



Cuantificación de sesquiterpenlactonas procedentes de las hojas de *Calea urticifolia* (Asteraceae) durante el año 2012

Josué R. Villacorta

Laboratorio de Investigación en Productos Naturales,
Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

Rosa Miriam Rivas

Laboratorio Físicoquímico de Aguas,
Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

Marvin J. Núñez

Laboratorio de Investigación en Productos Naturales,
Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
Correo electrónico: marvin.nunez@ues.edu.sv

Juan Pablo Sánchez-Pérez

Laboratorio de Tecnología Farmacéutica,
Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

Morena L. Martínez

Laboratorio de Investigación en Productos Naturales,
Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo principal la cuantificación de sesquiterpenlactonas presentes en los extractos cloro fórmicos secos de hojas de *Calea urticifolia* “Juanislama”, recolectadas bimensualmente durante el año 2012. Los metabolitos secundarios se extrajeron por medio del método Soxhlet usando cloroformo como solvente; se llevó a cabo la identificación de los metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina con reactivo de Baljet y espectroscopía UV utilizando marcadores analíticos. La cuantificación se realizó por espectroscopía visible usando Juanislamina como marcador analítico, encontrándose que el porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto clorofórmico seco vario entre 39.58-90.02%, observándose el periodo del 02-02 al 15-04, 18-07 al 31-07 y 30-08 al 17-09 como los mejores, destacándose la recolecta del 15-02 con 90.02%; con respecto al porcentaje de sesquiterpenlactonas totales en el material vegetal seco, este vario entre 2.84-8.06%, observándose los periodos del 15-03 al 15-04 y 30-08 al 17-09 como los mejores, destacándose la recolecta del 30-03 con 8.06%.

Palabras clave: Sesquiterpenlactonas, *Calea urticifolia*, Cuantificación, Asteraceae, Estandarización.

Abstract

Quantification of sesquiterpene lactones present in dried leaves of *Calea urticifolia* “Juanislama” was systematically carried out for the whole year 2012. Leaves samples were recollected bimonthly, and the sesquiterpene lactones were extracted utilizing the Soxhlet method with chloroform as solvent. The identification of the secondary metabolites was performed by thin-layer chromatography using the Baljet reagent and by UV/Vis spectroscopy utilizing chemical markers. The concentration of total sesquiterpene lactones, expressed as Juanislamine, found in the dried chloroform extract ranged from 39.58 to 90.02%. It was observed that the time periods from February 2 to April 15, from July 18 to July 31, and from August 30 to September 17 displayed the best yields, being the sampling on February 15 the one that led to the highest yield at an outstanding 90.02%. Regarding the percentage of total sesquiterpene lactones in the dried vegetal material, this ranged from 2.84% to 8.06% in the study. Likewise, the best time periods for such percentage fell from March 15 to April 15, and from August 30 to September 17, distinguishing the sample taken on March 30, which yielded a maximum of 8.06% of sesquiterpene lactones in the dried material.

Key words: Sesquiterpene lactones, *Calea urticifolia*, Quantification, Asteraceae, Standardization.



Introducción

En los últimos años la investigación y desarrollo de fármacos de origen vegetal ha cobrado una especial importancia por la exhortación hecha por la Organización Mundial de la Salud, en cuanto a que cada país utilice todos sus recursos en pro de la atención primaria en salud.¹ La medicina herbolaria tradicional de El Salvador, ha hecho aportes importantes en el uso de diferentes plantas medicinales que han servido a la población para el tratamiento de muchos padecimientos de salud. Entre las familias botánicas de interés medicinal se encuentra la Familia Asteraceae, la cual está conformada por un amplio número de géneros botánicos, así, dentro de esta Familia se destaca el género *Calea*, el cual comprende más de 120 especies aceptadas², la mayoría de los cuales crecen alrededor de las zonas tropicales y subtropicales de América y son principalmente arbustos que crecen en lugares abiertos.

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Tribu: Neurolaeneae

Género: *Calea*

Especie: *Calea urticifolia* (Mill.) DC.

1 Organización Mundial de la Salud (OMS), Informe sobre la salud en el mundo 2008, La atención primaria en salud, Capítulo 2, Impulsar y mantener la cobertura universal, pág. 25-40, 2008.
2 Lixin, L., Ping L., Min Y., Lei Z. Dean G. Cytotoxic resibufogenin transformation products from cell suspension cultures of *Platycodon grandiflorum*. Lett. Org. Chem. 2004. Pág. 176-178.

