontificia Universidad Católica del Perú, Segunda edición. 1994. Pág. 53-63; 265-269.
26. Lucero BG. y Dehesa GM. FORMULACIÓN DE UN FITOFÁRMACO A PARTIR DEL EXTRACTO FLUIDO DE LAS HOJAS DE *Maytenus laevis* R. "CHUCHUGUAZO" [internet] [fecha de acceso 19 de septiembre de 2013] 55-59. Disponible en:

<http://www.unibe.edu.ec/wp-content/uploads/2013/04/Formulacion-de-un-fitofarmaco.pdf>

27. Mahabir PG. 270 Plantas medicinales Iberoamericanas, Bogotá, Colombia: Editorial Presencia Ltda; 1995. 93-95 p.
28. Marcano D. y Hasegawa M. Fitoquímica orgánica, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 2002. Pág. 54-57.
29. Martínez Martínez A. Sesquiterpenlactonas, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 2011 [Fecha de acceso 24 de Febrero de 2013] Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/slactonas2001.pdf>
30. Matsuura N, Yamada M, Suzuki H, Hasegawa N, Kurosaka C, Ubukata M. *et. al.* Inhibition of preadipocyte differentiation by germacranolides from ***Calea urticifolia*** in 3T3-L1 cells. Biosci. Biotech. Biochem. 2005; 69: 2470-2474.
31. Nakagawa Y, Iinuma M, Matsuura N, Yi K, Naio M, Nakayama T. *et al.* 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.
32. Núñez MJ, Bazzocchi IL, Martínez ML, Rodríguez ML, Torres DF, Guzmán JA. *et al.* Especies de la flora salvadoreña como fuente de nuevos agentes terapéuticos, A/030031/10 Proyecto de Cooperación

Interuniversitaria e Investigación Científica PCI/AECID, 2011.

33. Ohguchi S, Ito M, Yokoyama K, Inuma M, Itoh T, Nozawa Y. *et al.* Effects of sesquiterpene lactones on melanogenesis in mouse B16 melanoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2009; 32: 308-310.
34. 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 [Tesis de Maestría] San Luis Potosí: Universidad Autónoma de Luis Potosí. Facultad de Ciencias Químicas, Ingeniería y Medicina; 2011. Pág. 19-21
35. Pruski J. 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.
36. Ramirez AM, Saillard N, Yang T, Franssen MCR, Bouwmeester, HJ, Jongsma MA. Biosynthesis of SesquiterpeneLactones in *Pyrethrum* (***Tanacetum cinerariifolium***), *Plos One*, 8(5), 1-13, 2013.
37. 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.
38. Salguero RM, Valencia CM, y Vásquez ME. Estudio etnobotánico de plantas medicinales en el municipio de Santo Tomás [Trabajo de Graduación] San Salvador: Universidad de El Salvador; 1994.

39. 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/browse/A/Compositae/Calea/>
40. UNAM. **Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana.** [Base de datos en internet] México: BIBLIOTECA DIGITAL de la medicina tradicional Mexicana [fecha de acceso el 26 de marzo de 2013] Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7856>
41. Umeruma K, Itoh T, Hamada N, Fujita Y, Akao Y, Nozawa Y. *et al.* Preconditioning by sesquiterpene lactone enhances H₂O₂-induced Nrf2/ARE activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 368: 948-954.
42. Vargas D, Ober AG, Fischer NH. Sesquiterpene lactones from three populations of ***Calea urticifolia***. Lactonas sesquiterpénicas de *Calea urticifolia* aisladas de tres poblaciones. *Revista Latinoamericana de Química.* 1989, 20(1): 11.
43. Villacorta Hernández J. 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; 2013.
44. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. Valle Hermoso, Madrid, España: Editorial Síntesis; 1999. Pág. 84-94.

45. Wagner H. Futuro en la investigación en fitoterapia: tendencias y retos. *Revista de fitoterapia* 2006; 6(2): 101-117.
46. Wayne. W. Daniel. Tercera edición. Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la salud.
47. Yamada M, Matsuura N, Hiroto S, Chihiro K, Naoko H, Makoto U. et al. Germacranolides from ***Calea urticifolia***. *Phytochemistry*. 2004; 65: 3107-3111.

GLOSARIO

Carrasposas: Aspero que es rasposo al tacto ⁽⁹⁾

Concentración inhibitoria 50% (IC₅₀): Concentración de un compuesto necesaria para reducir el crecimiento de la población de organismos, incluyendo células eucarióticas, en un 50% in vitro ⁽⁴¹⁾.

Cuche: regionalismo empleado en El Salvador para identificar al cerdo una especie de mamífero artiodáctilo de la familia Suidae. ⁽¹³⁾

Dinucleotido de Adenina Nicotinamidasas (NAD⁺): Coenzima oxidativa de la fosforilación oxidativa de los organismos. ⁽⁴³⁾

Dinucleotido de Adenina Nicotinamida Reductasa (NADPH): Es la forma reducida en la reacción de óxido-reducción (Redox) del NADP⁺. Implicada en el anabolismo celular, interviene en la síntesis de ácidos nucleicos y de lípidos. Es una coenzima que en el ciclo de Calvin, con gasto de ATP, fija el dióxido de carbono (CO₂) en carbono orgánico con liberación de oxígeno. El NADPH se obtiene tanto en la fase luminosa de la fotosíntesis (en vegetales), como en la fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato (en animales) ⁽⁴¹⁾.

Elemento Responsable antioxidante (ARE): Elemento bioquímico responsable de la optimización de los procesos antioxidantes ⁽⁴¹⁾.

Ensayo MTT: Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular.

La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang⁽⁴¹⁾.

Espectroscopia UV-Vis: Es una espectroscopia de emisión de fotones y una espectrofotometría. Utilizar radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético, es decir, una longitud de onda entre 380nm y 780nm. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas.

La espectroscopia UV-visible se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas, y además, para determinar el contenido y fuerza de una sustancia⁽⁴⁾.

Farnesil Difosfato: Precursor biogénico de todas las sesquiterpenlactonas⁽⁵⁾.

Grupo difosfato (OPP): Son grupos que contienen dos iones fosfato los cuales tienen la facilidad de separarse de los compuestos orgánicos y llevarse el par de electrones que tienen compartido⁽⁵⁾.

Hirsuto: áspero y duro^{(9), (19)}.

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⁽⁷⁾.

Marcador activo: Son constituyentes o grupos de constituyentes que son generalmente aceptados para contribuir a la actividad terapéutica⁽⁷⁾.

Marcador analítico: Son constituyentes o grupos de constituyentes que sirven para fines analíticos ⁽⁷⁾.

Piloso: Que posee mucho pelo ^{(9), (19)}.

Penca: Nombre que se da a las hojas de ciertos agaves. ⁽¹³⁾

Sesquiterpenlatona: 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 clasificación ⁽²⁹⁾.

Tricomas: Excrecencias de origen epidérmico y de formas muy variables, y pueden ser glandulares o no. Pueden hallarse vivos o muertos a su madurez y tienen caracteres suficientemente constantes en distintas especies como para llegar a tener mucho valor en la identificación de plantas ^{(9), (19)}.

ANEXOS

ANEXO N° 1

Documento que autentica la especie estudiada como *Calea urticifolia*

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° 34. Documento que autentica la especie estudiada como ***Calea urticifolia***

ANEXO N° 2

Preparación de reactivos, materiales y equipo

Preparación del reactivo revelador de Baljet.

- **Solución A:** 1.0 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol al 95%.
- **Solución B:** 10.0 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua.
- Mezclar en partes iguales y aplicar para revelar.

Preparación del reactivo de Kedde.

- **Solución A:** ácido 3,5 dinitrobenzónico al 2% en metanol.
- **Solución B:** hidróxido de potasio al 5.7% en agua.

Las soluciones se preparan de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo al momento de realizar el ensayo.

Materiales de laboratorio.

- | | |
|------------------------------|-------------------------------|
| - Soxhlet de 250 mL | - Balones volumétricos de 10, |
| - Refrigerantes para Soxhlet | 25 y 500 mL |
| - Embudos | - Base metálica |
| - Beaker de 600 mL | - Pinzas de sostén |
| - Viales | - Pinzas de extensión |
| - Capilares | |

Equipos.

- | | |
|------------------------------|---------------------|
| - Sonicadores | - Balanza analítica |
| - Cámara extractora de gases | - Espectrofotómetro |

