

Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación

Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud –PUIIS-

Informe final

Aislamiento y purificación de camazuleno y sus precursores sesquiterpenlactónicos en *Stevia serrata* Cav. de diferentes poblaciones del occidente de Guatemala, como fuente potencial para la obtención de antiinflamatorios naturales

Equipo de investigación

Coordinador

Dr. Juan Francisco Pérez Sabino

Investigadores

Lic. Manuel Alejandro Muñoz Wug

Lic. Max Samuel Mérida Reyes

Guatemala, 11 de enero de 2019

Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas –IIQB-
Instituto de Investigaciones de Productos Naturales, Universidad Federal de Río de Janeiro,
Brasil

Dr. Erwin Humberto Calgua Guerra
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Dr. Hilda Valencia de Abril
Coordinadora del PUIIS

Dr. Juan Francisco Pérez Sabino
Coordinador

Lic. Manuel Alejandro Muñoz Wug
Investigador

Lic. Max Samuel Mérida Reyes
Investigador

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2018.
El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Partida Presupuestaria 4.8.63.1.06 durante el año 2018 en el Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud.

Financiamiento aprobado por Digi: Q 306,101.⁰⁰ Financiamiento ejecutado: Q 69, 962.⁵⁴

INDICE GENERAL

1.	Resumen.....	1
2.	Palabras clave	1
3.	Abstract and Keywords	2
4.	Introducción	3
5.	Planteamiento del problema	5
6.	Preguntas de investigación.....	7
7.	Delimitación en tiempo y espacio	7
8.	Marco teórico.....	8
8.1	Las plantas del género <i>Stevia</i>	8
8.1.1	Distribución.....	8
8.1.2	Hábitat.....	8
8.1.3	Descripción botánica y hábito.....	8
8.1.4	Etnobotánica e importancia comercial	8
8.1.5	Composición química	9
8.2	Las plantas del género <i>Stevia</i> de Guatemala	9
8.3	La especie <i>Stevia serrata</i> Cav.	10
8.3.1	Distribución.....	10
8.3.2	Hábitat.....	10
8.3.3	Descripción botánica y hábito.....	10
8.3.4	Usos etnomédicos	10
8.3.5	Composición química	11
8.3.6	Ensayos farmacológicos	12
8.4	El sesquiterpeno camazuleno	12
8.4.1	Propiedades farmacológicas del camazuleno.....	12
8.4.2	Compuestos precursores del camazuleno	13
8.4.3	Propiedades farmacológicas de la matricina	13
8.4.4	Propiedades farmacológicas del camazuleno ácido carboxílico	13
9.	Estado del arte	13
10.	Objetivo general	14
11.	Objetivos específicos.....	14
12.	Hipótesis.....	14
13.	Materiales y métodos.....	15

15.	Resultados	19
15.1	Colecta de individuos	19
15.2	Rendimientos de humedad y de aceite esencial	20
15.3	Composición del aceite esencial	21
15.4	Pesos y rendimientos de extractos etanólicos.....	22
15.5	Pesos y rendimientos de extractos diclorometánicos.....	23
15.6	Pesos y rendimientos de fracciones orgánicas	23
15.7	Actividad antioxidante de extractos crudos.....	24
15.8	Actividad antioxidante de fracciones orgánicas	24
16.	Discusión de resultados	26
16.1	Rendimiento y composición del aceite esencial	26
16.2	Rendimiento de extractos.....	27
16.3	Actividad antioxidante	27
17.	Conclusiones	28
18.	Impacto esperado	28
19.	Referencias.....	29

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	19
Tabla 2.....	20
Tabla 3.....	21
Tabla 4.....	23
Tabla 5.....	23
Tabla 6.....	24
Tabla 7.....	24
Tabla 8.....	25
Apéndice I.....	33

Aislamiento y purificación de camazuleno y sus precursores sesquiterpenlactónicos en *Stevia serrata* Cav. de diferentes poblaciones del occidente de Guatemala, como fuente potencial para la obtención de antiinflamatorios naturales.

1. Resumen

El género *Stevia* (Asteraceae) consiste entre 220-230 especies confinadas exclusivamente al norte, centro y sur de América. De las dieciocho especies del género reportadas para Guatemala, únicamente dos se reportan de ser utilizadas como plantas medicinales por pobladores del altiplano del país: *Stevia serrata* Cav. y *Stevia polycephala* Bertol. En este estudio se obtuvieron los rendimientos y composición del aceite esencial, así como la actividad antioxidante de extractos de las partes aéreas de individuos de *S. serrata* colectadas en nueve localidades de cinco departamentos del altiplano guatemalteco. Los rendimientos del aceite esencial obtenido del material vegetal seco se presentaron en valores entre 0.08 y 0.37% p/p, mientras que los extractos se mostraron en valores de rendimiento entre 2.06 y 23.72% p/p, presentando los extractos etanólicos los mayores valores de rendimiento. La composición del aceite esencial de tres localidades de *S. serrata* mostró la presencia del sesquiterpeno camazuleno en una concentración mayor al 30%. Los extractos crudos de diferentes localidades de *S. serrata* no mostraron actividad antioxidante.

2. Palabras clave

Aceite esencial, sesquiterpenlactonas, extractos etanólicos.

3. Abstract and Keywords

The genus *Stevia* (Asteraceae) consists about 220-230 species confined exclusively to the north, center and south of America. Of the eighteen species of the genus reported for Guatemala, only two of them are published to be used as medicinal plants by indigenous people of the highlands of the country: *Stevia serrata* Cav. and *Stevia polycephala* Bertol. In this study the yields and the composition of the essential oil were obtained, as well as the antioxidant activity of extracts of the aerial parts from several individuals of *S. serrata* collected in nine localities of five departments of the Guatemalan highlands.

The yields of essential oil are obtained from dried plant material, with values from 0.08 to 0.37% w/w, while the extracts showed values from 2.06 to 23.72% w/w, with ethanolic extracts showing the highest values. The composition of the essential oil from three localities of *S. serrata* showed the presence of sesquiterpene camazulene in a concentration greater than 30%. The crude extracts of different localities of *S.serrata* did not show antioxidant activity.

Essential oil, sesquiterpenlactones, ethanolic extracts.

4. Introducción

La elevada biodiversidad de Guatemala, causada por la gran variedad de microclimas y la convergencia de las floras de América del Norte y del Sur, presenta plantas que han desarrollado una gran cantidad de metabolitos secundarios para cumplir funciones de defensa e interacción con el entorno. Muchos de estos metabolitos presentan actividades biológicas y farmacológicas que son aprovechadas por las comunidades, a través de la utilización de las plantas para tratamiento de diferentes enfermedades (MSPAS-USAC, 2006). De esta forma, en Guatemala se han realizado muchas investigaciones que estuvieron encaminadas a determinar la composición y actividad biológica de los metabolitos de diferentes plantas medicinales utilizadas en Guatemala (Cruz et al., 2011; Cruz, Menéndez, Valdez, Santizo, & Cáceres, 2017; Holzmann et al., 2011; Cáceres et al., 2012; Cruz, Cáceres, Álvarez, Apel, & Henríquez, 2012; Marroquín, Cruz, & Cáceres, 2012; Cruz, Marroquín, Gaitán & Cáceres, 2014; Cruz, Marroquín, Alvarez, Chang, & Cáceres, 2015; Holzmann, Filho, Cáceres, Martínez, Cruz, & de Souza, 2016; Marroquín & Cruz, 2016). Sin embargo, la investigación de los productos naturales en Guatemala, no ha dado el siguiente paso, que es el aislamiento y purificación de los metabolitos responsables por las actividades reportadas. Es así como se ha desaprovechado una oportunidad para la generación de valor agregado a productos naturales de la flora de Guatemala.