Calea urticifolia, comúnmente conocido como “Juanislama”, es un arbusto erecto de 0.6-3.5 metros de altura, de hojas simples, opuestas, de borde aserrado o crenado, de ovaladas a lanceoladas, pilosas, trinervadas, ásperas o escamosas en la haz, en general densamente pilosas en el envés; con tallos en general densamente pubescentes con tricomas patentes color café; flores amarillas reunidas en capítulos, dispuestas en inflorescencia umbeliformes, capítulos abiertos o amontonados; frutos en aquenio cilíndricos, de 1.5-3 cm de largo con vilano de escamas angostas (Fig. 1). Esta especie ha sido usada por la población para el tratamiento de úlceras gástricas, dolor de estómago, artritis, fiebre, cáncer, analgésico, diabetes entre otros.^{3,4,5}

Los metabolitos secundarios que destacan en *Calea urticifolia* son las sesquiterpenlactonas (STLs), marcadores quimiotaxonómicos de la familia Asteraceae.⁶ Las sesquiterpenlactonas son responsables de diferentes actividades biológicas entre las cuales destacan, la actividad citotóxica, antioxidante, antiviral, antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatoria, analgésica etc.⁷ Las sesquiterpenlactonas son estructuras terpénicas que poseen 15 átomos de carbono, incluyendo una lactona α - β insaturada y sus concentraciones pueden variar entre el 0.01 y el 8% del peso seco, siendo las concentraciones mayores generalmente en las

hojas, aunque se encuentran distribuida en toda la planta. De *Calea urticifolia* se han aislado diferentes sesquiterpenlactonas, de las cuales destacan nueve de la serie del germacranólido, conocidas como: Juanislamina, 2,3-epoxijuanislamina, Caleina D, 2,3-epoxicaleina D, Calealactona A-C, 3-epoxi-Calealactona A y Arucanólido.^{8,9,10,11}

Como es conocido, las plantas han sido utilizadas históricamente en el tratamiento de varios padecimientos, lo que abrió la puerta a un gran número de investigaciones, las cuales, con las metodologías clásicas de productos naturales permitieron descubrir una gran variedad de metabolitos secundarios bioactivos.

Muchos pasaron a transformarse en fármacos,¹² convirtiendo así a los productos naturales en la fuente más abundante de moléculas potenciales para el desarrollo¹³ de fármacos. La evolución de las ciencias farmacéuticas ha dado origen a los fitofármacos, una nueva categoría medicinal en donde converge el conocimiento etnomédico y el conocimiento farmacológico moderno; por lo tanto, se ha pasado del uso de la planta como tal al uso de extractos estandarizados con un marcador.

8 Borges, J. del Castillo, M. T. Manresa, F. Rodríguez Luis and P. Vázquez Bueno NGL and SCA. Salvadorian Compositae. II. Juanislamin and 2,3-Epoxy-juanislamin, Two New Sesquiterpene lactones from *Calea urticifolia*. J Nat Prod. 1981;44:348-350.

9 Borges del Castillo, J.; Manresa Ferrero, T. M.; Rodríguez Luis, F.; Vázquez Bueno, P.; Genovés Leonor, N.; Portillo de Rivas RM. Compuestas Salvadoreñas I. Caleina D y 2,3-epoxicaleina D, dos Germacranólidos de la *Calea urticifolia*. An Química. 1980;77:1980-1982

10 Yamada M, Matsuura N, Suzuki H, Kurosaka C, Hasegawa N, Ubukata M, Tanaka T, Iinuma M. Germacranolides from *Calea urticifolia*. Phytochemistry. 2004;65(23):3107-3111.

11 Ohguchi K, Ito M, Yokoyama K, Iinuma M, Itoh T, Nozawa Y, Akao Y. Effects of sesquiterpene lactones on melanogenesis in mouse B16 melanoma cells. Biol Pharm Bull. 2009;32(2):308-310.

12 Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. Metabolites. 2012;2(2):303-336

13 Harvey AL. Natural products in drug discovery. Drug Discov Today. 2008;13:894-901.

3 Ortiz Segura M del C. Evaluación del extracto etanólico de *Calea urticifolia* (Mill.) DC. Sobre la regulación de la secreción de adipocinas asociadas a la resistencia a la insulina [Internet]. Universidad Autónoma de Luis Potosí; 2011.

4 Salguero, R.M.; Valencia, C.M.; Vásquez, M. E. Estudio etnobotánico de plantas medicinales en el municipio de Santo Tomás, Universidad de El Salvador, El Salvador, 1994.