ANEXO N° 3

Espectros ultravioleta de las muestras de *Calea urticifolia*

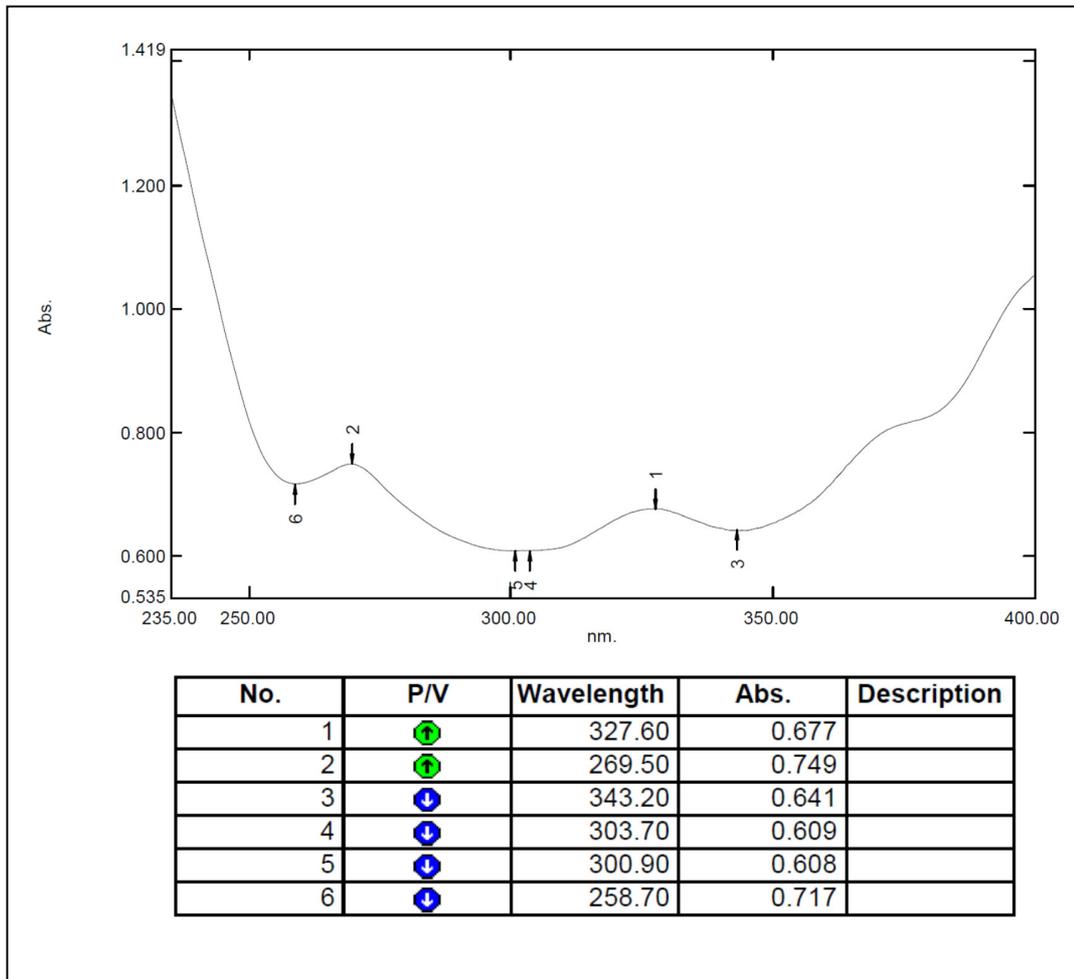


Fig. Nº 35. Espectro UV de la muestra de *Calea urticifolia* código 02-07

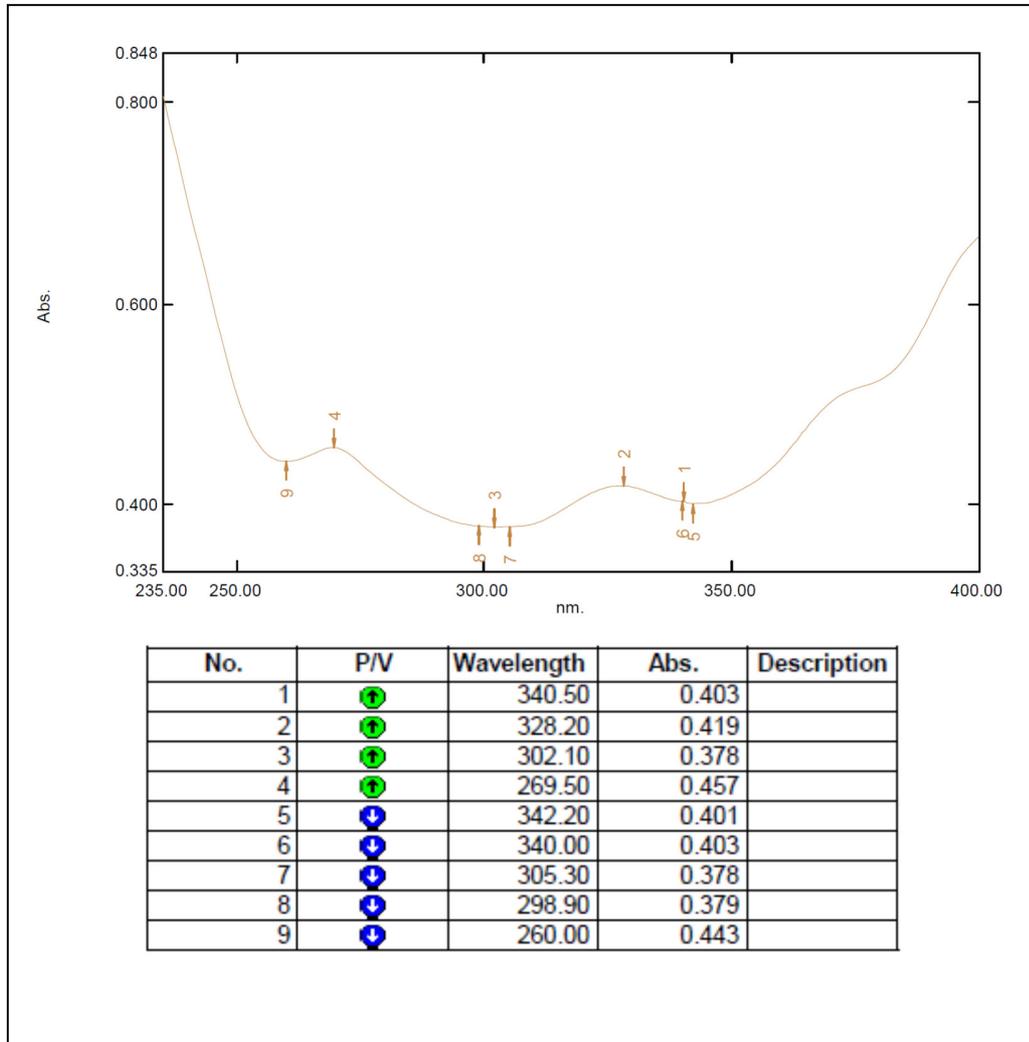


Fig. Nº 36. Espectro UV de la muestra de *Calea urticifolia* código 18-07

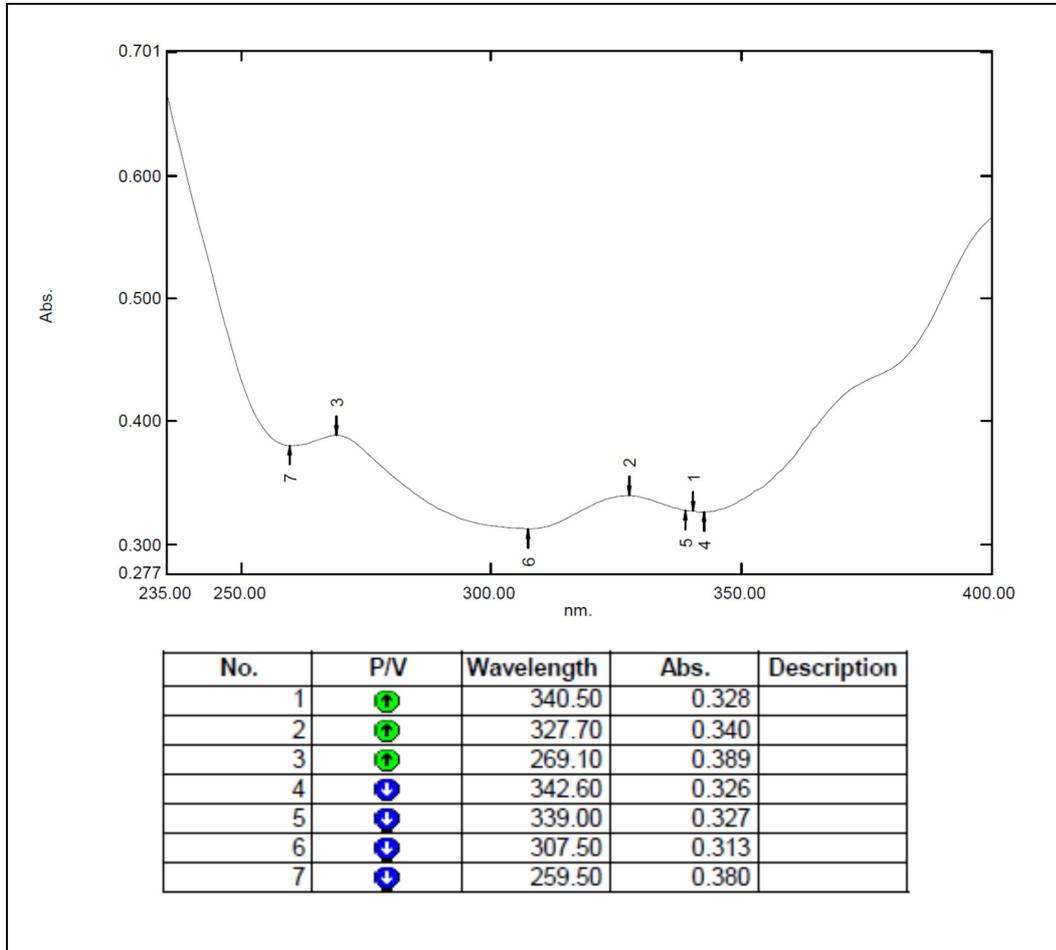


Fig. Nº 37. Espectro UV de la muestra de *Calea urticifolia* código 31-07

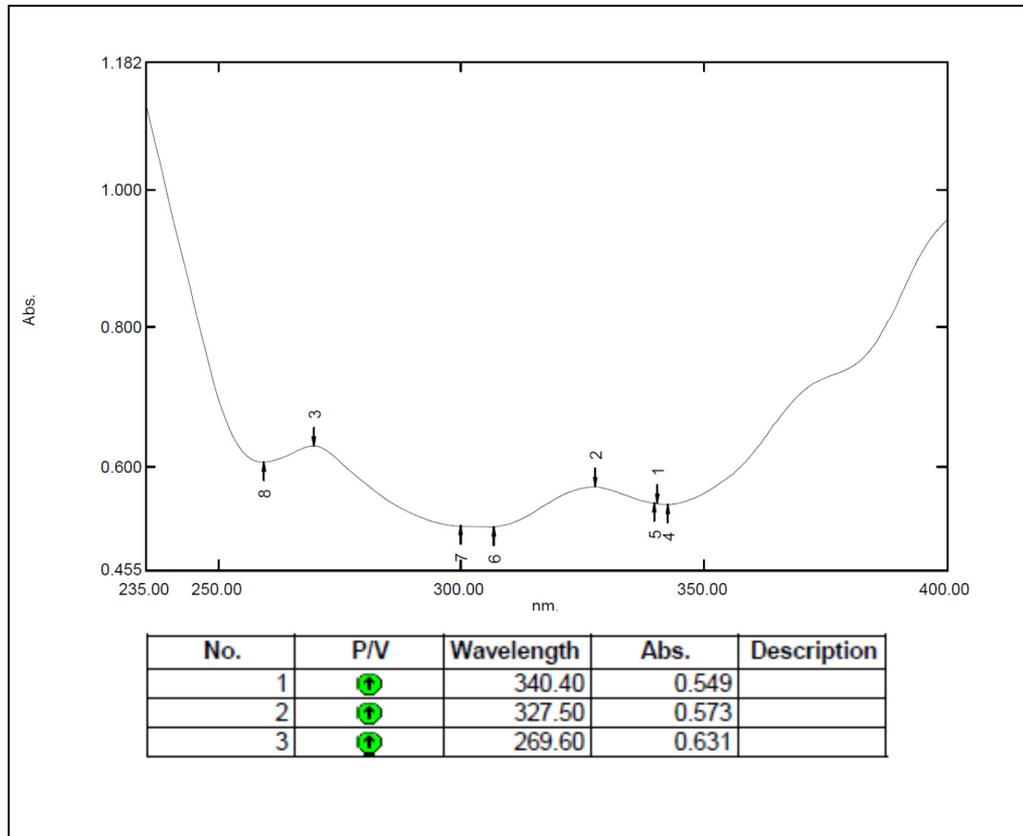


Fig. N° 38. Espectro UV de la muestra de *Calea urticifolia* código 14-08

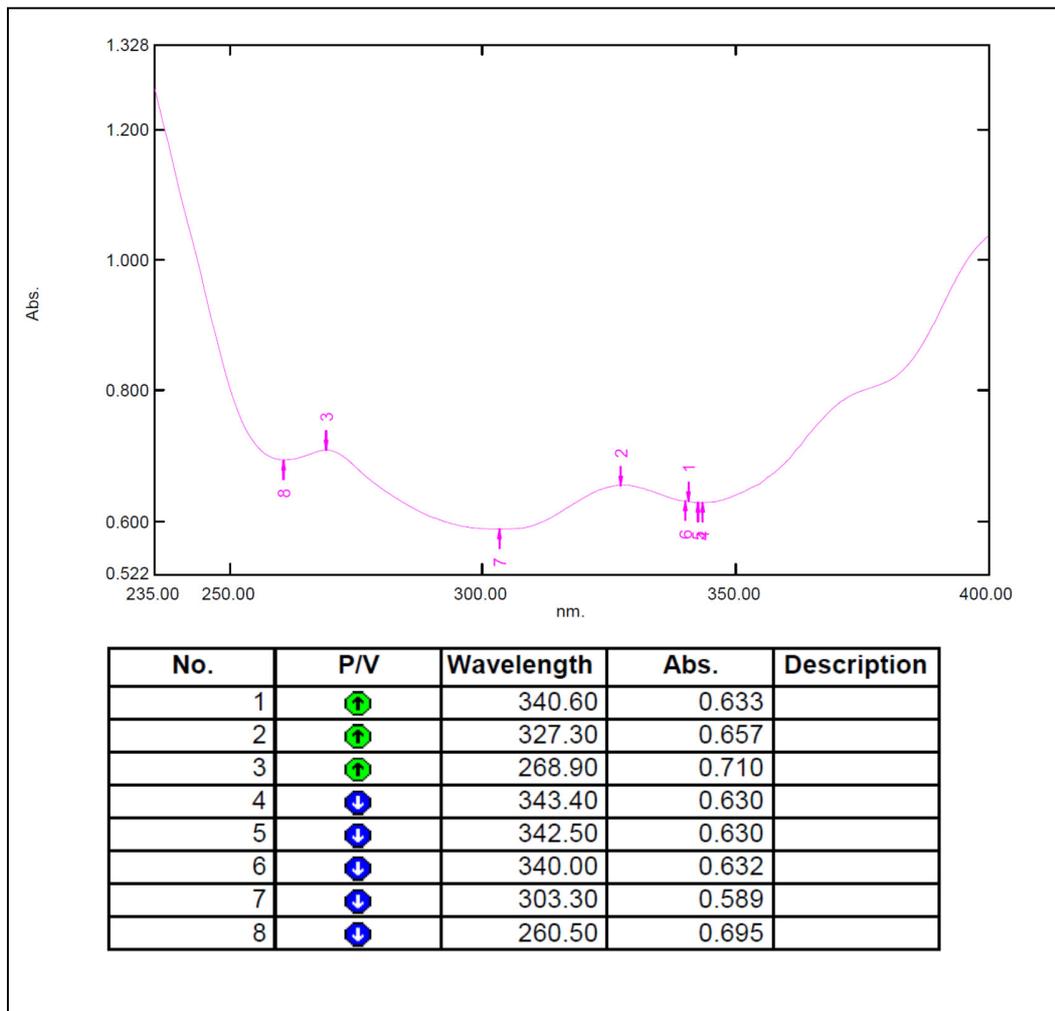


Fig. N° 39. Espectro UV de la muestra de *Calea urticifolia* código 30-08

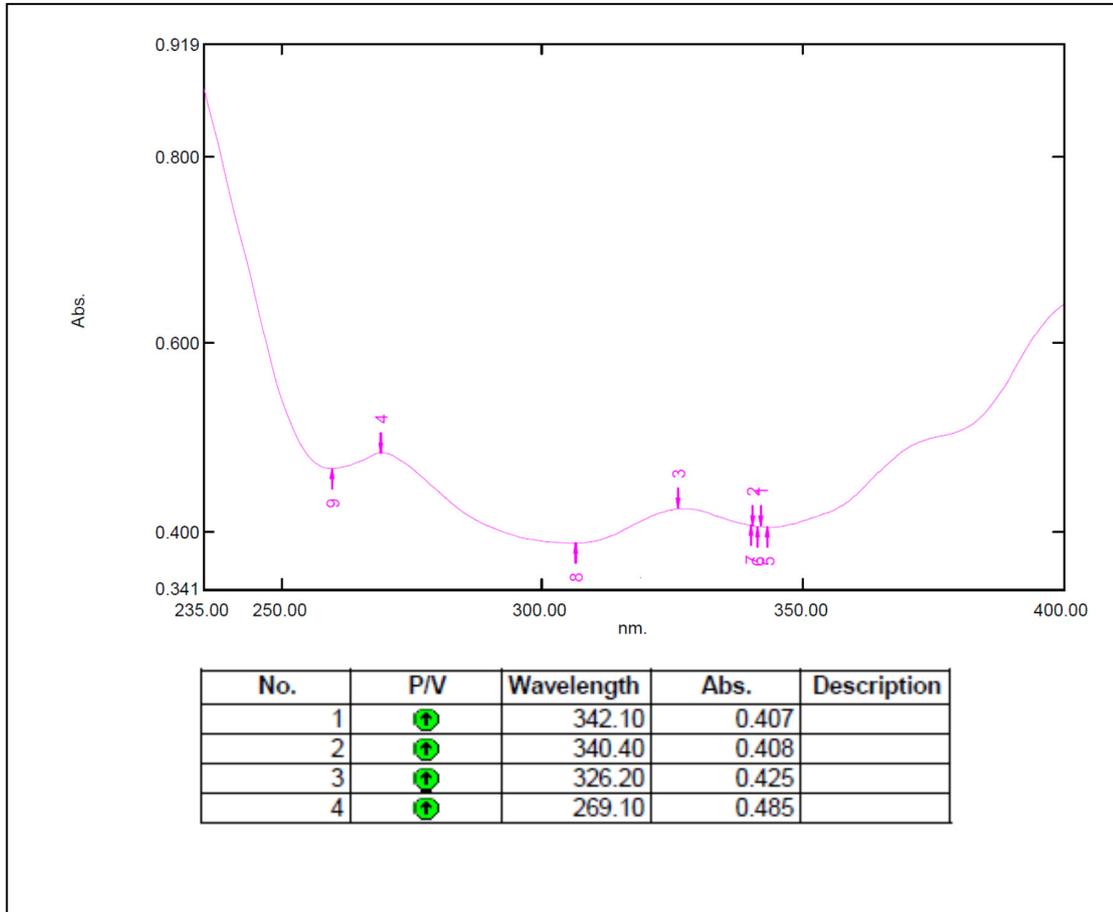


Fig. N° 40. Espectro UV de la muestra de *Calea urticifolia* código 17-09

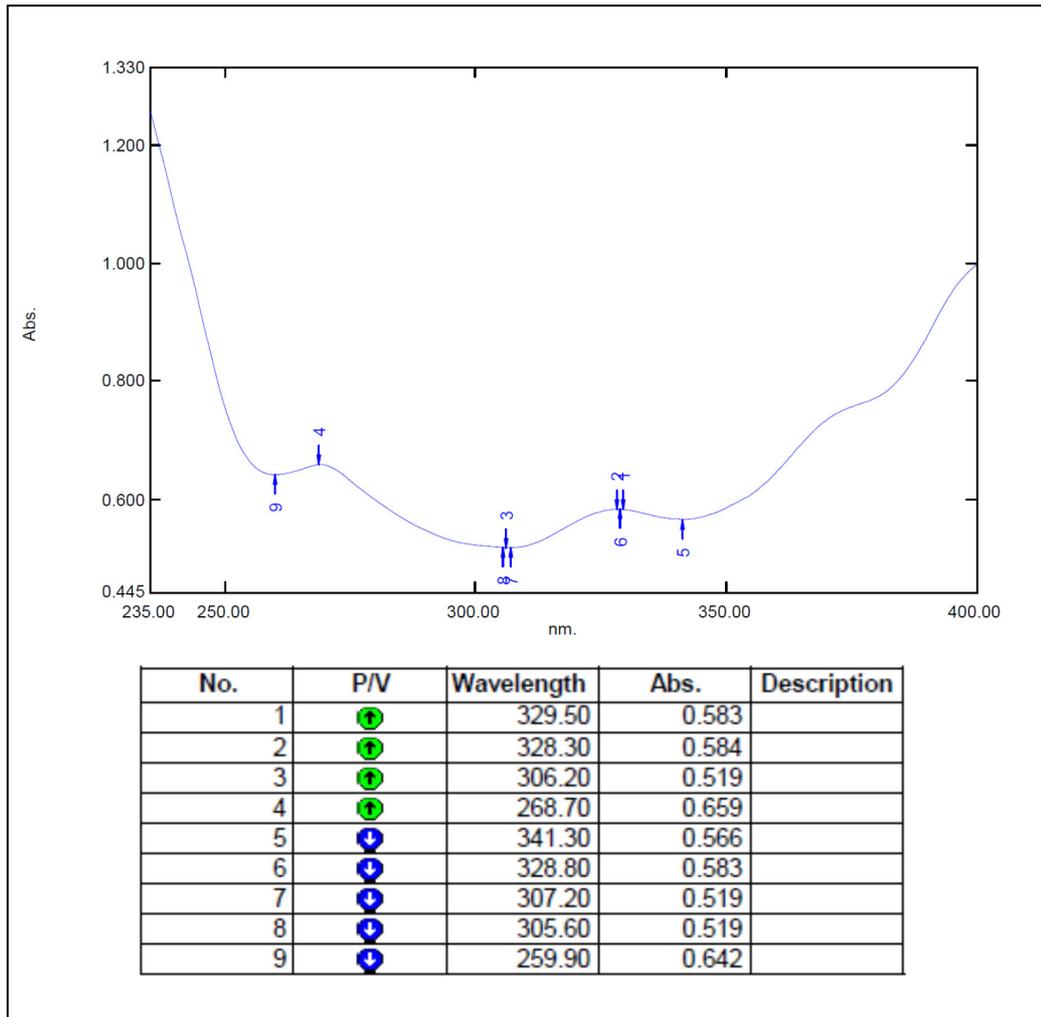