Una de las plantas de la biodiversidad de Guatemala, que crece también en los países vecinos y para la cual no se han reportado usos medicinales en Guatemala, es la *Stevia serrata* Cav. (Nash & Williams, 1976) cuyo aceite esencial presenta camazuleno en elevadas proporciones. El camazuleno es una sustancia de color azul intenso de alto valor económico, que se ha comprobado que presenta una alta actividad antiinflamatoria (Jakovlev, Isaac, & Flaskamp, 1983). El camazuleno es producido a partir de sesquiterpenlactonas procamazulénicas. Entre estos precursores se han identificado la matricina así como el ácido carboxílico del camazuleno, entre otros, que se encuentran presentes en la planta y son transformados en camazuleno por acción de la temperatura durante el proceso de extracción por arrastre con vapor de agua (Başer & Buchbauer, 2010; Hänsel, Keller, Rimpler, & Schneider, 1992).

Por lo anterior, en el proyecto se plantea el desarrollo de metodología para el aislamiento y purificación de camazuleno y sus precursores, por medio de cromatografía de líquidos preparativa, una técnica que permite la separación y purificación de sustancias a niveles de miligramos. La obtención de camazuleno y precursores en el rango de miligramos facilitará el diseño de productos antiinflamatorios a través de su experimentación en nuevos productos. Por otra parte, la técnica de cromatografía de líquidos puede ser escalada, para la obtención de compuestos puros a cantidades que pueden ser utilizadas en la industria.

De esta forma en el proyecto se propone por una parte el desarrollo de metodología para la obtención del camazuleno y sus precursores sesquiterpenlactónicos en el rango de miligramos, y por otra parte, la determinación de las localidades de los departamentos del occidente guatemalteco, que presentan las mejores características de contenido de dichos metabolitos, para la domesticación y cultivo de la planta. La elucidación estructural del camazuleno y de los precursores del camazuleno, entre los que podrían encontrarse nuevos compuestos, se realizó por resonancia magnética y por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, en la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil.

La química puede ser una herramienta de desarrollo en Guatemala, ya que a través de la misma puede lograrse la generación de valor agregado para recursos naturales que se encuentran en abundancia en el país y que no son comercializados o se comercializan a un precio muy bajo, por la falta de conocimiento de su potencial. El costo de oportunidad de no contar con una información más completa sobre las plantas de la biodiversidad nacional, repercute en las comunidades de los departamentos con mayor pobreza, que podrían contar con dichas plantas como fuente alternativa de ingresos económicos.

5. Planteamiento del problema

La falta de conocimiento científico sobre los productos naturales de plantas nativas de Guatemala es uno de los principales obstáculos para el aprovechamiento económico de los recursos, que no permiten que se evalúen sus aplicaciones y uso sostenible. En la flora guatemalteca existe una amplia variedad de plantas utilizadas en la medicina tradicional y que presentan un potencial económico que no está siendo aprovechado.

El caso de la *S. serrata* es diferente, ya que es una planta de la cual no se encuentra documentado su uso en la medicina tradicional guatemalteca.

En investigaciones realizadas por el grupo proponente, se ha encontrado que la planta *S. serrata* de diferentes localidades del occidente de Guatemala, produce un aceite esencial con un alto contenido de camazuleno. El camazuleno es una sustancia que presenta propiedades antiinflamatorias importantes y que presenta un valor económico elevado.

La planta crece en forma silvestre en el altiplano guatemalteco, con follaje abundante entre los meses de junio y octubre, por lo que es un recurso natural valioso que no se está aprovechando y que podría generar ingresos a los habitantes del altiplano, si la misma fuera cultivada, una vez domesticada. Al desconocerse si existen diferencias en el contenido de aceites esencial, así como del camazuleno y sus precursores, las sesquiterpenlactonas procamazulénicas, en las diferentes localidades de la planta, no se pueden tomar decisiones sobre procedencias que podrían presentar mejores características para su domesticación.

Otra dificultad para la generación de mayor valor agregado a los productos naturales en Guatemala, es que la mayoría de las investigaciones en dichos productos se reducen a la evaluación de propiedades biológicas de los extractos, sin buscarse el aislamiento y purificación de los metabolitos que presentan esas propiedades. La obtención de estos metabolitos en forma pura, sería un salto cualitativo en las investigaciones de los productos

naturales de la flora guatemalteca, ya que permitiría obtener sustancias de elevado valor para su uso en la industria.

De esta forma el problema se reduce a la falta de información sobre las procedencias de *S. serrata* que presentan mayor contenido de precursores del camazuleno, que permitan tomar decisiones para la domesticación de la planta para su cultivo y la falta de metodología para la obtención de metabolitos secundarios con propiedades antiinflamatorias, que conllevaría un paso adelante en la cadena productiva.

6. Preguntas de investigación

¿En qué concentración se encuentran las sesquiterpenlactonas procamazulénicas en *S. serrata* de diferentes localidades del occidente de Guatemala?

¿En qué concentración se encuentra el camazuleno en el aceite esencial de *S. serrata* de diferentes localidades del occidente de Guatemala?

¿Cuáles son los niveles de actividades antibacteriana y antioxidante del camazuleno y sus precursores sesquiterpenlactónicos aislados de *S. serrata*?

¿Qué condiciones de operación son necesarias para aislar y purificar las sesquiterpenlactonas y el camazuleno de la *S. serrata*, por cromatografía líquida de alta resolución preparativa?

7. Delimitación en tiempo y espacio

El presente estudio se desarrolló de mayo a noviembre de 2018, siendo el mes de mayo para montaje de metodología, los meses de junio a noviembre para colectas de campo de material vegetal y trabajo de laboratorio, mientras que los meses de septiembre y octubre para adquisición de insumos de laboratorio.

Los departamentos donde se realizaron las colectas del material vegetal de la planta de estudio fueron San Marcos, Quiché, Sololá, Totonicapán y Quetzaltenango. La parte de laboratorio se realizó en la Unidad de Análisis Instrumental de la Escuela de Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala (Usac) y en el Instituto de Pesquisas de Produtos Naturales de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil.

8. Marco teórico

8.1 Las plantas del género *Stevia*

8.1.1 Distribución

El género *Stevia* pertenece a la familia Asteraceae dentro de la tribu Eupatorieae (Kinghorn, 2002). Es un género del Nuevo Mundo distribuido desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y las tierras altas de Brasil, pasando por México, los países centroamericanos y los Andes sudamericanos. Los registros indican que el género no está representado en las Antillas ni la Amazonia (King & Robinson, 1987; Robinson & King, 1977).