5 González Ayala JC. Botánica medicinal popular. Segunda Ed. El Salvador, Centro América: CUSCATLANIA; 2002.

6 Chadwick M, Trewin H, Gawthrop F, Wagstaff C. Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. Int. J. Mol. Sci. 2013; 14: 12780-12805.

7 Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda ed. Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.



Figura. 1. Arbusto de *Calea urticifolia* y detalles de sus hojas, tallo, flores y fruto.



El desarrollo de fitomedicamentos incluye la comprensión de algunos aspectos de la planta, tales como: aspectos biológicos, químicos, genéticos y agronómicos. La consistencia química en todas las etapas del proceso de fabricación es de mucha importancia para garantizar la eficacia medicinal y seguridad de los consumidores. Esto incluye todas las etapas, tales como: extracción, estabilidad, vida útil y la pureza de dichos medicamentos.¹⁴

Por lo tanto, si en un futuro se deseara realizar la fabricación de un fitofármaco a partir de *Calea urticifolia*, un dato importante a considerar, es conocer el periodo del año donde dicha especie produce mayor cantidad de sesquiterpenlactonas, lo cual es útil para optimizar los procesos de producción de dicho fitofármaco. Este se considera como el primer estudio que se ha llevado a cabo sobre la cuantificación de sesquiterpenlactonas en esta especie vegetal en El Salvador.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Calea urticifolia (Mill) DC, fue recolectada en el Campus Central de la Universidad de El Salvador en el enero de 2012 y fue identificada por Jenny Menjivar (vaucher J. Menjivar & M. Nuñez 3220), curadora del Herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador, El Salvador.

Obtención del extracto clorofórmico seco

Para la cuantificación, las hojas fueron recolectadas bimensualmente durante todo el año de 2012, estas se secaron a 40°C en la claridad, luego se molieron obteniendo partículas con tamaño de 2.0 mm, la extracción se llevó a cabo por el método Soxhlet

hasta agotar la muestra utilizando cloroformo como solvente selectivo. El extracto clorofórmico se concentró en un evaporador rotatorio, obteniendo así los extractos clorofórmicos secos (ECS).

Fórmula 1.

$$\text{Porcentaje de rendimiento de extracto} = \frac{\text{Peso de extracto seco}}{\text{Peso de material vegetal seco}} \times 100$$

Identificación de sesquiterpenlactonas

Identificación de las sesquiterpenlactonas por Cromatografía de Capa Fina

Los extractos clorofórmicos secos (ECS) obtenidos, fueron desarrollados en una placa cromatográfica de capa fina (CCF), utilizando cromatoplasmas de gel de sílice 20 x 10 cm de 0.25 mm de espesor, para lo cual se usó la fase móvil n-hexano-éter etílico (2:8). Las placas cromatográficas fueron reveladas con el reactivo Baljet. Las muestras fueron comparadas con tres marcadores (Juanislamina, Caleina D y 2,3-epoxicaleina), obtenidos previamente de *Calea urticifolia*; determinándose además el R_f de cada mancha anaranjada.¹⁵

Identificación de las sesquiterpenlactonas por espectroscopia ultravioleta

Se pesaron 10.0 mg de extracto clorofórmico seco de cada una de las muestras, se disolvieron en etanol absoluto y se aforaron a volumen en un frasco volumétrico de 100.0 mL., posteriormente se obtuvo el espectro UV en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800, haciendo un barrido de 190

a 400 nm. Los espectros de las muestras fueron comparados con los espectros de los marcadores analíticos.¹⁵

Cuantificación de sesquiterpenlactonas

Cuantificación de sesquiterpenlactonas totales mediante espectroscopia visible

La cuantificación de las sesquiterpenlactonas se llevó a cabo adaptando la metodología de la Farmacopea Italiana¹⁶, utilizando como marcador analítico la Juanislamina (sesquiterpenlactona mayoritaria que presenta el mayor número de grupos cromóforos en su estructura¹⁵).

Se determinó el porcentaje de sesquiterpenlactonas totales en el extracto clorofórmico seco (ECS) y en el material vegetal seco (MVS), expresado como Juanislamina.¹⁷

Se disolvió 10.0 mg de la muestra (ECS) en alcohol etílico absoluto y se aforó con el mismo solvente hasta 10.0 mL. A 5 mL. de cada solución se le agregaron 3.0 mL. de solución alcalina de picrato de sodio. Se dejó reposar por 30 minutos protegiéndose de la luz y luego se determinó la máxima absorbancia de cada solución a 495 nm. Se preparó una solución de referencia de igual manera, utilizando como marcador analítico la Juanislamina. Además, se utilizó como blanco una mezcla de 5.0 mL. de alcohol etílico absoluto y 3.0 mL. de solución alcalina de picrato de sodio preparada al mismo tiempo.