Fig. N° 41. Espectro UV de la muestra de *Calea urticifolia* código 01-10

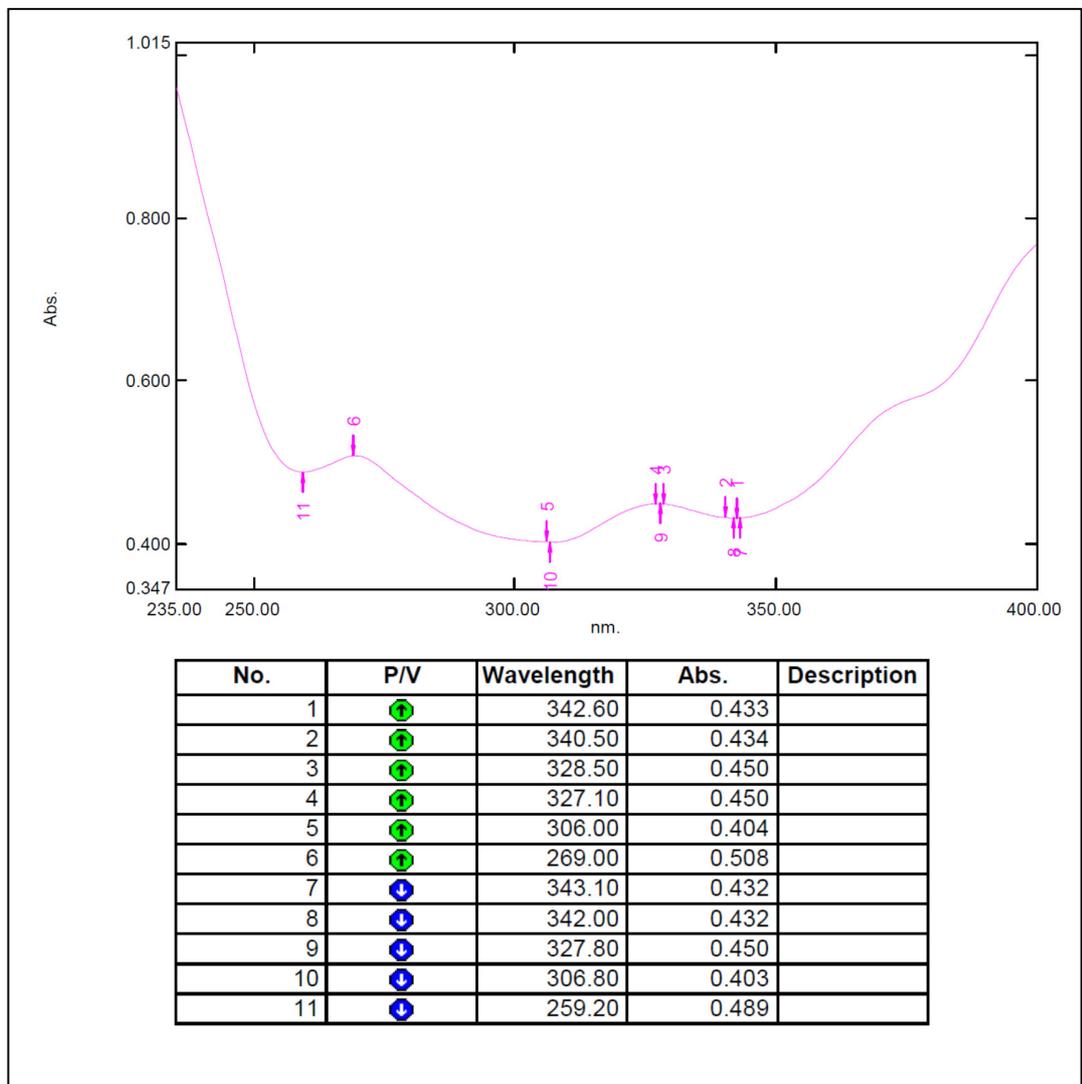


Fig. Nº 42. Espectro UV de la muestra de *Calea urticifolia* código 15-10

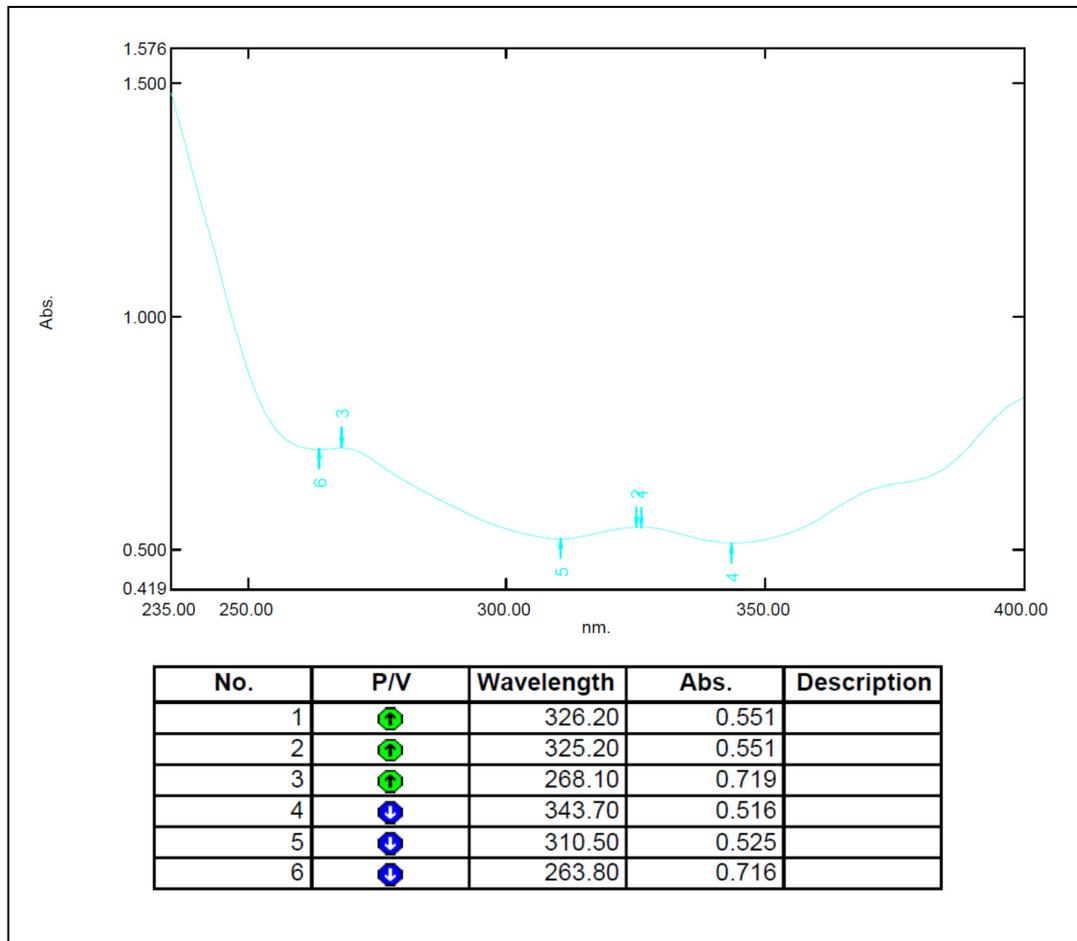


Fig. Nº 43. Espectro UV de la muestra de *Calea urticifolia* código 31-10

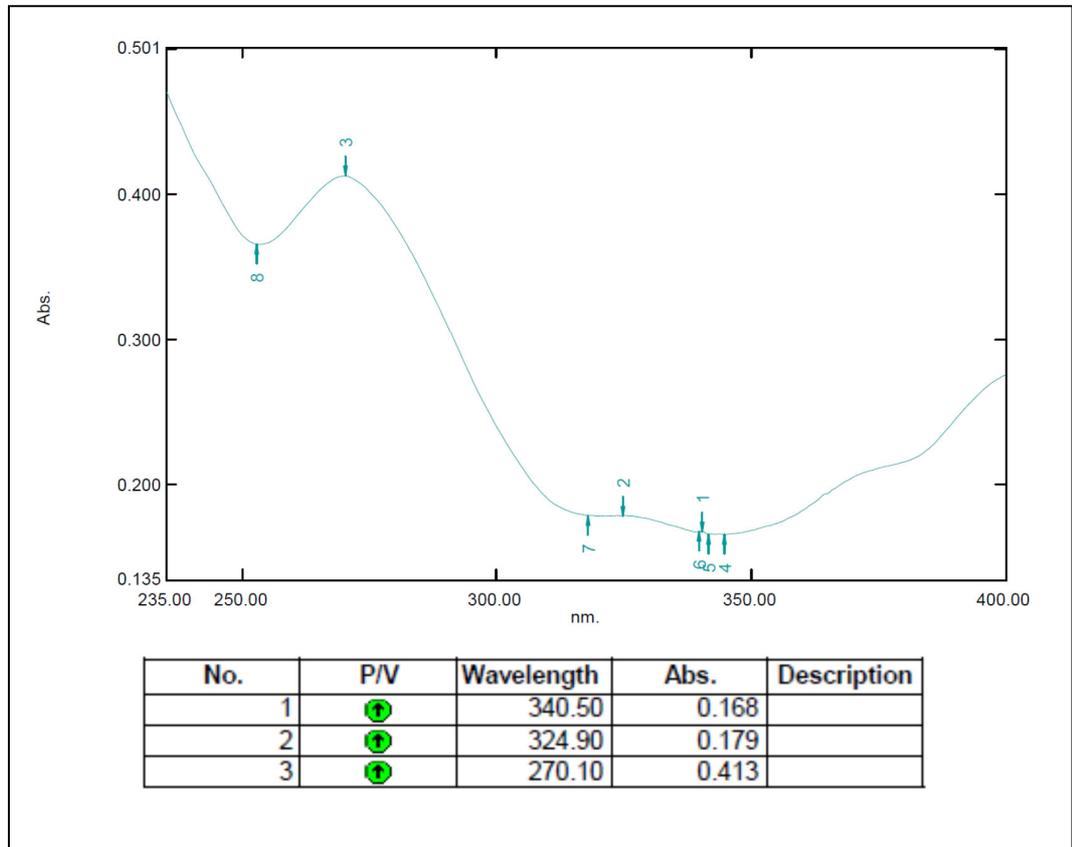


Fig. N° 44. Espectro UV de la muestra de *Calea urticifolia* código 19-11

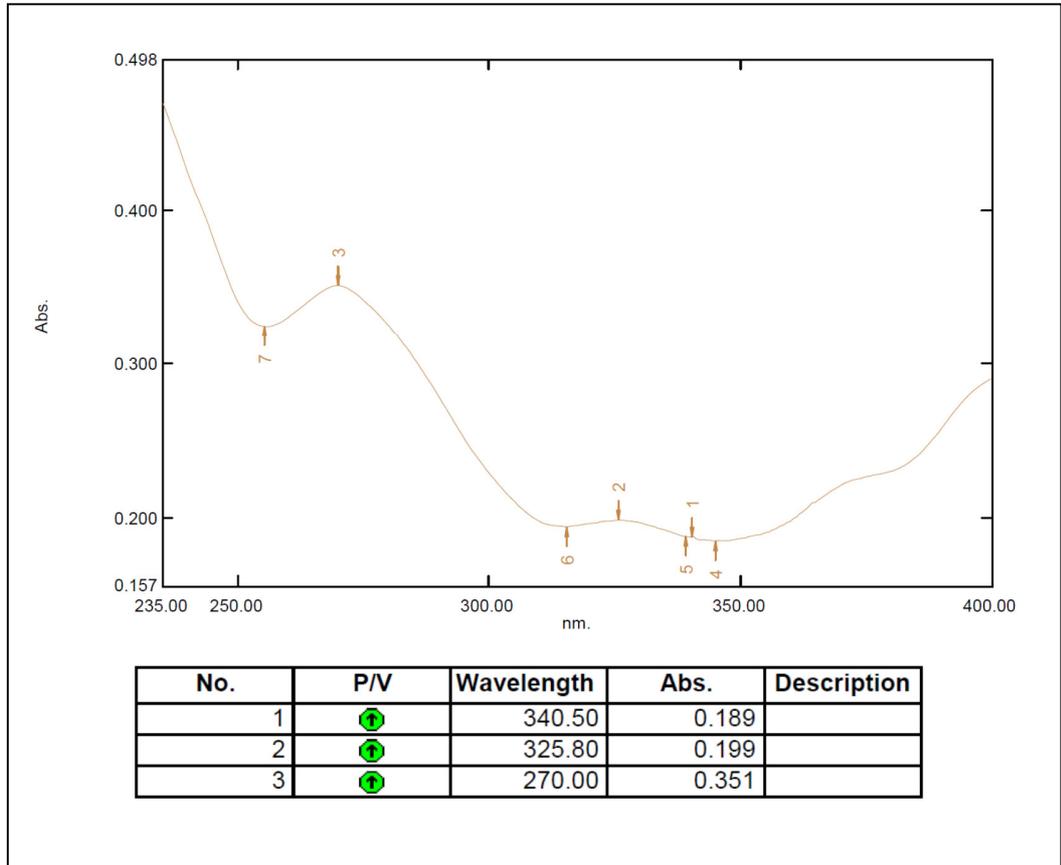


Fig. Nº 45. Espectro UV de la muestra de *Calea urticifolia* código 30-11

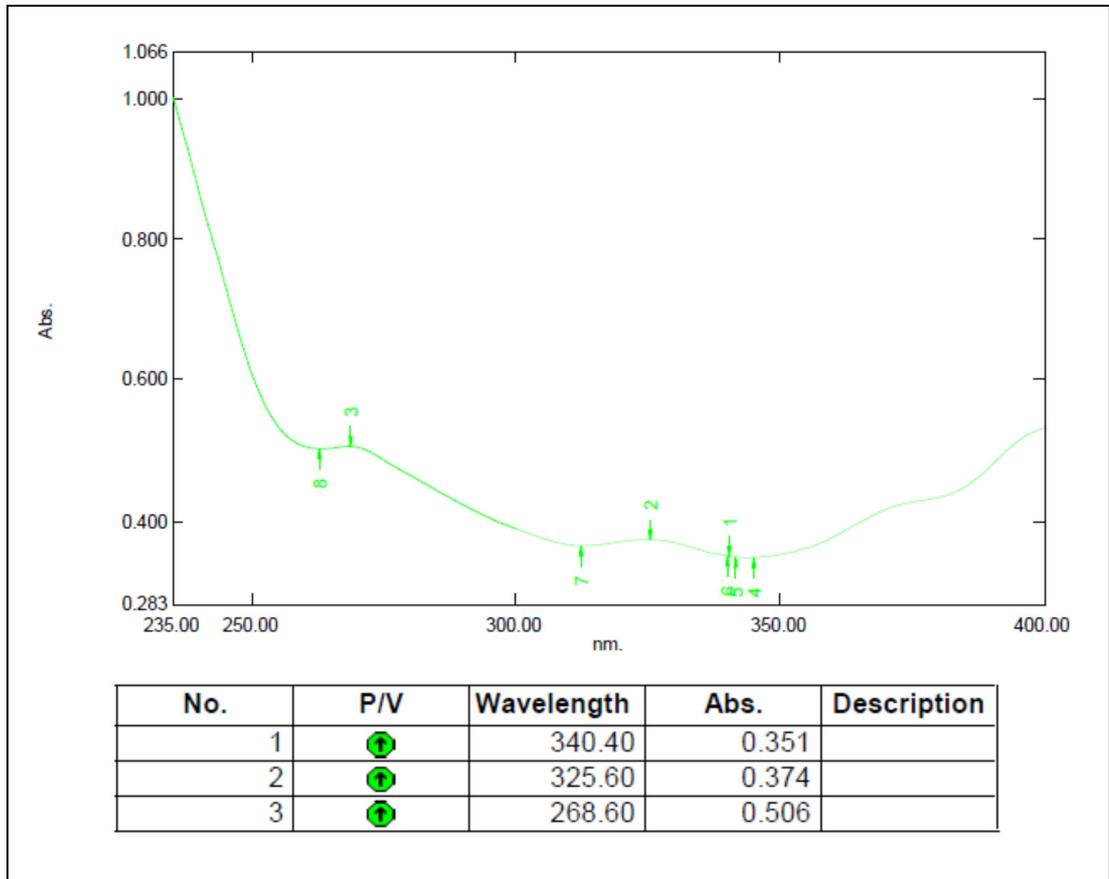


Fig. Nº 46. Espectro UV de la muestra de *Calea urticifolia* código 14-12

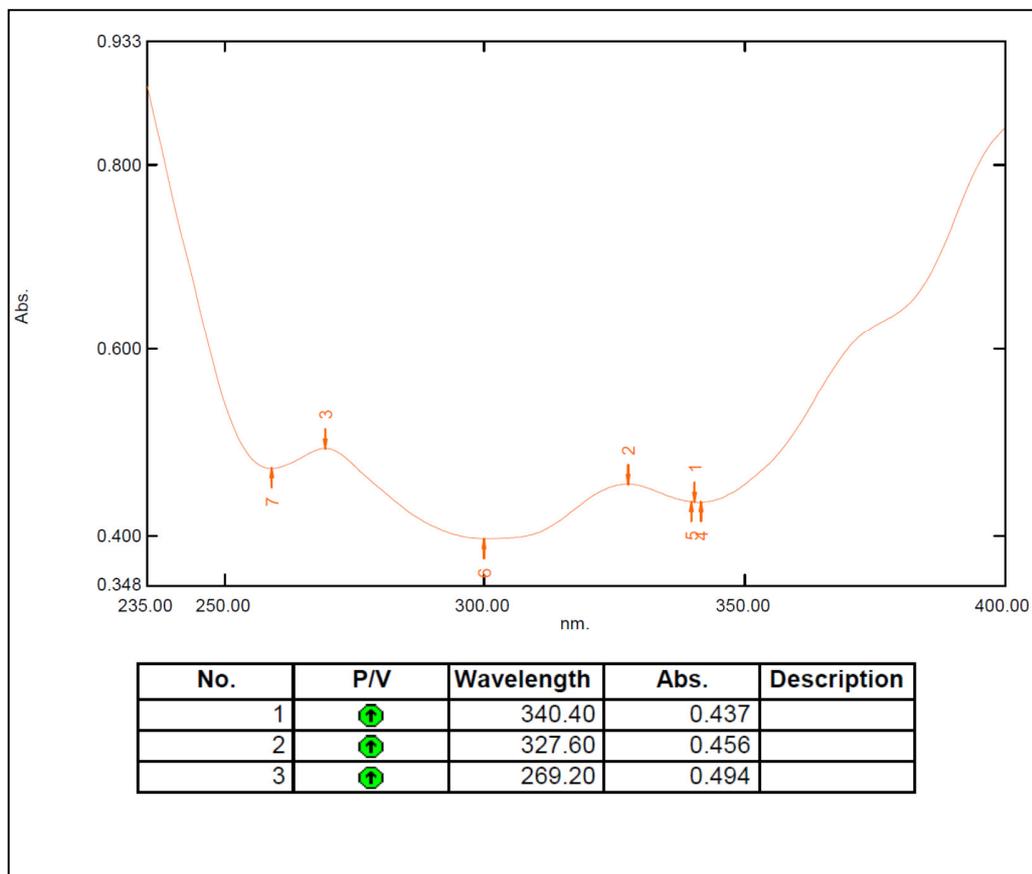


Fig. Nº 47. Espectro UV de la muestra de *Calea urticifolia* código 30-12

ANEXO N° 4
Análisis de varianza

Análisis de varianza de los datos correspondientes al porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en extracto clorofórmico seco (julio-diciembre 2012)

- **Valor P.**

ANOVA Tabla del PORCENTAJE vs MUESTRA

Tabla N° 14. Tabla de ANOVA elaborada por el programa STATGRAPHICS donde se muestra el valor P

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	5645.86	12	470.488	13.27	0.0000
Within groups	1843.59	52	35.4536		
Total (Corr.)	7489.45	64			

La tabla ANOVA descompone la varianza de PORCENTAJE en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro del grupo. La razón F, que en este caso es igual a 13.2705, es una relación de la estimación entre-grupos para la estimación dentro del grupo. Dado que el valor P de la prueba F es menor de 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre la media PORCENTAJE de un nivel de MUESTRA a otro en el nivel de confianza del 95,0%.