8.1.2 Hábitat

Los miembros del género *Stevia* se encuentran principalmente a altitudes entre los 500 a 3,500 metros sobre el nivel del mar. Aunque generalmente crecen en terrenos montañosos semisecos, sus hábitats van desde praderas, bosques frondosos, laderas boscosas de montaña, bosques de coníferas, hasta vegetación subalpina (Kinghorn, 2002).

8.1.3 Descripción botánica y hábito

Son hierbas o arbustos anuales o perennes, en su mayoría erectos, con hojas simples, opuestas, raramente alternas, la mayoría pecioladas pero exestipuladas, penninervadas o reticuladamente nervadas. Las inflorescencias son capítulos arreglados en grupos corimbosos, paniculados o tirseiformes en las puntas de las ramas o el tallo (Pruski & Robinson, 2015).

8.1.4 Etnobotánica e importancia comercial

De las aproximadamente 220-230 especies de *Stevia*, únicamente alrededor de 34 (15%) tienen algún tipo de registro etnobotánico que relacionan usos con nombres comunes de las especies. De estas 34 especies, únicamente la especie sudamericana *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, presenta registros de uso sobresalientes debido a que sus hojas dulces son utilizadas por impartir dulzura a bebidas y alimentos. Debido a ello, *S. rebaudiana* posee una gran importancia económica a nivel internacional, dada su intensiva comercialización por su uso como edulcorante natural de bajo contenido calórico (Kinghorn, 2002).

8.1.5 Composición química

La información fitoquímica del género está disponible a la fecha para únicamente 58 especies, mereciendo particular atención miembros mexicanos y argentinos, principalmente las especies *S. salicifolia* y *S. satureiaefolia* (Kinghorn, 2002).

Los sesquiterpenoides son, con mucho, los constituyentes mayoritarios y característicos de las partes aéreas y raíces del género *Stevia*. La abrumadora mayoría de estos compuestos pertenecen a los grupos guaiano, longipineno y germacreno (Kinghorn, 2002).

8.2 Las plantas del género *Stevia* de Guatemala

De las 220-230 especies reconocidas del género (King & Robinson, 1987), 18 están descritas para la República de Guatemala (Nash & Williams, 1976). De estas 18 especies, 2 de ellas (*S. polycephala* y *S. serrata*) se han reportado como plantas de uso medicinal y forestal en encuestas etnobotánicas realizadas en localidades del altiplano guatemalteco.

En la aldea Xicanxabox, Totonicapán, la señora Josefina Puac refirió que las partes aéreas del “quebuj” (*S. polycephala*) eran utilizadas junto con otras plantas medicinales en los baños de temazcal para reponer las fuerzas de las mujeres después del parto (J. Puac, comunicación personal, 12 de junio de 2008). Por su parte, el señor Jaime Batz, de la aldea La Soledad, Acatenango, refirió que la decocción de las partes aéreas del “quebuj” era utilizado en lienzos para el tratamiento de lesiones óseas y musculares (J. Batz, comunicación personal, 08 de marzo de 2014).

El Ing. Agr. Vicente Martínez relató el uso de *S. polycephala* como planta nodriza de plántulas de pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) en distintas comunidades del altiplano guatemalteco (V. Martínez, comunicación personal, 10 de febrero de 2016).

En las cercanías de Santa Cruz del Quiché, el señor José Ajanel nos refirió que las raíces y partes aéreas del “ujolom ocox” (*S. serrata*) eran preparadas en decocción en tiempos pasados para aliviar el dolor de estómago. Sin embargo, con el fácil acceso a la medicina química, las personas dejaron de utilizar la planta y las nuevas generaciones desconocen el uso medicinal que esta tenía (J. Ajanel, comunicación personal, 11 de diciembre de 2015).

8.3 La especie *Stevia serrata* Cav.

8.3.1 Distribución

Se distribuye desde el sur de Arizona, Nuevo México y Texas hasta el norte de Oaxaca, de Chiapas hasta Honduras, Colombia, Venezuela y Ecuador. En Guatemala se encuentra en los departamentos de Chimaltenango, Guatemala, Huehuetenango, Quetzaltenango, El Quiché, Sacatepéquez y Sololá (Nash & Williams, 1976; Pruski & Robinson, 2015).

8.3.2 Hábitat

La especie crece a lo largo de bordes de caminos y en pastos de diversos hábitats de matorrales de *Yucca-Opuntia* y bosques de pino-encino, generalmente entre 900 y 2,800 m. Prefiere lugares soleados, pedregosos y bien drenados, pero también crecen en pastos húmedos y otras áreas planas (Nash & Williams, 1976; Pruski & Robinson, 2015).

8.3.3 Descripción botánica y hábito

Es una hierba perenne y erecta de entre 0.6-1 m de alto, con tallos puberulentos a densamente pilosos. Hojas alternas, dispersas o a menudo amontonadas, sésiles o subsésiles, con grupos axilares de hojas pequeñas, láminas de 2.5-6.5 cm de longitud y 0.2-1.5 cm de ancho, con márgenes subenteros y usualmente serrados hacia la punta, ápice redondeado a agudo. La inflorescencia densamente corimbiforme, pedúnculos de 0-2 mm, sésiles glandulares, pubescentes. Corolas de 3-5 mm, usualmente blancas. Cipselas de 2.2-4.2 mm de longitud, 4 (raramente 5 o 0) cipselas por capítulo usualmente con 3-5 aristas, aristas de 3-5 mm. (Nash & Williams, 1976; Pruski & Robinson, 2015).

8.3.4 Usos etnomédicos

En Honduras, la “flor de octubre” se utiliza la decocción de la flor por parte de las parteras para acelerar las contracciones de las parturientas durante el parto (Ticktin & Dalle, 2005). En México, el “tlalchichinole” era utilizado en decocción de las partes aéreas para el lavado de espinillas infectadas (Kinghorn, 2002). También en México el “chile burro” es utilizado como medicinal para tratar los malestares intestinales (Vibrans, Alipi & Pichardo, 2009).

En otra localidad de México, la raíz cruda del “kasnir bhai” se muele y se aplica localmente para calmar el dolor de muelas (Calleros, et al., 2009). En Guatemala, las partes aéreas y raíces del “ujolom ocox” eran preparadas en decocción en tiempos pasados para aliviar el dolor de estómago (J. Ajanel, comunicación personal, 11 de diciembre de 2015).

8.3.5 Composición química

Se logró el aislamiento e identificación del metil-ripariocromeno A del extracto metanólico de las hojas secas de *S. serrata* cosechadas en la Estación Experimental de Plantas Medicinales en Kasukabe, Japón (Kohda, Yamazaki, & Tanaka, 1976). Se aislaron e identificaron dos nuevas sesquiterpenlactonas procamazulénicas del extracto diclorometánico de las hojas secas de *S. serrata* colectada en el Estado de Morelos, México: Steviserrolido A y Steviserrolido B (Calderón, Quijano, Gómez & Ríos, 1989).