16 Farmacopea ufficiale della repubblica Italiana, Ottava edizione, Istituto Poligrafico de Ilo statu P.V. II Volume, 390-393, 1972.

17 EMEA (European Medicine Agency Inspection). Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products, CPMP/QWP/2819/00 and EMEA/CVMP/814/00. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), 2007.

15 Nuñez, M.J.; Bazzocchi, L.L.; Martínez, M. L.; Rodríguez, M.L.; Torres, D.F.; Guzmán, J. A.; 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.

14 Mukherjee PK. Evidence-Based Validation of Herbal Medicine. Primera Ed. USA: Elsevier; 2015.



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

Fórmula 2.

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

Dónde:

C_{mx} = Concentración de la muestra

$C_{marc.}$ = Concentración del marcador analítico

A_{marc} = Absorbancia del marcador analítico

A_{mx} = Absorbancia de la muestra

FD = Factor de dilución

El proceso de cuantificación antes descrito, se realizó por quintuplicado y se determinó la desviación estándar para comprobar su reproducibilidad.

En el diseño estadístico se analizaron los datos con la desviación típica estándar y sus respectivos intervalos de confianza al 95%, para obtener los resultados.

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. Este se calculó utilizando la siguiente fórmula:

Fórmula 3.

$$\% \text{ de sesquiterpenlactonas totales expresadas como marcador en el extracto clorofórmico seco} = \frac{\text{peso de sesquiterpenlactonas en la mx expresadas como marcador}}{\text{peso de extracto clorofórmico seco}} \times 100$$

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 MVS. El mismo fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

Fórmula 4.

$$\% \text{ de sesquiterpenlactonas totales expresadas como marcador en el material vegetal seco} = \frac{\text{peso de sesquiterpenlactonas en la mx expresadas como marcador}}{\text{peso del material vegetal seco}} \times 100$$

Diseño estadístico

Los datos fueron analizados por medio de la desviación típica estándar y sus respectivos intervalos de confianza, adicionalmente se realizó un análisis de varianza por medio del programa STATGRAPHICS centurion XV versión 15.2.11. Lo cual fue de importancia para evidenciar diferencia significativa entre las concentraciones de sesquiterpenlactonas de las diferentes recolectas.

Resultados y Discusión

Recolección del material vegetal

A cada muestra de las hojas de *C. urticifolia* recolectadas bimensualmente durante todo el año 2012 se les asignaron códigos para su debida identificación. (Tabla 1).

Identificación de sesquiterpenlactonas

Identificación de las sesquiterpenlactonas por Cromatografía de Capa Fina

Se realizó la cromatografía de capa fina para identificar la presencia de sesquiterpenlactonas en cada una de las muestras recolectadas, utilizando la fase móvil, n-hexano-éter etílico (2:8).

Se identificó la presencia de sesquiterpenlactonas en las diferentes muestras recolectadas, debido a la formación de manchas color naranja similar al presentado por los marcadores analíticos, Juanislamina, Caleina D y 2,3-epoxicaleina D, utilizando como revelador el reactivo de Baljet. Se observaron de 1 a 3 manchas en las muestras eluidas, pudiendo ser productos puros, debido a que presentan R_f similares a los marcadores analíticos. Además, se observa un perfil cromatográfico similar en todas las muestras analizadas, lo que indica la formación de las sesquiterpenlactonas mayoritarias a lo largo de los 12 meses, posiblemente como un mecanismo de defensa de esta especie vegetal frente a herbívoros, microorganismo y en la competencia con otras especies vegetales.

Identificación de las sesquiterpenlactonas Espectroscopia Ultravioleta

Se obtuvieron los espectros UV (190-400 nm) de los extractos clorofórmicos secos de las muestras recolectadas durante un año y de los marcadores analíticos. En la Tabla 2, se pueden observar la longitud de onda y absorbancia máxima de algunas colectas y del marcador Juanislamina; en las Figuras 2-5 se presentan los espectros UV de la Juanislamina y a modo de ejemplo, diferentes muestras de algunas fechas de recolección.

El resto de las muestras analizadas tuvieron un perfil similar a los espectros presentados.

Identificación de sesquiterpenlactonas

Identificación de las sesquiterpenlactonas por Cromatografía de Capa Fina

Se realizó la cromatografía de capa fina para identificar la presencia de sesquiterpenlactonas en cada una de las muestras recolectadas, utilizando la fase móvil, n-hexano-éter etílico (2:8). Se identificó la presencia de sesquiterpenlactonas en las diferentes muestras recolectadas, debido a la formación de manchas color naranja similar al presentado por los marcadores analíticos, Juanislamina, Caleina D y 2,3-epoxicaleina D, utilizando como revelador el reactivo de Baljet.