- **Prueba de suposición de la normalidad**

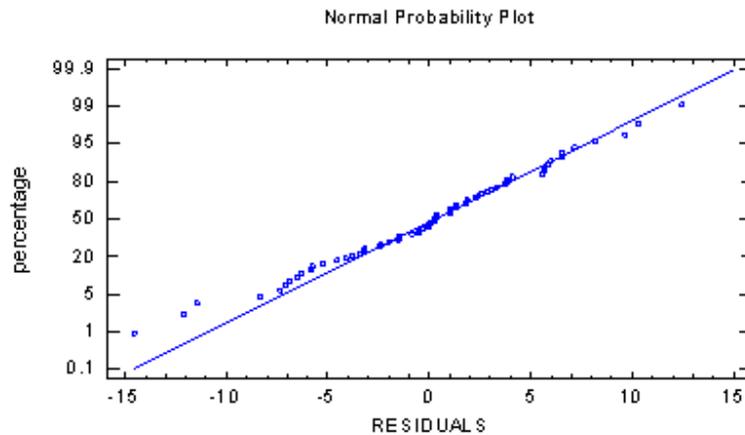


Fig. N° 48. Gráfico de porcentajes vs residuos correspondientes al porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en extracto clorofórmico seco (julio-diciembre 2012)

- **Independencia de los residuos**

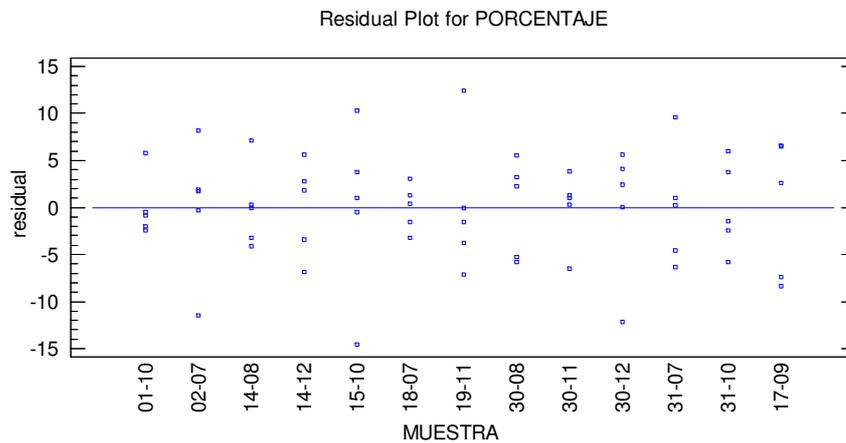


Fig. N° 49. Grafico residuos vs muestra correspondientes al porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en extracto clorofórmico seco (julio-diciembre 2012)

- Test de rangos múltiples para los porcentajes

Tabla N° 15. Nivel de significancia en los porcentajes de cada muestra (julio-diciembre 2012)

Method: 95.0 percent LSD

MUESTRA	Count	Mean	Homogeneous Groups
14-12	5	39.582	X
31-10	5	42.916	X
19-11	5	50.668	X
01-10	5	56.662	XX
14-08	5	56.894	XX
02-07	5	58.852	X
15-10	5	58.95	X
30-11	5	59.178	X
30-12	5	62.326	XX
31-07	5	66.84	XX
17-09	5	67.528	XX
18-07	5	69.286	XX
30-08	5	71.856	X

Tabla N° 16. Mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) para porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en extracto clorofórmico seco (julio-diciembre 2012)

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
01-10 - 02-07		-2.19	7.55669
01-10 - 14-08		-0.232	7.55669
01-10 - 14-12	*	17.08	7.55669
01-10 - 15-10		-2.288	7.55669
01-10 - 18-07	*	-12.624	7.55669
01-10 - 19-11		5.994	7.55669
01-10 - 30-08	*	-15.194	7.55669
01-10 - 30-11		-2.516	7.55669
01-10 - 30-12		-5.664	7.55669
01-10 - 31-07	*	-10.178	7.55669
01-10 - 31-10	*	13.746	7.55669
01-10 - 17-09	*	-10.866	7.55669
02-07 - 14-08		1.958	7.55669
02-07 - 14-12	*	19.27	7.55669
02-07 - 15-10		-0.098	7.55669
02-07 - 18-07	*	-10.434	7.55669
02-07 - 19-11	*	8.184	7.55669
02-07 - 30-08	*	-13.004	7.55669
02-07 - 30-11		-0.326	7.55669
02-07 - 30-12		-3.474	7.55669

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
02-07 - 31-10	*	15.936	7.55669
02-07 - 17-09	*	-8.676	7.55669
14-08 - 14-12	*	17.312	7.55669
14-08 - 15-10		-2.056	7.55669
14-08 - 18-07	*	-12.392	7.55669
14-08 - 19-11		6.226	7.55669
14-08 - 30-08	*	-14.962	7.55669
14-08 - 30-11		-2.284	7.55669
14-08 - 30-12		-5.432	7.55669
14-08 - 31-07	*	-9.946	7.55669
14-08 - 31-10	*	13.978	7.55669
14-08 - 17-09	*	-10.634	7.55669
14-12 - 15-10	*	-19.368	7.55669
14-12 - 18-07	*	-29.704	7.55669
14-12 - 19-11	*	-11.086	7.55669
14-12 - 30-08	*	-32.274	7.55669
14-12 - 30-11	*	-19.596	7.55669
14-12 - 30-12	*	-22.744	7.55669
14-12 - 31-10		-3.334	7.55669
14-12 - 17-09	*	-27.946	7.55669

Tabla Nº 16. (Continuación)

15-10 - 18-07	*	-10.336	7.55669
15-10 - 19-11	*	8.282	7.55669
15-10 - 30-08	*	-12.906	7.55669
15-10 - 30-11		-0.228	7.55669
15-10 - 30-12		-3.376	7.55669
15-10 - 31-07	*	-7.89	7.55669
15-10 - 31-10	*	16.034	7.55669
15-10 - 17-09	*	-8.578	7.55669
18-07 - 19-11	*	18.618	7.55669
18-07 - 30-08		-2.57	7.55669
18-07 - 30-11	*	10.108	7.55669
18-07 - 30-12		6.96	7.55669
18-07 - 31-07		2.446	7.55669
18-07 - 31-10	*	26.37	7.55669
18-07 - 17-09		1.758	7.55669
19-11 - 30-08	*	-21.188	7.55669
19-11 - 30-11	*	-8.51	7.55669
19-11 - 30-12	*	-11.658	7.55669
19-11 - 31-07	*	-16.172	7.55669
19-11 - 31-10	*	7.752	7.55669
19-11 - 17-09	*	-16.86	7.55669
30-08 - 30-11	*	12.678	7.55669
30-08 - 30-12	*	9.53	7.55669
30-08 - 31-07		5.016	7.55669
30-08 - 31-10	*	28.94	7.55669
30-08 - 17-09		4.328	7.55669
30-11 - 30-12		-3.148	7.55669
30-11 - 31-07	*	-7.662	7.55669
30-11 - 31-10	*	16.262	7.55669
30-11 - 17-09	*	-8.35	7.55669
30-12 - 31-07		-4.514	7.55669
30-12 - 31-10	*	19.41	7.55669
30-12 - 17-09		-5.202	7.55669
31-07 - 31-10	*	23.924	7.55669
31-07 - 17-09		-0.688	7.55669
31-10 - 17-09	*	-24.612	7.55669

* Denota una diferencia estadísticamente significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes. La **Tabla Nº 16** muestra la diferencia estimada entre cada par de medios. Un asterisco se ha colocado junto a 51 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%. En la **Tabla**

Nº 15, se muestran los grupos y sus niveles de diferencias estadísticamente significativas. El método que actualmente se utiliza para discriminar entre los medios es mínima diferencia significativa de Fisher procedimiento (LSD). Con este método, existe un riesgo de 5,0% de llamar a cada par de medios significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0

Análisis de varianza de los datos correspondientes al porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en extracto clorofórmico seco (enero-diciembre 2012)

- **Valor P.**

ANOVA tabla PORCENTAJE por MUESTRA

Tabla Nº 17. Tabla de ANOVA elaborada por el programa STATGRAPHICS donde se muestra el valor P

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	22819.2	23	992.141	28.82	0.0000
Within groups	3304.85	96	34.4255		
Total (Corr.)	26124.1	119			

La tabla ANOVA descompone la varianza de PORCENTAJES en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro del grupo. La razón F, que en este caso es igual a 28.8199, es una relación de la estimación entre-grupos para la estimación dentro del grupo. Dado que el valor P de la prueba F es menor de 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los PORCENTAJES de un nivel de MUESTRAS a otro en el nivel de confianza del 95,0%.

- **Prueba de suposición de la normalidad**

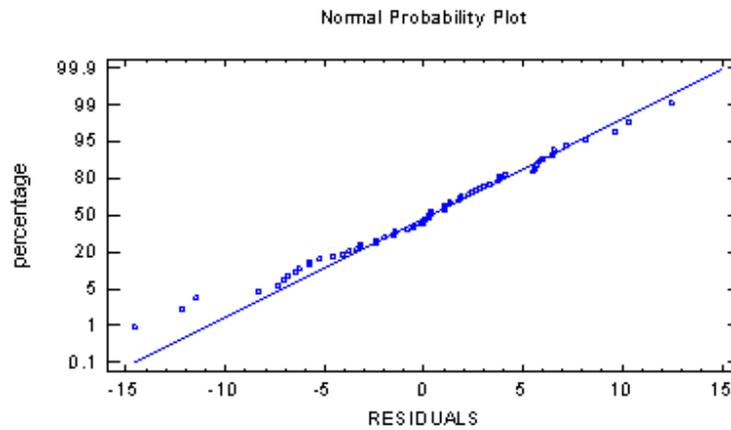


Fig. N° 50. Grafico porcentaje vs residuo correspondiente al porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en extracto clorofórmico seco (enero-diciembre 2012)

- **Independencia de los residuos**

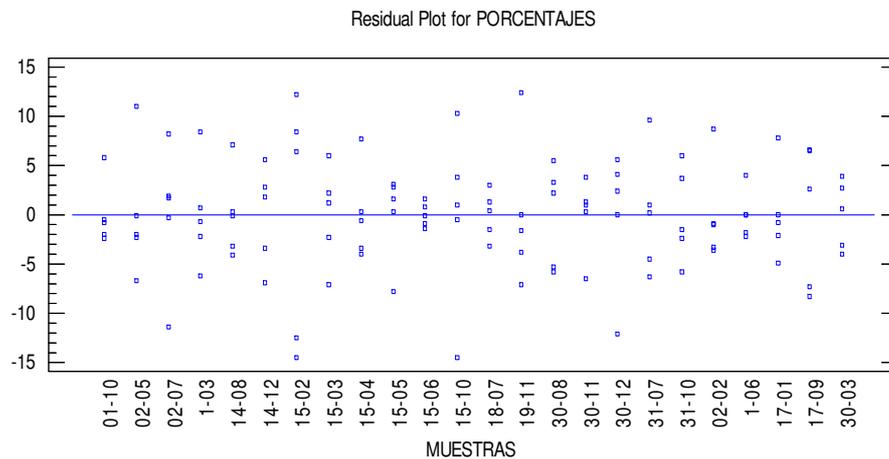


Fig. N° 51. Grafico residuos vs muestra correspondiente al porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en extracto clorofórmico seco (enero-diciembre 2012)

- Test de rangos múltiples para los porcentajes

Tabla N° 18. Nivel de significancia en los porcentajes de cada muestra (enero-diciembre 2012)

MUESTRAS	Count	Mean	Homogeneous Groups
14-12	5	39.582	X
31-10	5	42.916	XX
02-05	5	50.246	XX
19-11	5	50.668	XX
01-10	5	56.662	XXX
14-08	5	56.894	XXX
1-06	5	57.83	XX
02-07	5	58.852	X
15-10	5	58.95	X
30-11	5	59.178	XX
30-12	5	62.326	XXX
15-06	5	63.488	XXX
17-01	5	66.336	XXX
31-07	5	66.84	XX
17-09	5	67.528	XX
15-05	5	67.936	XX
18-07	5	69.286	XX
02-02	5	71.592	X
30-08	5	71.856	X
1-03	5	84.308	X
15-03	5	85.646	X
15-04	5	88.996	X
30-03	5	89.192	X
15-02	5	90.014	X

Tabla N° 19. Mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) para porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en extracto clorofórmico seco (enero-diciembre 2012)

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
01-10 - 02-05		6.416	7.36594
01-10 - 02-07		-2.19	7.36594
01-10 - 1-03	*	-27.646	7.36594
01-10 - 14-08		-0.232	7.36594
01-10 - 14-12	*	17.08	7.36594
01-10 - 15-02	*	-33.352	7.36594
01-10 - 15-03	*	-28.984	7.36594
01-10 - 15-04	*	-32.334	7.36594
01-10 - 15-05	*	-11.274	7.36594
01-10 - 15-06		-6.826	7.36594
01-10 - 15-10		-2.288	7.36594

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
01-10 - 18-07	*	-12.624	7.36594
01-10 - 19-11		5.994	7.36594
01-10 - 30-08	*	-15.194	7.36594
01-10 - 30-11		-2.516	7.36594
01-10 - 30-12		-5.664	7.36594
01-10 - 31-07	*	-10.178	7.36594
01-10 - 31-10	*	13.746	7.36594
01-10 - 02-02	*	-14.93	7.36594
01-10 - 1-06		-1.168	7.36594
01-10 - 17-01	*	-9.674	7.36594
01-10 - 17-09	*	-10.866	7.36594

Tabla N° 19. (Continuación)

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
01-10 - 30-03	*	-32.53	7.36594
02-05 - 02-07	*	-8.606	7.36594
02-05 - 1-03	*	-34.062	7.36594
02-05 - 14-08		-6.648	7.36594
02-05 - 14-12	*	10.664	7.36594
02-05 - 15-02	*	-39.768	7.36594
02-05 - 15-03	*	-35.4	7.36594
02-05 - 15-04	*	-38.75	7.36594
02-05 - 15-05	*	-17.69	7.36594
02-05 - 15-06	*	-13.242	7.36594
02-05 - 15-10	*	-8.704	7.36594
02-05 - 18-07	*	-19.04	7.36594
02-05 - 19-11		-0.422	7.36594
02-05 - 30-08	*	-21.61	7.36594
02-05 - 30-11	*	-8.932	7.36594
02-05 - 30-12	*	-12.08	7.36594
02-05 - 31-07	*	-16.594	7.36594
02-05 - 31-10		7.33	7.36594
02-05 - 02-02	*	-21.346	7.36594
02-05 - 1-06	*	-7.584	7.36594
02-05 - 17-01	*	-16.09	7.36594
02-05 - 17-09	*	-17.282	7.36594
02-05 - 30-03	*	-38.946	7.36594
02-07 - 1-03	*	-25.456	7.36594
02-07 - 14-08		1.958	7.36594
02-07 - 14-12	*	19.27	7.36594
02-07 - 15-02	*	-31.162	7.36594
02-07 - 15-03	*	-26.794	7.36594
02-07 - 15-04	*	-30.144	7.36594
02-07 - 15-05	*	-9.084	7.36594
02-07 - 15-06		-4.636	7.36594
02-07 - 15-10		-0.098	7.36594
02-07 - 18-07	*	-10.434	7.36594
02-07 - 19-11	*	8.184	7.36594
02-07 - 30-08	*	-13.004	7.36594
02-07 - 30-11		-0.326	7.36594
02-07 - 30-12		-3.474	7.36594
02-07 - 31-07	*	-7.988	7.36594
02-07 - 31-10	*	15.936	7.36594
02-07 - 02-02	*	-12.74	7.36594
02-07 - 1-06		1.022	7.36594