La destilación por arrastre de vapor de 178 g de flores de *S. serrata* colectadas en el estado de Michoacán, México, proveyeron 700 mg de aceite esencial azul el cual rindió 320 mg de camazuleno utilizando cromatografía de sílica gel (Román, Mora, & Hernández, 1990). Se aislaron y elucidaron 5 nuevos longipinenos de las raíces de *S. serrata* colectadas en el estado de Michoacán, México: 7β , 9α -Diangeloyloxy- 8α -hydroxy-longipinan-1-one; 8β , 9α -Diangeloyloxy- 9α -hydroxy-longipinan-1-one; $7\beta,9\alpha$ -Diangeloyloxy- 8α -acetyloxy-longipinan-1-one; $7\beta,9\alpha$ -Diangeloyloxy- 8α -acetyloxy-longipin-2-en-1-one; 7β -Angeloyloxy- 8α -isobutyryloxy-longipin-2-en-1-one (Sánchez-Arreola, Cerda-García-Rojas, Joseph-Nathan, Román, & Hernández, 1995). Se determinó la presencia del enantiómero R del camazuleno ácido carboxílico de la *S. serrata* de Centroamérica (Franke & Schilcher, 2005). Se determinó el rendimiento (0.2%) y la composición del aceite esencial de las partes aéreas de *S. serrata* del departamento de Sololá, Guatemala, mostrando el camazuleno (60.1%) como compuesto mayoritario (Simas, et al., 2017).

8.3.6 Ensayos farmacológicos

La administración oral del aceite esencial de las partes aéreas de *S. serrata* del occidente guatemalteco mostró marcada actividad antinociceptiva en ratones sometidos a la prueba de la formalina (Simas, et al., 2017).

8.4 El sesquiterpeno camazuleno

El camazuleno es un sesquiterpeno bicíclico azul presente en el aceite esencial obtenido de la destilación al vapor de las cabezas florales de la manzanilla alemana *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert y otras especies de la familia de las asteráceas. No es un producto natural, sino un artefacto proveniente de la degradación de la sesquiterpenlactona matricina en el proceso de destilación (Başer & Buchbauer, 2010; Hänsel, Keller, Rimpler, & Schneider, 1992).

8.4.1 Propiedades farmacológicas del camazuleno

La actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* del camazuleno se demostró en una investigación que evaluó los constituyentes individuales de los capítulos florales de la *Matricaria recutita* L. El estudio reveló que el camazuleno y el (-)- α -bisabolol inhibieron la 5-lipoxigenasa (IC₅₀: 13 and 40 μ M, respectivamente) y únicamente el camazuleno mostró actividad antioxidante (IC₅₀: 2 μ M) (Ammon, Sabieraj, & Kaul, 1996).

Se demostró actividad antiinflamatoria *in vivo* del camazuleno en un estudio en que la administración oral del camazuleno mostró una ED₅₀ de 4.48 mmol/kg en la prueba del edema inducido por carragenina en pata de rata (Jakovlev, Isaac, & Flaskamp, 1983).

Un estudio clínico demostró efecto positivo del extracto de flores de *M. recutita* en la cicatrización de heridas en pacientes sometidos a dermoabrasión para eliminación de tatuajes. El extracto fue estandarizado en 50 mg de α -bisabolol y 3 mg de camazuleno por 100 g (Glowania, Raulin, & Swoboda, 1987).

8.4.2 Compuestos precursores del camazuleno

La hipótesis más aceptada para la producción de camazuleno es que la matricina, en el proceso de destilación, puede ser convertida a través de desacetilación, deshidratación e hidrólisis a camazuleno ácido carboxílico. Luego, el camazuleno ácido carboxílico es descarboxilado para producir camazuleno (Flemming, et al., 2015; Ramadan, et al., 2006).

8.4.3 Propiedades farmacológicas de la matricina

Se demostró fuerte actividad antiinflamatoria de la matricina en un estudio que utilizó cultivo de células humanas endoteliales microvasculares (Flemming, et al., 2015). La matricina mostró actividad antiinflamatoria igualmente activa al (-)- α -bisabol, 2 y 3 horas después de la administración oral a ratas en la prueba del edema en pata inducido por carragenina (Jakovlev, et al., 1983).

8.4.4 Propiedades farmacológicas del camazuleno ácido carboxílico

Se determinó una sorprendente similitud constitucional del camazuleno ácido carboxílico con los profenos (por ejemplo, ibuprofeno, naproxeno), así como también que posee una configuración S, la configuración eutomérica de los profenos. Se demostró que es un potente agente antiinflamatorio y el segundo ejemplo de moléculas selectivas inhibitoras de la ciclooxigenasa-2 derivadas de plantas medicinales (Başer & Buchbauer, 2010).

9. Estado del arte

Existen pocas investigaciones publicadas sobre la especie *S. serrata* y las mismas han sido realizadas principalmente por investigadores mexicanos. Dichas investigaciones revelan la presencia de camazuleno y de compuestos procamazulénicos en dicha especie colectada en estados mexicanos (Calderón, Quijano, Gómez & Ríos, 1989; Román, Mora, & Hernández, 1990). El único estudio publicado sobre plantas de la especie del altiplano guatemalteco es la que fue realizada por investigadores guatemaltecos conjuntamente con investigadores brasileños. En dicho estudio se demostró una marcada actividad antinociceptiva del aceite esencial de partes aéreas de *S. serrata* en ratones en la prueba de la formalina (Simas et al., 2017).

10. Objetivo general

Evaluar las diferencias cuantitativas en la obtención en forma pura de las sesquiterpenlactonas procamazulénicas y el camazuleno en *S. serrata* de diferentes localidades del occidente de Guatemala, como fuente potencial de antiinflamatorios naturales, utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución preparativa.

11. Objetivos específicos

Determinar las concentraciones de las sesquiterpenlactonas procamazulénicas purificadas a partir de extractos etanólicos de *S. serrata* de diferentes localidades del occidente de Guatemala.

Determinar la concentración del camazuleno obtenido y purificado a partir del aceite esencial de *S. serrata* de diferentes localidades del occidente de Guatemala.

Determinar la actividad biológica y antioxidante de las sesquiterpenlactonas procamazulénicas y el camazuleno aislados de *S. serrata*.

Desarrollar un método para el aislamiento y purificación de las sesquiterpenlactonas procamazulénicas y el camazuleno de *S. serrata*, por cromatografía de líquidos de alta resolución preparativa.

12. Hipótesis

La planta *S. serrata* de diferentes localidades del occidente de Guatemala, presenta sesquiterpenlactonas procamazulénicas en composición variable, en cantidades que permiten su aislamiento y purificación en el rango de miligramos, por cromatografía de líquidos de alta resolución preparativa.

13. Materiales y métodos

13.1 Tipo de investigación

13.1.1 Enfoque cuantitativo

13.1.2 Indicar el alcance de la investigación: descriptiva y explicativa.

13.2 Técnicas e instrumentos:

13.2.1 Método:

Colecta:

Las muestras de *S. serrata* fueron colectadas en nueve localidades en los departamentos de Quiché (dos localidades), Sololá (una localidad), Quetzaltenango (tres localidades) y Totonicapán (dos localidades) y San Marcos (una localidad).

Cuatro localidades estaban ya identificadas en los departamentos de Quiché, Sololá y Quetzaltenango por el equipo de investigación. Las otras cinco localidades ubicadas en los departamentos de San Marcos, Totonicapán y Quiché fueron hallazgos del presente trabajo de investigación. Las colectas se realizarán en los meses de junio a septiembre de 2018. Se colectaron entre 2 y 3 kg frescos de partes aéreas de individuos de *S. serrata*.