Se observaron de 1 a 3 manchas en las muestras eluidas, pudiendo ser productos puros, debido a que presentan R_f similares a los marcadores analíticos. Además, se observa un perfil cromatográfico similar en todas las muestras analizadas, lo que indica la formación de las sesquiterpenlactonas mayoritarias a lo largo de los 12 meses, posiblemente como un mecanismo de defensa de esta especie vegetal frente a herbívoros, microorganismo y en la competencia con otras especies vegetales.¹⁸

Identificación de las sesquiterpenlactonas Espectroscopia Ultravioleta

Se obtuvieron los espectros UV (190-400 nm) de los extractos clorofórmicos secos de las muestras recolectadas durante un año y de los marcadores analíticos. En la Tabla 2, se pueden observar la longitud de onda y absorbancia máxima de

algunas colectas y del marcador Juanislamina; en las Figuras 2-5 se presentan los espectros UV de la Juanislamina y a modo de ejemplo, diferentes muestras de algunas fechas de recolección. El resto de las muestras analizadas tuvieron un perfil similar a los espectros presentados.

Nótese al observar los datos reflejados en la Tabla 2, valores muy similares a los presentados por los marcadores y especialmente a la Juanislamina cuyo máximo de absorbancia se reportó a 268.5 nm. Lo anterior demuestra la presencia de sesquiterpenlactonas en los ECS.

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

Se determinaron los porcentajes de sesquiterpenlactonas totales expresados como el marcador mayoritario (Juanislamina) en el ECS empleando la Formula 3, los resultados se muestran graficados en la Figura 6.

En la Figura 6, se puede observar los porcentajes de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en todas las muestras recolectadas, relacionadas al peso de extracto clorofórmico seco durante el año 2012, en donde el porcentaje varió entre 39.58-90.02%, observándose el periodo del 02-02 al 15-04, 18-07 al 31-07 y 30-08 al 17-09 como los mejores, destacándose la recolecta del 15-02 (15 de febrero; 90.02%) que fue la muestra con nivel más alto de sesquiterpenlactonas.

Tabla 1. Fechas y códigos de muestras asignadas a las recolectas realizadas de *Calea urticifolia*.

Fecha de recolección	Código de muestra	Fecha de recolección	Código de muestra
17 de enero	17-01	18 de julio	18-07
2 de febrero	02-02	31 de julio	31-07
15 de febrero	15-02	14 de agosto	14-08
1 de marzo	01-03	30 de agosto	30-08
15 de marzo	15-03	17 de septiembre	17-09
30 de marzo	30-03	01 de octubre	01-10
15 de abril	15-04	15 de octubre	15-10
2 de mayo	02-05	31 de octubre	31-10
15 de mayo	15-05	19 de noviembre	19-11
1 de junio	01-06	30 de noviembre	30-11
15 de junio	15-06	14 de diciembre	14-12
2 de julio	02-07	30 de diciembre	30-12

Tabla 2. Absorbancia y longitud de onda máxima de algunas recolectas y del marcador Juanislamina.

Muestras	Absorbancia máxima	Longitud de onda máxima (nm)
17-01	0.700	270.5
30-03	0.560	269.5
15-04	0.656	270.0
15-05	0.643	269.5
01-06	0.495	270.0
31-07	0.389	269.1
14-08	0.631	269.6
17-09	0.485	269.1
01-10	0.659	268.7
19-11	0.413	270.1
30-12	0.494	269.2
Juanislamina	0.700	268.5

¹⁸ Ramirez M. Aldana, Saillard Nils, Yang Ting, Franssen Maurice C.R, Bouwmeester Harro J, Jongma A. Maarten, Biosynthesis of Sesquiterpene Lactones in Pyrethrum (*Tanacetum cinnabarinifolium*). PLoS One. 2013; 8(5):1-13.