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
02-07 - 17-01	*	-7.484	7.36594
02-07 - 17-09	*	-8.676	7.36594
02-07 - 30-03	*	-30.34	7.36594
1-03 - 14-08	*	27.414	7.36594
1-03 - 14-12	*	44.726	7.36594
1-03 - 15-02		-5.706	7.36594
1-03 - 15-03		-1.338	7.36594
1-03 - 15-04		-4.688	7.36594
1-03 - 15-05	*	16.372	7.36594
1-03 - 15-06	*	20.82	7.36594
1-03 - 15-10	*	25.358	7.36594
1-03 - 18-07	*	15.022	7.36594
1-03 - 19-11	*	33.64	7.36594
1-03 - 30-08	*	12.452	7.36594
1-03 - 30-11	*	25.13	7.36594
1-03 - 30-12	*	21.982	7.36594
1-03 - 31-07	*	17.468	7.36594
1-03 - 31-10	*	41.392	7.36594
1-03 - 02-02	*	12.716	7.36594
1-03 - 1-06	*	26.478	7.36594
1-03 - 17-01	*	17.972	7.36594
1-03 - 17-09	*	16.78	7.36594
1-03 - 30-03		-4.884	7.36594
14-08 - 14-12	*	17.312	7.36594
14-08 - 15-02	*	-33.12	7.36594
14-08 - 15-03	*	-28.752	7.36594
14-08 - 15-04	*	-32.102	7.36594
14-08 - 15-05	*	-11.042	7.36594
14-08 - 15-06		-6.594	7.36594
14-08 - 15-10		-2.056	7.36594
14-08 - 18-07	*	-12.392	7.36594
14-08 - 19-11		6.226	7.36594
14-08 - 30-08	*	-14.962	7.36594
14-08 - 30-11		-2.284	7.36594
14-08 - 30-12		-5.432	7.36594
14-08 - 31-07	*	-9.946	7.36594
14-08 - 31-10	*	13.978	7.36594
14-08 - 02-02	*	-14.698	7.36594
14-08 - 1-06		-0.936	7.36594
14-08 - 17-01	*	-9.442	7.36594
14-08 - 17-09	*	-10.634	7.36594

Tabla N° 19. (Continuación)

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
14-08 - 30-03	*	-32.298	7.36594
14-12 - 15-02	*	-50.432	7.36594
14-12 - 15-03	*	-46.064	7.36594
14-12 - 15-04	*	-49.414	7.36594
14-12 - 15-05	*	-28.354	7.36594
14-12 - 15-06	*	-23.906	7.36594
14-12 - 15-10	*	-19.368	7.36594
14-12 - 18-07	*	-29.704	7.36594
14-12 - 19-11	*	-11.086	7.36594
14-12 - 30-08	*	-32.274	7.36594
14-12 - 30-11	*	-19.596	7.36594
14-12 - 30-12	*	-22.744	7.36594
14-12 - 31-07	*	-27.258	7.36594
14-12 - 31-10		-3.334	7.36594
14-12 - 02-02	*	-32.01	7.36594
14-12 - 1-06	*	-18.248	7.36594
14-12 - 17-01	*	-26.754	7.36594
14-12 - 17-09	*	-27.946	7.36594
14-12 - 30-03	*	-49.61	7.36594
15-02 - 15-03		4.368	7.36594
15-02 - 15-04		1.018	7.36594
15-02 - 15-05	*	22.078	7.36594
15-02 - 15-06	*	26.526	7.36594
15-02 - 15-10	*	31.064	7.36594
15-02 - 18-07	*	20.728	7.36594
15-02 - 19-11	*	39.346	7.36594
15-02 - 30-08	*	18.158	7.36594
15-02 - 30-11	*	30.836	7.36594
15-02 - 30-12	*	27.688	7.36594
15-02 - 31-07	*	23.174	7.36594
15-02 - 31-10	*	47.098	7.36594
15-02 - 02-02	*	18.422	7.36594
15-02 - 1-06	*	32.184	7.36594
15-02 - 17-01	*	23.678	7.36594
15-02 - 17-09	*	22.486	7.36594
15-02 - 30-03		0.822	7.36594
15-03 - 15-04		-3.35	7.36594
15-03 - 15-05	*	17.71	7.36594
15-03 - 15-06	*	22.158	7.36594
15-03 - 15-10	*	26.696	7.36594
15-03 - 18-07	*	16.36	7.36594
15-03 - 19-11	*	34.978	7.36594
15-03 - 30-08	*	13.79	7.36594
15-03 - 30-11	*	26.468	7.36594
15-03 - 30-12	*	23.32	7.36594

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
15-03 - 31-07	*	18.806	7.36594
15-03 - 31-10	*	42.73	7.36594
15-03 - 02-02	*	14.054	7.36594
15-03 - 1-06	*	27.816	7.36594
15-03 - 17-01	*	19.31	7.36594
15-03 - 17-09	*	18.118	7.36594
15-03 - 30-03		-3.546	7.36594
15-04 - 15-05	*	21.06	7.36594
15-04 - 15-06	*	25.508	7.36594
15-04 - 15-10	*	30.046	7.36594
15-04 - 18-07	*	19.71	7.36594
15-04 - 19-11	*	38.328	7.36594
15-04 - 30-08	*	17.14	7.36594
15-04 - 30-11	*	29.818	7.36594
15-04 - 30-12	*	26.67	7.36594
15-04 - 31-07	*	22.156	7.36594
15-04 - 31-10	*	46.08	7.36594
15-04 - 02-02	*	17.404	7.36594
15-04 - 1-06	*	31.166	7.36594
15-04 - 17-01	*	22.66	7.36594
15-04 - 17-09	*	21.468	7.36594
15-04 - 30-03		-0.196	7.36594
15-05 - 15-06		4.448	7.36594
15-05 - 15-10	*	8.986	7.36594
15-05 - 18-07		-1.35	7.36594
15-05 - 19-11	*	17.268	7.36594
15-05 - 30-08		-3.92	7.36594
15-05 - 30-11	*	8.758	7.36594
15-05 - 30-12		5.61	7.36594
15-05 - 31-07		1.096	7.36594
15-05 - 31-10	*	25.02	7.36594
15-05 - 02-02		-3.656	7.36594
15-05 - 1-06	*	10.106	7.36594
15-05 - 17-01		1.6	7.36594
15-05 - 17-09		0.408	7.36594
15-05 - 30-03	*	-21.256	7.36594
15-06 - 15-10		4.538	7.36594
15-06 - 18-07		-5.798	7.36594
15-06 - 19-11	*	12.82	7.36594
15-06 - 30-08	*	-8.368	7.36594
15-06 - 30-11		4.31	7.36594
15-06 - 30-12		1.162	7.36594
15-06 - 31-07		-3.352	7.36594
15-06 - 31-10	*	20.572	7.36594
15-06 - 02-02	*	-8.104	7.36594

Tabla N° 19. (Continuación)

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
15-06 - 1-06		5.658	7.36594
15-06 - 17-01		-2.848	7.36594
15-06 - 17-09		-4.04	7.36594
15-06 - 30-03	*	-25.704	7.36594
15-10 - 18-07	*	-10.336	7.36594
15-10 - 19-11	*	8.282	7.36594
15-10 - 30-08	*	-12.906	7.36594
15-10 - 30-11		-0.228	7.36594
15-10 - 30-12		-3.376	7.36594
15-10 - 31-07	*	-7.89	7.36594
15-10 - 31-10	*	16.034	7.36594
15-10 - 02-02	*	-12.642	7.36594
15-10 - 1-06		1.12	7.36594
15-10 - 17-01	*	-7.386	7.36594
15-10 - 17-09	*	-8.578	7.36594
15-10 - 30-03	*	-30.242	7.36594
18-07 - 19-11	*	18.618	7.36594
18-07 - 30-08		-2.57	7.36594
18-07 - 30-11	*	10.108	7.36594
18-07 - 30-12		6.96	7.36594
18-07 - 31-07		2.446	7.36594
18-07 - 31-10	*	26.37	7.36594
18-07 - 02-02		-2.306	7.36594
18-07 - 1-06	*	11.456	7.36594
18-07 - 17-01		2.95	7.36594
18-07 - 17-09		1.758	7.36594
18-07 - 30-03	*	-19.906	7.36594
19-11 - 30-08	*	-21.188	7.36594
19-11 - 30-11	*	-8.51	7.36594
19-11 - 30-12	*	-11.658	7.36594
19-11 - 31-07	*	-16.172	7.36594
19-11 - 31-10	*	7.752	7.36594
19-11 - 02-02	*	-20.924	7.36594
19-11 - 1-06		-7.162	7.36594
19-11 - 17-01	*	-15.668	7.36594
19-11 - 17-09	*	-16.86	7.36594
19-11 - 30-03	*	-38.524	7.36594
30-08 - 30-11	*	12.678	7.36594
30-08 - 30-12	*	9.53	7.36594
30-08 - 31-07		5.016	7.36594
30-08 - 31-10	*	28.94	7.36594
30-08 - 02-02		0.264	7.36594

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
30-08 - 1-06	*	14.026	7.36594
30-08 - 17-01		5.52	7.36594
30-08 - 17-09		4.328	7.36594
30-08 - 30-03	*	-17.336	7.36594
30-11 - 30-12		-3.148	7.36594
30-11 - 31-07	*	-7.662	7.36594
30-11 - 31-10	*	16.262	7.36594
30-11 - 02-02	*	-12.414	7.36594
30-11 - 1-06		1.348	7.36594
30-11 - 17-01		-7.158	7.36594
30-11 - 17-09	*	-8.35	7.36594
30-11 - 30-03	*	-30.014	7.36594
30-12 - 31-07		-4.514	7.36594
30-12 - 31-10	*	19.41	7.36594
30-12 - 02-02	*	-9.266	7.36594
30-12 - 1-06		4.496	7.36594
30-12 - 17-01		-4.01	7.36594
30-12 - 17-09		-5.202	7.36594
30-12 - 30-03	*	-26.866	7.36594
31-07 - 31-10	*	23.924	7.36594
31-07 - 02-02		-4.752	7.36594
31-07 - 1-06	*	9.01	7.36594
31-07 - 17-01		0.504	7.36594
31-07 - 17-09		-0.688	7.36594
31-07 - 30-03	*	-22.352	7.36594
31-10 - 02-02	*	-28.676	7.36594
31-10 - 1-06	*	-14.914	7.36594
31-10 - 17-01	*	-23.42	7.36594
31-10 - 17-09	*	-24.612	7.36594
31-10 - 30-03	*	-46.276	7.36594
02-02 - 1-06	*	13.762	7.36594
02-02 - 17-01		5.256	7.36594
02-02 - 17-09		4.064	7.36594
02-02 - 30-03	*	-17.6	7.36594
1-06 - 17-01	*	-8.506	7.36594
1-06 - 17-09	*	-9.698	7.36594
1-06 - 30-03	*	-31.362	7.36594
17-01 - 17-09		-1.192	7.36594
17-01 - 30-03	*	-22.856	7.36594
17-09 - 30-03	*	-21.664	7.36594

* Denota diferencia estadísticamente significativa

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativas. La **Tabla N° 18** muestra la diferencia estimada entre cada par de medios. Un asterisco se ha colocado al lado de 198 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%. En la parte superior **Tabla N° 19**, 9 grupos homogéneos se identifican utilizando columnas de equis, dentro de los cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método que actualmente se utiliza para discriminar entre los medios es mínima diferencia significativa de Fisher procedimiento (LSD). Con este método, existe un riesgo de 5,0% de llamar a cada par de medios significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0

Análisis de varianza de los datos correspondientes al porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en material vegetal seco (julio-diciembre 2012)

- **Valor P.**

ANOVA Tabla de PORCENTAJES por MUESTRAS

Tabla N° 20. Tabla de ANOVA elaborada por el programa STATGRAPHICS donde se muestr el valor P

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	28.6816	12	2.39013	9.94	0.0000
Within groups	12.5	52	0.240385		
Total (Corr.)	41.1816	64			

La tabla ANOVA descompone la varianza de PORCENTAJES en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro del grupo. La razón F, que en este caso es igual a 9.94291, es una relación de la estimación de entre-grupos para la estimación dentro del grupo. Dado que el valor P de la prueba F es menor de 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los PORCENTAJES de un nivel de MUESTRAS a otro en el nivel de confianza del 95.0%.