Preparación de la muestra:

Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente en secador solar, luego de lo cual fueron molidas y homogenizadas para su extracción.

Determinación de humedad del material fresco

La humedad de material fresco se determinó por triplicado para individuos de *S. serrata* de cada localidad ubicada. Se colocó 1g fresco de las plantas en tres crisoles y fue tomado el peso inicial. Luego fueron secados a 100°C en horno por 20 minutos y se tomó el peso final para determinar el rendimiento de humedad.

Extracción de aceite esencial:

El aceite esencial fue obtenido por medio de hidrodestilación utilizando un aparato tipo Clevenger, a partir de 50 g de material seco, colectándose el aceite en pentano luego de 3 horas de extracción. Posteriormente se evaporó el pentano en rotavapor y se determinó el rendimiento de extracción pesando el aceite en balanza analítica, luego de evaporar el pentano. Se realizaron tres extracciones en las localidades en que el volumen colectado fue alto.

Determinación de la composición del aceite esencial:

Los aceites esenciales de partes áreas de *S. serrata* fueron analizados en el Instituto de Productos Naturales de la Universidad de Río de Janeiro, Brasil donde se hizo uso de un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas, Shimadzu GCMS-QP5000 utilizando las siguientes condiciones: columna de fase estacionaria HP5 (5% fenil-metil-silicona) de 30 m x 0.2 mm y 0.25 μ m de espesor de fase. El programa de temperatura de 60 a 240°C durante 7 minutos. Inyector a 260°C e interfase a 200°C. La inyección fue en modo *splitless*. Condiciones del EM: ionización electrónica a 70eV, barradura de 40 a 700 Daltons. La identificación de los componentes volátiles fue hecha utilizándose sus espectros de masas y por comparación de los índices de retención de las sustancias con índices de retención en la literatura y con los obtenidos del análisis de patrones de referencia (Pérez, Mérida & Farfán, 2012).

Obtención de extractos etanólicos:

Se tomó una porción de 50 g de material vegetal seco de *S. serrata* de cada localidad la cual se sometió a maceración por 48 horas con 500 mL de etanol al 70% dentro de frascos ambar. Los macerados fueron posteriormente filtrados y luego evaporados en rotavapor. Se pesaron los extractos obtenidos para calcular rendimiento y luego se trasvasaron a viales para centrífuga de 1 mL debidamente rotulados.

Obtención de extracto diclorometánico y fracciones orgánicas:

Se utilizaron 50 g de material vegetal seco de *S. serrata* de dos localidades y se sometieron a maceración por 48 horas con 500 mL de diclorometano en frascos ambar. Los macerados fueron posteriormente filtrados y luego evaporados en rotavapor. Se pesaron los extractos diclorometánicos obtenidos para calcular rendimiento y luego se trasvasaron a viales para centrífuga de 1 mL debidamente rotulados.

Se utilizaron 50 g de material vegetal seco de *S. serrata* de dos localidades y se sometieron a maceración por 48 horas con 500 mL de hexano en frascos ambar. Dicho macerado fue evaporado por rotavapor para obtener fracción hexánica. El material vegetal extraído con hexano fue posteriormente secado y sometido a maceración por 48 horas con 500 mL con diclorometano. Este macerado fue evaporado por rotavapor para obtener fracción diclorometánica. El material vegetal extraído con diclorometano fue secado y sometido a maceración por 48 horas con etanol al 70%.

Este macerado fue evaporado por rotavapor para obtener fracción etanólica. Las tres fracciones obtenidas fueron posteriormente pesadas para obtener rendimiento y trasvasadas a viales para centrífuga de 1 mL debidamente rotuladas.

Determinación de la actividad antioxidante

Se utilizó la metodología de DPPH para la determinación de la actividad antioxidante de compuestos antioxidantes sintéticos así como la actividad de extractos crudos y fracciones orgánicas de *S. serrata*.

13.3 Recolección de datos:

El universo estuvo constituido por las localidades en que se encuentran individuos de *S. serrata* en los departamentos del occidente de Guatemala. Se colectó material vegetal en nueve localidades. Cuatro localidades se han identificado anteriormente en los departamentos de Quiché, Sololá y Quetzaltenango. Las otras cinco localidades se ubicaron en los viajes de comisión oficial del proyecto en los departamentos de San Marcos, Totonicapán y Quetzaltenango entre los meses de junio a septiembre de 2018.

13.3.1 Para datos cuantitativos:

Para la colecta de muestras, se colectó material vegetal en cada localidad hasta completar de 2 a 3 kg de muestra fresca. El muestreo se realizó por conveniencia, al realizarse en localidades ya identificadas y en localidades en las que se encontró la planta en abundancia y se dispuso de mayor accesibilidad para la colecta.

14. Vinculación, difusión y divulgación

Se contó con el apoyo del Instituto de Investigaciones de Productos Naturales de la Universidad Federal de Río de Janeiro, para la determinación de la composición del aceite esencial de *S. serrata* de diferentes localidades del occidente de Guatemala por la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

15. Resultados

15.1 Colecta de individuos

Se detalla la información de colecta de las partes aéreas de individuos de *S. serrata* de nueve localidades en cinco departamentos del occidente de Guatemala (Tabla 1). Los individuos de las localidades QTZ-Q, T-SMC y T-SFA fueron colectados en dos épocas diferentes del año debido a que fueron localidades con alto número de individuos en cada una.

Todos los individuos se encontraron en estado silvestre en potreros de comunidades rurales o a orillas de carreteras en sitios abiertos y soleados.

Tabla 1

Datos de campo de colecta de individuos de Stevia serrata Cav. de localidades del occidente de Guatemala

Lugar de colecta	Código localidad	Coordenadas geográficas	Altitud (msnm)	Fecha de colecta	Estado fenológico
Quetzaltenango, Ciudad de Quetzaltenango, Aeropuerto Internacional Los Altos	QTZ-Q1	N 14° 51' 45.2" O 091° 30' 20.0"	2,371	13/06/2018	Botón floral
Totonicapán, carretera entre Santa María Chiquimula y San Francisco El Alto	T-SMC1	N 14° 58' 30.4" O 091° 25' 59.2"	2,830	13/06/2018	Vegetativo
Totonicapán, San Francisco El Alto, Aldea Tacajalbé	T-SFA1	N 14° 57' 50.8" O 091° 28' 05.2"	2,523	13/06/2018	Vegetativo
Quiché, carretera entre Chichicastenango y Santa Cruz del Quiché	QCH-CH	N 14° 59' 03.7" O 091° 07' 15.0"	2,013	10/07/2018	Botón floral
Quetzaltenango, Salcajá, cerca de paso a desnivel	QTZ-S1	N 14° 51' 50.2" O 091° 28' 19.9"	2,352	11/07/2018	Floración
San Marcos, San Miguel Ixtahuacán, aldea San José Ixcaniché	SM-SMI	N 15° 14' 21.7" O 091° 41' 31.4"	2,093	21/08/2018	Floración
Quetzaltenango, Salcajá, aldea Casa Blanca	QTZ-S2	N 14° 53' 44.1" O 091° 27' 33.7"	2,356	24/08/2018	Floración
Quetzaltenango, Ciudad de Quetzaltenango, Aeropuerto Internacional Los Altos	QTZ-Q2	N 14° 51' 45.2" O 091° 30' 20.0"	2,371	24/08/2018	Floración