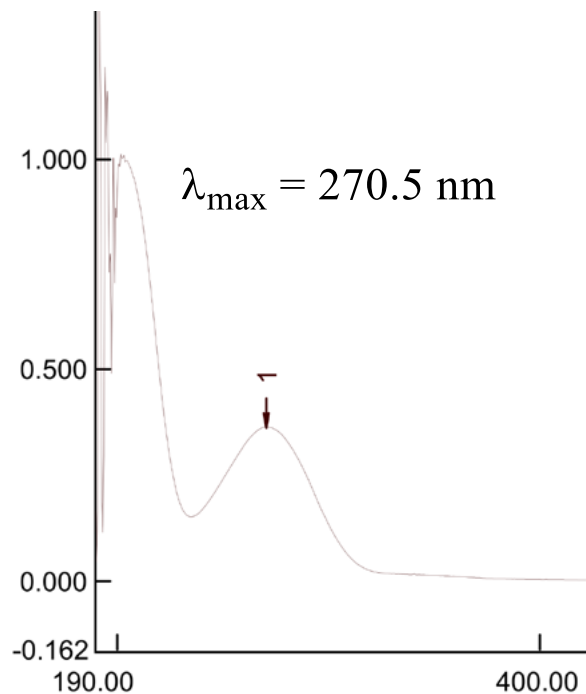


Figura 2. Espectro de la Caleína D.

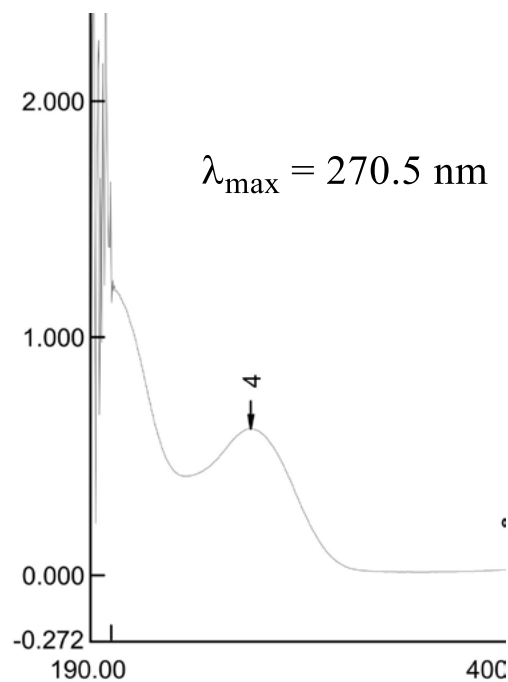


Figura 3. Espectro de la colecta 17-01.

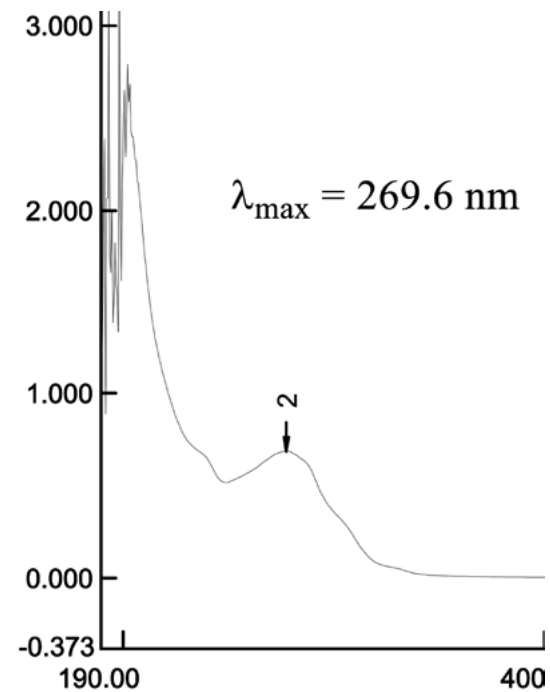


Figura 4. Espectro de la recolecta 14-08.

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. 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.

Porcentaje de sesquiterpenlactonas (STLs) totales presentes en material vegetal seco (MVS)

Se determinaron los porcentajes de sesquiterpenlactonas totales expresados como el marcador mayoritario (Juanislamina) en el MVS empleando la fórmula 4, la representación de estos se muestra en la Figura 7.

El porcentaje de sesquiterpenlactonas totales expresadas como Juanislamina en el material

vegetal seco varió entre 2.84-8.06%, observándose los periodos del 15-03 al 15-04 y 30-08 al 17-09 como los mejores, destacándose la recolecta del 30 de marzo; 8.06%, seguida por la muestra del 15 de marzo; 6.74%.

La muestra con menor porcentaje en todo el 2012 fue la del 1 de junio; 2.84%. 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.

Análisis estadístico

Es importante destacar que de forma general se observa que tanto la 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 poca dispersión entre las repeticiones de una misma muestra.