- **Prueba de suposición de la normalidad**

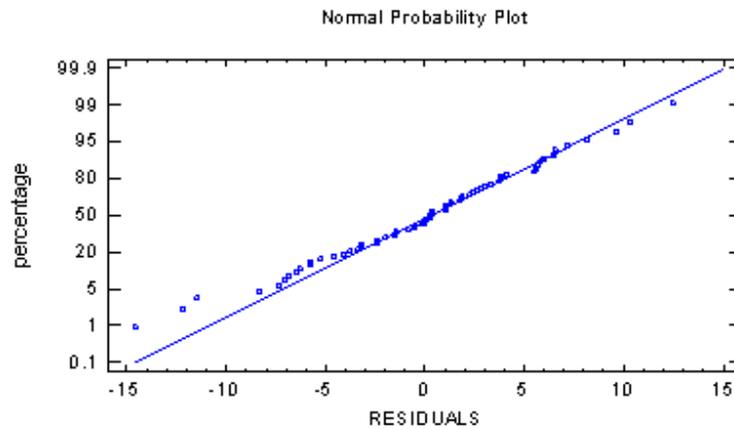


Fig. N° 52. Grafico porcentaje vs residuos correspondiente al porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en material vegetal seco (julio-diciembre 2012)

- **Independencia de los residuos**

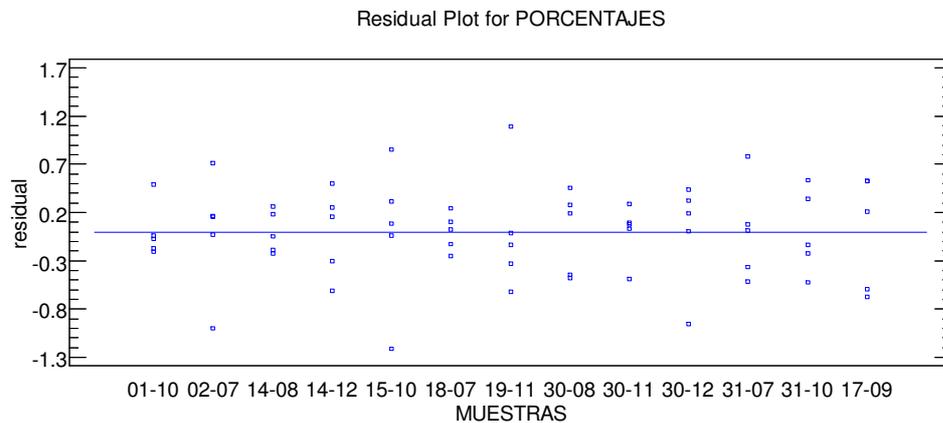


Fig. N° 53. Grafico residuos vs muestras correspondiente al porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en material vegetal seco (julio-diciembre 2012)

- Test de rangos múltiples para los porcentajes

Tabla Nº 21. Nivel de significancia en los porcentajes de cada muestra (julio-diciembre 2012)

MUESTRAS	Count	Mean	Homogeneous Groups
14-12	5	3.51	X
31-10	5	3.872	XX
19-11	5	4.448	XX
30-11	5	4.472	XX
14-08	5	4.554	XX
01-10	5	4.772	XXX
15-10	5	4.878	XXXX
30-12	5	4.908	XXXX
02-07	5	5.118	XXXX
31-07	5	5.372	XXXX
17-09	5	5.442	XXX
18-07	5	5.614	XX
30-08	5	5.992	X

Tabla Nº 22. Mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) para porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en material vegetal seco (julio-diciembre 2012)

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
01-10 - 02-07		-0.346	0.622237
01-10 - 14-08		0.218	0.622237
01-10 - 14-12	*	1.262	0.622237
01-10 - 15-10		-0.106	0.622237
01-10 - 18-07	*	-0.842	0.622237
01-10 - 19-11		0.324	0.622237
01-10 - 30-08	*	-1.22	0.622237
01-10 - 30-11		0.3	0.622237
01-10 - 30-12		-0.136	0.622237
01-10 - 31-07		-0.6	0.622237
01-10 - 31-10	*	0.9	0.622237
01-10 - 17-09	*	-0.67	0.622237
02-07 - 14-08		0.564	0.622237
02-07 - 14-12	*	1.608	0.622237
02-07 - 15-10		0.24	0.622237
02-07 - 18-07		-0.496	0.622237
02-07 - 19-11	*	0.67	0.622237
02-07 - 30-08	*	-0.874	0.622237
02-07 - 30-11	*	0.646	0.622237
02-07 - 30-12		0.21	0.622237

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
02-07 - 31-07		-0.254	0.622237
02-07 - 31-10	*	1.246	0.622237
02-07 - 17-09		-0.324	0.622237
14-08 - 14-12	*	1.044	0.622237
14-08 - 15-10		-0.324	0.622237
14-08 - 18-07	*	-1.06	0.622237
14-08 - 19-11		0.106	0.622237
14-08 - 30-08	*	-1.438	0.622237
14-08 - 30-11		0.082	0.622237
14-08 - 30-12		-0.354	0.622237
14-08 - 31-07	*	-0.818	0.622237
14-08 - 31-10	*	0.682	0.622237
14-08 - 17-09	*	-0.888	0.622237
14-12 - 15-10	*	-1.368	0.622237
14-12 - 18-07	*	-2.104	0.622237
14-12 - 19-11	*	-0.938	0.622237
14-12 - 30-08	*	-2.482	0.622237
14-12 - 30-11	*	-0.962	0.622237
14-12 - 30-12	*	-1.398	0.622237
14-12 - 31-07	*	-1.862	0.622237

Tabla N° 22. (Continuación)

14-12 - 31-10		-0.362	0.622237
14-12 - 17-09	*	-1.932	0.622237
15-10 - 18-07	*	-0.736	0.622237
15-10 - 19-11		0.43	0.622237
15-10 - 30-08	*	-1.114	0.622237
15-10 - 30-11		0.406	0.622237
15-10 - 30-12		-0.03	0.622237
15-10 - 31-07		-0.494	0.622237
15-10 - 31-10	*	1.006	0.622237
15-10 - 17-09		-0.564	0.622237
18-07 - 19-11	*	1.166	0.622237
18-07 - 30-08		-0.378	0.622237
18-07 - 30-11	*	1.142	0.622237
18-07 - 30-12	*	0.706	0.622237
18-07 - 31-07		0.242	0.622237
18-07 - 31-10	*	1.742	0.622237
18-07 - 17-09		0.172	0.622237
19-11 - 30-08	*	-1.544	0.622237
19-11 - 30-11		-0.024	0.622237
19-11 - 30-12		-0.46	0.622237
19-11 - 31-07	*	-0.924	0.622237
19-11 - 31-10		0.576	0.622237
19-11 - 17-09	*	-0.994	0.622237
30-08 - 30-11	*	1.52	0.622237
30-08 - 30-12	*	1.084	0.622237
30-08 - 31-07		0.62	0.622237
30-08 - 31-10	*	2.12	0.622237
30-08 - 17-09		0.55	0.622237
30-11 - 30-12		-0.436	0.622237
30-11 - 31-07	*	-0.9	0.622237
30-11 - 31-10		0.6	0.622237
30-11 - 17-09	*	-0.97	0.622237
30-12 - 31-07		-0.464	0.622237
30-12 - 31-10	*	1.036	0.622237
30-12 - 17-09		-0.534	0.622237
31-07 - 31-10	*	1.5	0.622237
31-07 - 17-09		-0.07	0.622237
31-10 - 17-09	*	-1.57	0.622237

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes. La **Tabla N° 22** muestra la diferencia estimada entre cada par de medios. Un asterisco se ha colocado junto a 42 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias

estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%. En la **Tabla Nº 21**, se muestran el nivel de significancia de los porcentajes de cada muestra. El método que actualmente se utiliza para discriminar entre los medios es el método de mínima diferencia significativa de Fisher procedimiento (LSD). Con este método, existe un riesgo de 5,0% de llamar a cada par de medios significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

Análisis de varianza de los datos correspondientes al porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en material vegetal seco (enero-diciembre 2012)

- **Valor P.**

Tabla Nº 23. Tabla de ANOVA elaborada por el programa STATGRAPHICS donde se muestra el valor P

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	143.62	23	6.24435	31.53	0.0000
Within groups	19.014	96	0.198062		
Total (Corr.)	162.634	119			

La tabla ANOVA descompone la varianza de PORCENTAJE en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro del grupo. La razón F, que en este caso es igual a 31.5272, es una relación de la estimación de entre-grupo para la estimación dentro del grupo. Dado que el valor P de la prueba F es menor de 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre la media PORCENTAJE de un nivel de MUESTRAS a otro en el nivel de confianza del 95.0%.

- Prueba de suposición de la normalidad

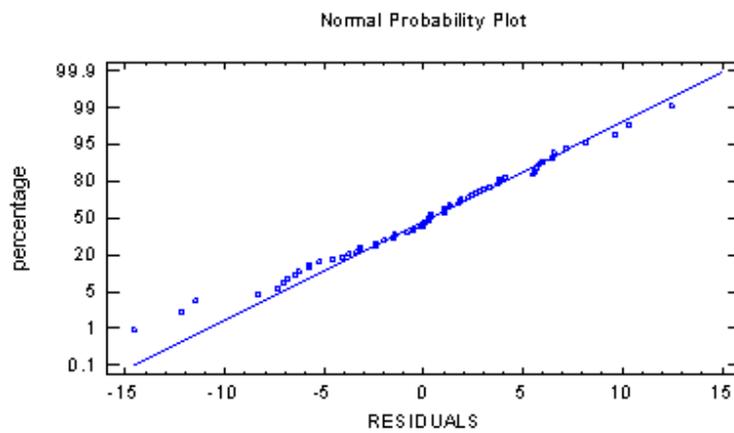


Fig. N° 54. Grafica porcentaje vs residuos correspondiente al porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en material vegetal seco (enero-diciembre 2012)

- Independencia de los residuos

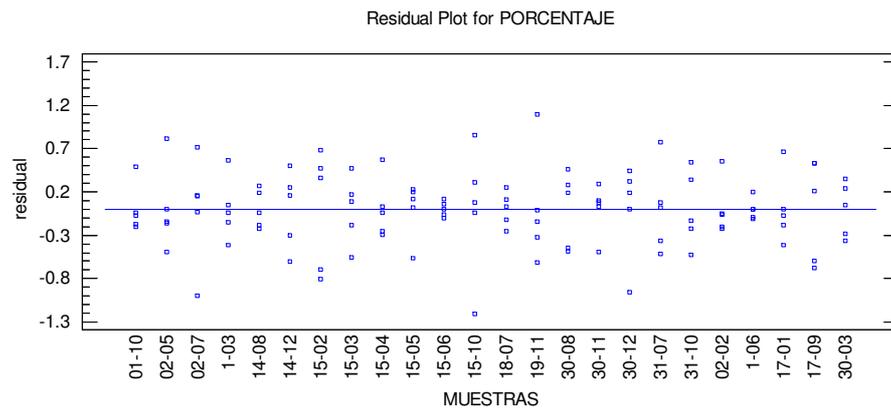


Fig. N° 55. Grafica residuos vs muestras correspondiente al porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en material vegetal seco (enero-diciembre 2012)

- **Test de rangos múltiples para los porcentajes**

Tabla N° 24. Nivel de significancia en los porcentajes de cada muestra (enero-diciembre 2012)

<i>MUESTRAS</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
1-06	5	2.84	X
14-12	5	3.51	X
02-05	5	3.706	X
31-10	5	3.872	X
15-06	5	4.444	X
19-11	5	4.448	X
30-11	5	4.472	XX
02-02	5	4.536	XX
14-08	5	4.554	XX
01-10	5	4.772	XXX
15-10	5	4.878	XXXX
30-12	5	4.908	XXXXX
15-05	5	4.96	XXXXX
15-02	5	5.02	XXXX
02-07	5	5.118	XXXX
31-07	5	5.372	XXX
17-09	5	5.442	XXX
18-07	5	5.614	XX
1-03	5	5.654	XX
17-01	5	5.658	XX
30-08	5	5.992	X
15-04	5	6.626	X
15-03	5	6.736	X
30-03	5	8.056	X

Tabla N° 25. Mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) para porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en material vegetal seco (enero-diciembre 2012)

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
01-10 - 02-05	*	1.066	0.558713
01-10 - 02-07		-0.346	0.558713
01-10 - 1-03	*	-0.882	0.558713
01-10 - 14-08		0.218	0.558713
01-10 - 14-12	*	1.262	0.558713
01-10 - 15-02		-0.248	0.558713
01-10 - 15-03	*	-1.964	0.558713
01-10 - 15-04	*	-1.854	0.558713
01-10 - 15-05		-0.188	0.558713
01-10 - 15-06		0.328	0.558713
01-10 - 15-10		-0.106	0.558713
01-10 - 18-07	*	-0.842	0.558713
01-10 - 19-11		0.324	0.558713
01-10 - 30-08	*	-1.22	0.558713
01-10 - 30-11		0.3	0.558713
01-10 - 30-12		-0.136	0.558713
01-10 - 31-07	*	-0.6	0.558713
01-10 - 31-10	*	0.9	0.558713
01-10 - 02-02		0.236	0.558713
01-10 - 1-06	*	1.932	0.558713
01-10 - 17-01	*	-0.886	0.558713
01-10 - 17-09	*	-0.67	0.558713
01-10 - 30-03	*	-3.284	0.558713
02-05 - 02-07	*	-1.412	0.558713
02-05 - 1-03	*	-1.948	0.558713
02-05 - 14-08	*	-0.848	0.558713
02-05 - 14-12		0.196	0.558713
02-05 - 15-02	*	-1.314	0.558713
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>