Lugar de colecta	Código localidad	Coordenadas geográficas	Altitud (msnm)	Fecha de colecta	Estado fenológico
Totonicapán, carretera entre Santa María Chiquimula y San Francisco El Alto	T-SMC2	N 14° 58' 30.4" O 091° 25' 59.2"	2,830	10/09/2018	Floración
Quiché, carretera entre Santa Cruz del Quiché y Chiché	QCH-SCQ	N 15° 01' 42.5" O 091° 06' 04.1"	2,075	10/09/2018	Fructificación y floración
Sololá, carretera entre Santa Lucía Utatlán y San José Chacayá	S-SLU	N 14° 46' 40.4" O 091° 14' 41.5"	2,430	11/09/2018	Floración
Totonicapán, San Francisco El Alto, Aldea Tacajalbé	T-SFA2	N 14° 57' 50.8" O 091° 28' 05.2"	2,523	11/09/2018	Floración

Fuente: Digi 1.06-2018

15.2 Rendimientos de humedad y de aceite esencial

Se detallan los rendimientos de humedad de material vegetal fresco y el rendimiento de aceite esencial obtenido a partir de material vegetal seco de partes aéreas de individuos de *S. serrata* colectados en diferentes localidades del occidente de Guatemala (Tabla 2). La localidad QCH-SCQ presentó el menor valor con un rendimiento promedio de 0.08%, mientras que la localidad QCH-CH presentó el mayor valor con un rendimiento promedio de 0.34%.

Tabla 2

Humedades y rendimientos de aceite esencial de individuos de Stevia serrata Cav. de localidades del occidente de Guatemala

Localidad	Humedad Material fresco (%)	Peso seco material vegetal (g)	Peso del aceite esencial (g)	Rendimiento aceite esencial (%)	X ± DE rendimientos de aceite esencial	Peso total del aceite esencial (g)
QTZ-Q1	73.46	50.00	0.10	0.20	0.26±0.07	0.39
	74.12	50.00	0.12	0.24		
	76.81	50.00	0.17	0.33		
T-SMC1	79.92	50.00	0.09	0.18	0.18±0.10	0.09
	82.18		
	83.28		
T-SFA1	80.48	50.00	0.09	0.18	0.18±0.10	0.09
	82.38		
	79.38		
QCH-CH	73.87	50.00	0.15	0.30	0.34±0.04	0.52
	72.48	50.00	0.18	0.36		
	74.24	50.00	0.19	0.37		

Localidad	Humedad material fresco (%)	Peso seco material vegetal (g)	Peso del aceite esencial (g)	Rendimiento aceite esencial (%)	X ± DE rendimientos de aceite esencial	Peso total del aceite esencial (g)
QTZ-S1	69.24	50.00	0.10	0.20	0.20±0.11	0.10
	72.23		
	68.34		
QTZ-S2	69.34	50.00	0.06	0.12	0.12±0.07	0.06
	72.48		
	70.14		
T-SMC2	68.79	50.00	0.08	0.16	0.15±0.09	0.14
	73.26	50.00	0.06	0.13		
	71.47		
QCH-SCQ	67.46	50.00	0.04	0.08	0.08±0.05	0.04
	66.79		
	64.68		
S-SLU	69.40	50.00	0.06	0.12	0.12±0.07	0.06
	72.15		
	71.37		
T-SFA2	74.89	50.00	0.10	0.20	0.18±0.10	0.18
	73.89	50.00	0.08	0.15		
	76.97		

Fuente: Digi 1.06-2018

15.3 Composición del aceite esencial

Se presentan los tiempos de retención y las concentraciones de los constituyentes del aceite esencial extraído de las partes aéreas de individuos de *S. serrata* de tres localidades del occidente de Guatemala (Tabla 3, Apéndice I). Aunque en concentraciones variables entre las muestras, el sesquiterpeno camazuleno es el compuesto mayoritario (>30%) en las tres localidades de *S. serrata* analizadas. La presencia de camazuleno en la composición explica el color azul intenso del aceite esencial extraído en individuos de la especie, independientemente de la localidad de colecta.

Tabla 3

Composición del aceite esencial de las partes aéreas de individuos de Stevia serrata Cav. de localidades del occidente de Guatemala

TR	Compuesto	SM-SMI (%)	QCH-CH (%)	T-SMC1 (%)
5.53	Alfa-pineno	0.63	--	--
21.94	Alfa-longipineno	--	0.35	--
23.43	Alfa-borboneno	0.39	--	--
24.98	Cariofileno	6.59	2.54	3.99
25.79	(-)-alloaromadendreno	--	0.21	--

TR	Compuesto	SM-SMI (%)	QCH-CH (%)	T-SMC1 (%)
26.52	Humuleno	1.19	0.58	0.55
27.37	Copaeno	0.72	1.09	0.41
27.62	Germacreno D	4.42	8.72	15.26
27.89	Delta-selineno	1.73	--	--
27.95	Alfa-selineno	1.74	0.55	0.18
28.23	Gama-elemeneno	1.60	0.77	2.34
28.37	Alfa-muuroleno	0.52	--	--
28.79	N.I.	0.32	0.25	--
28.98	Alfa-muuroleno	0.62	0.71	0.26
29.19	Copaeno	1.79	2.36	0.99
29.95	Alfa-muuroleno	--	0.24	--
30.53	Oxido de cariofileno	0.49	0.21	--
31.01	Trans-nerolidol	7.09	4.10	3.86
31.21	Óxido de aromadendreno	0.42	0.79	0.25
31.46	(+/-)-pulegona	0.44	--	--
31.59	Isoaromadendreno	7.88	6.04	2.34
31.79	Oxido de cariofileno	11.82	9.01	3.21
31.95	Isohiobunona	--	0.26	--
32.40	5-azulenometanol	0.55	--	--
32.90	Isogeraniol	0.50	0.40	0.22
33.17	Óxido de aromadendreno	--	0.26	--
33.41	Gamma-eudesmol	0.99	--	--
33.81	(-)-espatulenol	0.33	--	--
34.19	Tau-cadinol	0.60	0.51	0.16
34.29	Alfa-cadinol	--	0.29	0.28
34.37	Espatulenol	--	0.23	--
34.64	Cubenol	0.41	--	--
34.71	Alfa-cadinol	1.09	1.27	0.96
34.85	N.I.	--	0.21	0.44
35.30	Oxido de cariofileno	0.93	0.61	--
35.84	Óxido de aromadendreno	--	0.26	0.18
36.07	(-)-espatulenol	--	0.43	--
36.18	6-epi-shiobunol	0.70	0.69	0.29
37.57	Camazuleno	42.94	56.06	62.47
39.27	N.I.	0.56	--	0.62

Fuente: Digi 1.06-2018 TR: Tiempo de retención

15.4 Pesos y rendimientos de extractos etanólicos

Se presentan los pesos y rendimientos de extractos obtenidos con etanol 70% de las partes aéreas de individuos de *Stevia serrata* Cav. de diferentes localidades del occidente de Guatemala obtenidos con etanol al 70% (Tabla 4). La localidad QCH-SCQ presentó el menor valor con un rendimiento de 14.02%, mientras que la localidad QCH-CH presentó el mayor valor con un rendimiento de 23.72%.