En cuanto al análisis de varianza, mostró un valor $P=0.0000$, lo que indica que, sí existe diferencia significativa en una forma general entre los porcentajes de las muestras. La prueba de suposición de la normalidad, presentó una recta al graficar los porcentajes contra residuos, justificando así el análisis de las varianzas. Los residuos mostraron 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, demostró los porcentajes que tienen más diferencia significativa entre las distintas muestras, permitiendo reforzar lo concluido anteriormente sobre los mejores porcentajes obtenidos de sesquiterpenolactonas totales en extracto clorofórmico seco y en material vegetal seco.

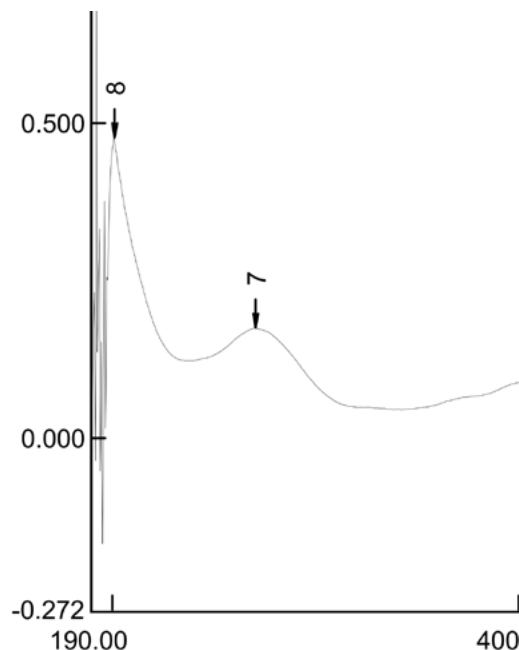


Figura 5. Espectro de la recolecta 30-12

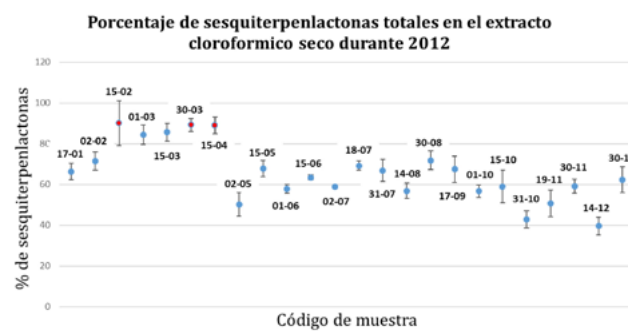


Figura 6. Gráfica del porcentaje de sesquiterpenolactonas totales expresadas como Juanislamina en el extracto clorofórmico seco de cada muestra recolectada durante el año 2012.

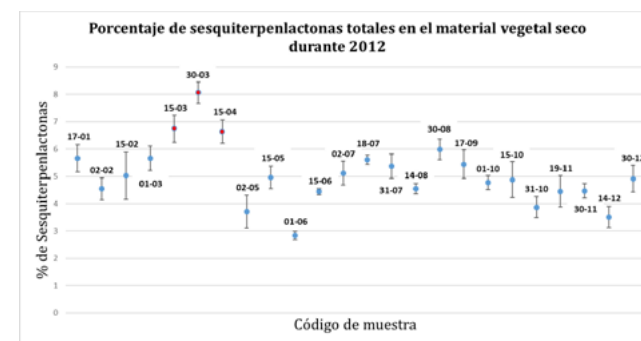


Figura 7. Gráfica de la cantidad de sesquiterpenolactonas totales expresadas como Juanislamina en el material vegetal seco de cada muestra recolectada durante el año 2012.

Conclusiones

Al llevar a cabo la identificación de las sesquiterpenolactonas por espectroscopía UV en las muestras, se observó un máximo de absorbancia entre 268-278 nm debido a la presencia de dobles enlaces conjugados y lactonas α - β insaturadas en las estructuras moleculares, lo que coincide con lo observado en los marcadores analíticos. En cuanto al proceso de cuantificación se encontró que el porcentaje de sesquiterpenolactonas totales en el extracto clorofórmico seco, varío entre 39.58% y 90.02%, observándose el periodo del 02 de febrero al 15 de abril; 18 de Julio al 31 de Julio y 30 de agosto al 17 de septiembre como los mejores, destacándose la recolecta del 15 de febrero con 90.02%. Con respecto al porcentaje de sesquiterpenolactonas totales en el material vegetal seco, este varío entre 2.84% y 8.06% observándose los periodos del 15 de marzo al 15 de abril y 30 de agosto al 17 de septiembre como los mejores, destacándose la recolecta del 30 de marzo como la mejor. Los porcentajes de sesquiterpenolactonas