02-05 - 15-10	*	-1.172	0.558713
02-05 - 18-07	*	-1.908	0.558713
02-05 - 19-11	*	-0.742	0.558713
02-05 - 30-08	*	-2.286	0.558713
02-05 - 30-11	*	-0.766	0.558713
02-05 - 30-12	*	-1.202	0.558713
02-05 - 31-07	*	-1.666	0.558713
02-05 - 31-10		-0.166	0.558713
02-05 - 02-02	*	-0.83	0.558713
02-05 - 1-06	*	0.866	0.558713
02-05 - 17-01	*	-1.952	0.558713
02-05 - 17-09	*	-1.736	0.558713
02-05 - 30-03	*	-4.35	0.558713
02-07 - 1-03		-0.536	0.558713
02-07 - 14-08	*	0.564	0.558713
02-07 - 14-12	*	1.608	0.558713
02-07 - 15-02		0.098	0.558713
02-07 - 15-03	*	-1.618	0.558713
02-07 - 15-04	*	-1.508	0.558713
02-07 - 15-05		0.158	0.558713
02-07 - 15-06	*	0.674	0.558713
02-07 - 15-10		0.24	0.558713
02-07 - 18-07		-0.496	0.558713
02-07 - 19-11	*	0.67	0.558713
02-07 - 30-08	*	-0.874	0.558713
02-07 - 30-11	*	0.646	0.558713
02-07 - 30-12		0.21	0.558713
02-07 - 31-07		-0.254	0.558713

Tabla Nº 25. (Continuación)

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>	<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
02-07 - 31-10	*	1.246	0.558713	14-08 - 30-03	*	-3.502	0.558713
02-07 - 02-02	*	0.582	0.558713	14-12 - 15-02	*	-1.51	0.558713
02-07 - 1-06	*	2.278	0.558713	14-12 - 15-03	*	-3.226	0.558713
02-07 - 17-01		-0.54	0.558713	14-12 - 15-04	*	-3.116	0.558713
02-07 - 17-09		-0.324	0.558713	14-12 - 15-05	*	-1.45	0.558713
02-07 - 30-03	*	-2.938	0.558713	14-12 - 15-06	*	-0.934	0.558713
1-03 - 14-08	*	1.1	0.558713	14-12 - 15-10	*	-1.368	0.558713
1-03 - 14-12	*	2.144	0.558713	14-12 - 18-07	*	-2.104	0.558713
1-03 - 15-02	*	0.634	0.558713	14-12 - 19-11	*	-0.938	0.558713
1-03 - 15-03	*	-1.082	0.558713	14-12 - 30-08	*	-2.482	0.558713
1-03 - 15-04	*	-0.972	0.558713	14-12 - 30-11	*	-0.962	0.558713
1-03 - 15-05	*	0.694	0.558713	14-12 - 30-12	*	-1.398	0.558713
1-03 - 15-06	*	1.21	0.558713	14-12 - 31-07	*	-1.862	0.558713
1-03 - 15-10	*	0.776	0.558713	14-12 - 31-10		-0.362	0.558713
1-03 - 18-07		0.04	0.558713	14-12 - 02-02	*	-1.026	0.558713
1-03 - 19-11	*	1.206	0.558713	14-12 - 1-06	*	0.67	0.558713
1-03 - 30-08		-0.338	0.558713	14-12 - 17-01	*	-2.148	0.558713
1-03 - 30-11	*	1.182	0.558713	14-12 - 17-09	*	-1.932	0.558713
1-03 - 30-12	*	0.746	0.558713	14-12 - 30-03	*	-4.546	0.558713
1-03 - 31-07		0.282	0.558713	15-02 - 15-03	*	-1.716	0.558713
1-03 - 31-10	*	1.782	0.558713	15-02 - 15-04	*	-1.606	0.558713
1-03 - 02-02	*	1.118	0.558713	15-02 - 15-05		0.06	0.558713
1-03 - 1-06	*	2.814	0.558713	15-02 - 15-06	*	0.576	0.558713
1-03 - 17-01		-0.004	0.558713	15-02 - 15-10		0.142	0.558713
1-03 - 17-09		0.212	0.558713	15-02 - 18-07	*	-0.594	0.558713
1-03 - 30-03	*	-2.402	0.558713	15-02 - 19-11	*	0.572	0.558713
14-08 - 14-12	*	1.044	0.558713	15-02 - 30-08	*	-0.972	0.558713
14-08 - 15-02		-0.466	0.558713	15-02 - 30-11		0.548	0.558713
14-08 - 15-03	*	-2.182	0.558713	15-02 - 30-12		0.112	0.558713
14-08 - 15-04	*	-2.072	0.558713	15-02 - 31-07		-0.352	0.558713
14-08 - 15-05		-0.406	0.558713	15-02 - 31-10	*	1.148	0.558713
14-08 - 15-06		0.11	0.558713	15-02 - 02-02		0.484	0.558713
14-08 - 15-10		-0.324	0.558713	15-02 - 1-06	*	2.18	0.558713
14-08 - 18-07	*	-1.06	0.558713	15-02 - 17-01	*	-0.638	0.558713
14-08 - 19-11		0.106	0.558713	15-02 - 17-09		-0.422	0.558713
14-08 - 30-08	*	-1.438	0.558713	15-02 - 30-03	*	-3.036	0.558713
14-08 - 30-11		0.082	0.558713	15-03 - 15-04		0.11	0.558713
14-08 - 30-12		-0.354	0.558713	15-03 - 15-05	*	1.776	0.558713
14-08 - 31-07	*	-0.818	0.558713	15-03 - 15-06	*	2.292	0.558713
14-08 - 31-10	*	0.682	0.558713	15-03 - 15-10	*	1.858	0.558713
14-08 - 02-02		0.018	0.558713	15-03 - 18-07	*	1.122	0.558713
14-08 - 1-06	*	1.714	0.558713	15-03 - 19-11	*	2.288	0.558713
14-08 - 17-01	*	-1.104	0.558713	15-03 - 30-08	*	0.744	0.558713
14-08 - 17-09	*	-0.888	0.558713	15-03 - 30-11	*	2.264	0.558713

Tabla Nº 25. (Continuación)

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
15-03 - 30-12	*	1.828	0.558713
15-03 - 31-07	*	1.364	0.558713
15-03 - 31-10	*	2.864	0.558713
15-03 - 02-02	*	2.2	0.558713
15-03 - 1-06	*	3.896	0.558713
15-03 - 17-01	*	1.078	0.558713
15-03 - 17-09	*	1.294	0.558713
15-03 - 30-03	*	-1.32	0.558713
15-04 - 15-05	*	1.666	0.558713
15-04 - 15-06	*	2.182	0.558713
15-04 - 15-10	*	1.748	0.558713
15-04 - 18-07	*	1.012	0.558713
15-04 - 19-11	*	2.178	0.558713
15-04 - 30-08	*	0.634	0.558713
15-04 - 30-11	*	2.154	0.558713
15-04 - 30-12	*	1.718	0.558713
15-04 - 31-07	*	1.254	0.558713
15-04 - 31-10	*	2.754	0.558713
15-04 - 02-02	*	2.09	0.558713
15-04 - 1-06	*	3.786	0.558713
15-04 - 17-01	*	0.968	0.558713
15-04 - 17-09	*	1.184	0.558713
15-04 - 30-03	*	-1.43	0.558713
15-05 - 15-06		0.516	0.558713
15-05 - 15-10		0.082	0.558713
15-05 - 18-07	*	-0.654	0.558713
15-05 - 19-11		0.512	0.558713
15-05 - 30-08	*	-1.032	0.558713
15-05 - 30-11		0.488	0.558713
15-05 - 30-12		0.052	0.558713
15-05 - 31-07		-0.412	0.558713
15-05 - 31-10	*	1.088	0.558713
15-05 - 02-02		0.424	0.558713
15-05 - 1-06	*	2.12	0.558713
15-05 - 17-01	*	-0.698	0.558713
15-05 - 17-09		-0.482	0.558713
15-05 - 30-03	*	-3.096	0.558713
15-06 - 15-10		-0.434	0.558713
15-06 - 18-07	*	-1.17	0.558713
15-06 - 19-11		-0.004	0.558713
15-06 - 30-08	*	-1.548	0.558713
15-06 - 30-11		-0.028	0.558713
15-06 - 30-12		-0.464	0.558713
15-06 - 31-07	*	-0.928	0.558713
15-06 - 31-10	*	0.572	0.558713

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
15-06 - 02-02		-0.092	0.558713
15-06 - 1-06	*	1.604	0.558713
15-06 - 17-01	*	-1.214	0.558713
15-06 - 17-09	*	-0.998	0.558713
15-06 - 30-03	*	-3.612	0.558713
15-10 - 18-07	*	-0.736	0.558713
15-10 - 19-11		0.43	0.558713
15-10 - 30-08	*	-1.114	0.558713
15-10 - 30-11		0.406	0.558713
15-10 - 30-12		-0.03	0.558713
15-10 - 31-07		-0.494	0.558713
15-10 - 31-10	*	1.006	0.558713
15-10 - 02-02		0.342	0.558713
15-10 - 1-06	*	2.038	0.558713
15-10 - 17-01	*	-0.78	0.558713
15-10 - 17-09	*	-0.564	0.558713
15-10 - 30-03	*	-3.178	0.558713
18-07 - 19-11	*	1.166	0.558713
18-07 - 30-08		-0.378	0.558713
18-07 - 30-11	*	1.142	0.558713
18-07 - 30-12	*	0.706	0.558713
18-07 - 31-07		0.242	0.558713
18-07 - 31-10	*	1.742	0.558713
18-07 - 02-02	*	1.078	0.558713
18-07 - 1-06	*	2.774	0.558713
18-07 - 17-01		-0.044	0.558713
18-07 - 17-09		0.172	0.558713
18-07 - 30-03	*	-2.442	0.558713
19-11 - 30-08	*	-1.544	0.558713
19-11 - 30-11		-0.024	0.558713
19-11 - 30-12		-0.46	0.558713
19-11 - 31-07	*	-0.924	0.558713
19-11 - 31-10	*	0.576	0.558713
19-11 - 02-02		-0.088	0.558713
19-11 - 1-06	*	1.608	0.558713
19-11 - 17-01	*	-1.21	0.558713
19-11 - 17-09	*	-0.994	0.558713
19-11 - 30-03	*	-3.608	0.558713
30-08 - 30-11	*	1.52	0.558713
30-08 - 30-12	*	1.084	0.558713
30-08 - 31-07	*	0.62	0.558713
30-08 - 31-10	*	2.12	0.558713
30-08 - 02-02	*	1.456	0.558713
30-08 - 1-06	*	3.152	0.558713
30-08 - 17-01		0.334	0.558713

Tabla N° 25. (Continuación)

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
30-08 - 17-09		0.55	0.558713
30-08 - 30-03	*	-2.064	0.558713
30-11 - 30-12		-0.436	0.558713
30-11 - 31-07	*	-0.9	0.558713
30-11 - 31-10	*	0.6	0.558713
30-11 - 02-02		-0.064	0.558713
30-11 - 1-06	*	1.632	0.558713
30-11 - 17-01	*	-1.186	0.558713
30-11 - 17-09	*	-0.97	0.558713
30-11 - 30-03	*	-3.584	0.558713
30-12 - 31-07		-0.464	0.558713
30-12 - 31-10	*	1.036	0.558713
30-12 - 02-02		0.372	0.558713
30-12 - 1-06	*	2.068	0.558713
30-12 - 17-01	*	-0.75	0.558713
30-12 - 17-09		-0.534	0.558713
30-12 - 30-03	*	-3.148	0.558713
31-07 - 31-10	*	1.5	0.558713
31-07 - 02-02	*	0.836	0.558713
31-07 - 1-06	*	2.532	0.558713
31-07 - 17-01		-0.286	0.558713
31-07 - 17-09		-0.07	0.558713
31-07 - 30-03	*	-2.684	0.558713
31-10 - 02-02	*	-0.664	0.558713
31-10 - 1-06	*	1.032	0.558713
31-10 - 17-01	*	-1.786	0.558713
31-10 - 17-09	*	-1.57	0.558713
31-10 - 30-03	*	-4.184	0.558713
02-02 - 1-06	*	1.696	0.558713
02-02 - 17-01	*	-1.122	0.558713
02-02 - 17-09	*	-0.906	0.558713
02-02 - 30-03	*	-3.52	0.558713
1-06 - 17-01	*	-2.818	0.558713
1-06 - 17-09	*	-2.602	0.558713
1-06 - 30-03	*	-5.216	0.558713
17-01 - 17-09		0.216	0.558713
17-01 - 30-03	*	-2.398	0.558713
17-09 - 30-03	*	-2.614	0.558713

* Denota una diferencia estadísticamente significativa

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de las que otros. La **Tabla N° 25** muestra la diferencia estimada entre cada par de medios. Un asterisco se ha

colocado al lado de 198 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95,0%. En la parte superior la **Tabla Nº 24** indica el nivel de significancia en los porcentajes de cada muestra. El método que actualmente se utiliza para discriminar entre los medios es mínima diferencia significativa de Fisher procedimiento (LSD). Con este método, existe un riesgo de 5,0% de llamar a cada par de medios significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.