Tabla 4

Pesos y rendimientos de extractos etanólicos de individuos de Stevia serrata Cav. de localidades del occidente de Guatemala

Localidad	Peso seco material vegetal (g)	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
QTZ-Q1	50.00	9.66	19.32
QCH-CH	50.00	11.86	23.72
T-SMC2	50.00	7.63	15.26
QCH-SCQ	50.00	7.01	14.02
S-SLU	50.00	8.11	16.22
T-SFA2	50.00	8.33	16.68

Fuente: Digi 1.06-2018

15.5 Pesos y rendimientos de extractos diclorometánicos

Se presentan los pesos y rendimientos de los extractos obtenidos con diclorometano de las partes aéreas de individuos de *S. serrata* de diferentes localidades del occidente de Guatemala (Tabla 5). Los valores de rendimientos obtenidos fueron considerablemente menores que los valores de rendimientos obtenidos para los extractos etanólicos.

Tabla 5

Pesos y rendimientos de extractos diclorometánicos de individuos de Stevia serrata Cav. de localidades del occidente de Guatemala

Localidad	Peso seco material vegetal (g)	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
QTZ-Q1	50.00	2.09	4.18
T-SFA2	50.00	1.72	3.44

Fuente: Digi 1.06-2018

15.6 Pesos y rendimientos de fracciones orgánicas

Se presentan los pesos y rendimientos de las fracciones hexánica, diclorometánica y etanólica de las partes aéreas de individuos de *S. serrata* de dos localidades del occidente de Guatemala (Tabla 6). Los valores de rendimiento de las fracciones hexánica y diclorometánica fueron considerablemente menores que los valores de rendimiento de las fracciones etanólicas.

Tabla 6

Pesos y rendimientos de fracciones orgánicas de individuos de Stevia serrata Cav. de localidades del occidente de Guatemala

Localidad	Peso seco material vegetal (g)	Peso fracción hexánica (g)	Rendimiento (%)	Peso fracción diclorometánica (g)	Rendimiento (%)	Peso fracción etanólica (g)	Rendimiento (%)
QTZ-Q1	50.00	1.14	2.28	1.41	2.82	7.26	14.52
T-SFA2	50.00	1.03	2.06	1.18	2.36	6.78	13.56

Fuente: Digi 1.06-2018

15.7 Actividad antioxidante de extractos crudos

Se presenta la actividad antioxidante de compuestos antioxidantes sintéticos así como la actividad antioxidante de extractos crudos de las partes aéreas de individuos de *S. serrata* de diferentes localidades del occidente de Guatemala (Tabla 7). Aunque la localidad QCH-SCQ presentó la mejor actividad antioxidante, fue realmente muy débil cuando se compara con la actividad antioxidante del butilhidroxi tolueno.

Tabla 7

Valores de la actividad antioxidante expresados en IC50 μ g de compuestos antioxidantes sintéticos y de extractos de individuos de Stevia serrata Cav. de localidades del occidente de Guatemala

Butil hidroxi anisol	Butil hidroxi tolueno	T-SFA2 Extracto etanólico	T-SMC2 Extracto etanólico	QCH-SCQ Extracto etanólico	QTZ-Q1 Fracción diclorometánica	QTZ-Q1 Fracción hexánica	QTZ-Q1 Fracción etanólica
47.0	136.6	251.8	262.50	209.00	1658.4	2934.8	314.3

Fuente: Digi 1.06-2018

15.8 Actividad antioxidante de fracciones orgánicas

Se presenta la actividad antioxidante de las fracciones orgánicas obtenidas por cromatografía en columna de la fracción diclorometánica de *S. serrata* de la localidad QTZ-Q1 (Tabla 8). Únicamente la fracción CC06, hexano-acetato de etilo 50-50 evidenció actividad antioxidante ligeramente superior a la actividad del butilhidroxi tolueno.

Tabla 8

Valores de la actividad antioxidante de las fracciones orgánicas obtenidas por cromatografía en columna de la fracción diclorometánica de Stevia serrata Cav. localidad QTZ-Q1

Fracción	IC50 µg
CC01, hexano-acetato de etilo 100-0	2624.9
CC02, hexano-acetato de etilo 90-10	4780.5
CC03, hexano-acetato de etilo 80-20	4298.0
CC04, hexano-acetato de etilo 70-30	2960.3
CC05, hexano-acetato de etilo 60-40	688.9
CC06, hexano-acetato de etilo 50-50	125.2
CC07, hexano-acetato de etilo 40-60 y CC08, hexano-acetato de etilo 30-70	1029.5
CC09, hexano-acetato de etilo 20-80, CC11, CC10, hexano-acetato de etilo 10-90, hexano-acetato de etilo 0-100	2278.2

Fuente: Digi 1.06-2018

16. Discusión de resultados

Se expone que los objetivos tal como se plantearon originalmente en este estudio no pudieron alcanzarse debido a que no fue posible la adquisición del cromatógrafo de líquidos de alta resolución preparativo por parte de la Dirección General de Investigación debido al recorte presupuestario que vio afectada a la Universidad de San Carlos de Guatemala en curso del año 2018. Por la misma razón tampoco fue adquirido el boleto aéreo para el Dr. Juan Francisco Pérez Sabino, a través del cual realizaría visita al Instituto de Investigación de Productos Naturales en la ciudad de Río de Janeiro, Brasil para análisis de compuestos aislados y purificados de extractos de *S. serrata* del occidente de Guatemala. Por lo anterior antes expuesto, los resultados se limitaron únicamente a lo que fue posible realizar con los insumos que fueron provistos por Digi en el curso de los meses de junio a noviembre de 2018.

16.1 Rendimiento y composición del aceite esencial

Los rendimientos de aceite esencial de las partes aéreas de *Stevia serrata* Cav. presentaron valores menos al 0.50%, los cuales no se consideran promisorios según la propuesta de Aragão, 1981. Sin embargo, al compararse la fuente de aceite esencial con contenido de camazuleno en *Matricaria recutita* L. (Asteraceae), el cual es obtenido únicamente de las flores de esta especie (Franke & Schilcher, 2005), *S. serrata* se muestra como una especie promisoriosa debido a que toda la parte aérea (hojas, tallos y flores) producen aceite esencial con contenido de camazuleno.

El valor mayor se encontró para individuos de *S. serrata* de la localidad QCH-CH en el departamento de Quiché la cual fue colectada en estado fenológico de inicio de floración, mientras que el menor valor se obtuvo para la localidad QCH-SCQ la cual fue colectada en estado fenológico de fructificación.

Una probable respuesta a esta notable diferencia en rendimientos es que el estado fenológico afecta la producción de aceite esencial, produciéndose más cantidad en estado fenológico de inicio de floración y a su vez una menos producción en estado fenológico de fructificación. Otra probable respuesta podrían ser factores edáficos en la producción de metabolitos secundarios en general, pero solamente con la realización de futuras investigaciones podría determinarse la relación entre dichos factores y la producción de aceite esencial y otros metabolitos.