en el extracto clorofórmico seco (ECS), como en material vegetal seco (MVS) en los diferentes periodos del año son importantes si nuestro fin es la formulación de fitofármacos, ya sea a través de un extracto estandarizado o con el material vegetal seco molido. Las variaciones en los porcentajes pueden estar influenciado por la estación climática en la cual se hizo la recolecta; por lo que se aprecia, en la época seca se obtienen recolectas con mayor contenido de sesquiterpenlactonas, en cambio, en la época húmeda se observan recolectas con menor contenido de sesquiterpenlactonas. La producción de sesquiterpenlactonas constituye un mecanismo de defensa de esta especie vegetal frente a herbívoros, microorganismo y en la competencia con otras especies vegetales, las variaciones pueden verse influenciadas también por factores como la edad de la planta, floración, estación climática y temperatura.

Bibliografía

- Organización Mundial de la Salud (OMS), Informe sobre la salud en el mundo 2008, La atención primaria en salud, Capítulo 2, Impulsar y mantener la cobertura universal, pág. 25-40, 2008.
- Lixin, L., Ping L., Min Ye., Lei Zhong., Dean Guo. Cytotoxic resibufogenin transformation products from cell suspension cultures of *Platycodon grandiflorum*. Lett. Org. Chem. 2004. Pág. 176-178.
- Ortiz Segura María del Carmen. Evaluación del extracto etanólico de *Calea urticifolia* (Mill.) DC. sobre la regulación de la secreción de adipocinas asociadas a la resistencia a la insulina. Universidad Autónoma de Luis Potosí; 2011.
- Salguero, R.M.; Valencia, C.M.; Vásquez, M. E. Estudio etnobotánico de plantas medicinales en el municipio de Santo Tomás, Universidad de El Salvador, El Salvador, 1994.
- González Ayala JC. Botánica medicinal popular. Segunda Ed. El Salvador, Centro América: CUSCATLANIA; 2002.
- Chadwick M, Trewin H, Gawthrop F, Wagstaff C. Sesquiterpenoids Lactones: benefits to plants and people. Int. J. Mol. Sci. 2013; 14: 12780-12805.
- Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda ed. Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994. 53-63 p.
- Borges, J. del Castillo, M. T. Manresa, F. Rodríguez Luis and P. Vázquez Bueno NGL and SCA. Salvadorian Compositae. II. Juanislamin and 2,3-Epoxy-juanislamin, two new sesquiterpenic lactones from *Calea urticifolia*. J Nat Prod. 1981;44: 348–350.
- Borges del Castillo, J.; Manresa Ferrero, T. M.; Rodríguez Luis, F.; Vázquez Bueno, P.; Genovés Leonor, N.; Portillo de Rivas RM. Compuestas Salvadoreñas I. caleina D y 2,3- epoxicaleina D, dos Germacranólidos de la *Calea urticifolia*. An Química. 1980;77:1980–1982.
- Yamada M, Matsuura N, Suzuki H, Kurosaka C, Hasegawa N, Ubukata M, Tanaka T, Inuma M. Germacranolides from *Calea urticifolia*. Phytochemistry. 2004;65(23):3107–3111.
- Ohguchi K, Ito M, Yokoyama K, Inuma M, Itoh T, Nozawa Y, Akao Y. Effects of sesquiterpene lactones on melanogenesis in mouse B16 melanoma cells. Biol Pharm Bull. 2009;32(2):308–310.
- Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012;2(2):303–336.
- Harvey AL. Natural products in drug discovery. Drug Discov Today. 2008;13 (October):894–901.
- Mukherjee PK. Evidence-Based Validation of Herbal Medicine. Primera Ed. USA: Elsevier; 2015.
- Núñez, M.J.; Bazzocchi, I. L.; Martínez, M. L.; Rodríguez, M.L.; Torres, D.F.; Guzmán, J. A.; 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.
- Farmacopea ufficile della repubblica Italiana, Ottava edizione, Instituto Poligrafico de Ilo statu P.V. II Volume, 390-393, 1972.
- EMEA (European Medicine Agency Inspection). Guideline on quality of herbal medicinal products/ traditional herbal medicinal products, CPMP/ QWP/2819/00 and EMEA/CVMP/814/00. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), 2007.
- Ramirez M. Aldana, Saillard Nils, Yang Ting, Franssen Maurice C.R, Bouwmeester Harro J, Jongsma A. Maarten, Biosynthesis of Sesquiterpene Lactones in *Pyrethrum* (*Tanacetum cinerariifolium*). PLoS One. 2013; 8(5):1–13.