Todos los aceites esenciales de partes aéreas de *S. serrata* fueron de un color azul intenso, independientemente de la localidad donde fueron colectados los individuos de la especie. El análisis de la composición del aceite esencial muestra al camazuleno como el compuesto mayoritario, ya que dicho compuesto se evidenció en una concentración mayor al 30% (Aragão, 1981). Es notable también que la composición de estos aceites está en congruencia con la composición obtenida por Simas *et al.*, 2017 obtenida de una localidad de *S. serrata* del departamento de Sololá.

16.2 Rendimiento de extractos

Se evidencia un valor superior de la localidad QCH-CH sobre los extractos etanólicos de otras localidades de *S. serrata*, de la misma manera que lo hizo el rendimiento de aceite esencial de esta misma localidad. Muy probablemente se deba al favorecimiento del estado fenológico de inicio de floración en que fueron colectados los individuos de dicha localidad.

16.3 Actividad antioxidante

Ninguno de los extractos crudos de las localidades estudiadas de *S. serrata* evidenció actividad antioxidante cuando se compararon con la actividad antioxidante de los compuestos sintéticos butilhidroxi anisol y butilhidroxitolueno. Es probable que *S. serrata* no presenta o presenta muy pocos compuestos del tipo flavonoides, a los que se ha evidenciado actividad antioxidante en otras especies vegetales.

17. Conclusiones

Los aceites esenciales de las partes aéreas de diferentes localidades de *Stevia serrata* Cav. del occidente de Guatemala presentaron rendimientos inferiores al 0.50%.

Los aceites esenciales de las partes aéreas de diferentes localidades de *Stevia serrata* Cav. del occidente de Guatemala presentaron el sesquiterpeno camazuleno en una concentración mayor al 30%.

Los extractos crudos de partes aéreas de diferentes localidades de *Stevia serrata* Cav. del occidente de Guatemala no presentaron actividad antioxidante en comparación con los compuestos sintéticos antioxidantes butilhidroxi anisol y butilhidroxitolueno.

18. Impacto esperado

Los resultados de este y otros estudios evidencian a *Stevia serrata* Cav. como una especie muy promisoría por su capacidad de producir aceite esencial rico en el sesquiterpeno camazuleno, compuesto que ha demostrado actividad antiinflamatoria en diversos estudios (Ammon, Sabieraj, & Kaul, 1996; Jakovlev, Isaac, & Flaskamp, 1983). Aunque todas las localidades analizadas evidenciaron una concentración alta de camazuleno (>30%), los individuos de la localidad QCH-CH perteneciente al departamento de Quiché, sobresale entre las demás localidades estudiadas por su mayor rendimiento de aceite esencial (0.34%) y su considerable concentración de camazuleno en la composición de su aceite esencial (56.06%), por lo que sería esta localidad la que podría seleccionarse para futuros estudios de domesticación de la especie. Además de ello, el aprovechamiento de esta especie a través de cultivos tecnificados por parte de agricultores del occidente de Guatemala, así como la extracción de su aceite esencial a escala industrial para su incorporación a productos terapéuticos y cosméticos podría ayudar a mejorar la economía y la calidad de vida de muchas comunidades de escasos recursos de esta región del país.

19. Referencias

- Ammon, H.P.T., Sabieraj, J., & Kaul, R. (1996). Kamille. Mechanismus der antiphlogistischen Wirkung von Kamillenextrakten und Inhaltsstoffen. *Deutsche Apotheker-Zeitung*, 136, 1821-1834.
- Aragão, A. (1981). Oleos essenciais de plantas do nordeste. Brasil: Edições UFC.
- Başer, K. H.C., & Buchbauer, G. (2010). *Handbook of essential oils: Science, technology and applications*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Cáceres, A., Cruz, S.M., Gaitán, I., Guerrero, K., Alvarez, L.E., Marroquín, M.N. (2012). Antioxidant activity and quantitative composition of extracts of *Piper* species from Guatemala with potential use in natural product industry. *Acta Horticulturae*, 964, 77-84.
- Calderón, J.S., Quijano, L., Gómez, F., & Ríos, T. (1989). Prochamazulene sesquiterpene lactones from *Stevia serrata*. *Phytochemistry*, 28 (12), 3526-3527.
- Calleros, N., Calleros, S., Morales, P., Morales de la Cruz, A., Caldera, T.S., Flores, M.,... Mendía, J. (2009). Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Recuperado de http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&po=tepehuan_del_sur&te=Kasnir_bhai&id=6094&clave_region=1
- Cruz, S.M., Cáceres, A., Álvarez, L.E., Apel, M.A., Henriques, A.T. (2012). Chemical diversity of essential oils of 15 *Piper* species from Guatemala. *Acta Horticulturae*, 964, 39-46.
- Cruz, S.M., Cáceres, A., Alvarez, L., Morales, J., Apel, M.A., Henriquez, A.T.,...Gupta, M.P. (2011). Chemical composition of essential oils of *Piper jacquemontianum* and *Piper variable* from Guatemala and bioactivity of the dichloromethane and metanol extracts. *Brazilian Journal Pharmacognosy*, 21(4), 587-593.

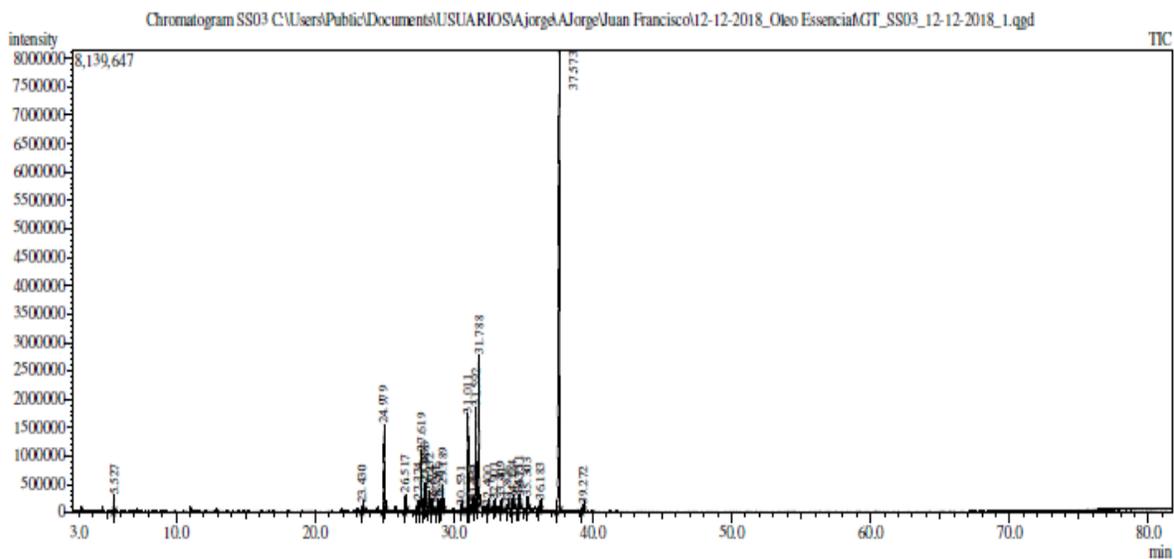
- Cruz, S.M., Marroquín, N., Alvarez, L.E., Chang, D.E., Cáceres, A. (2015). Evaluation of mangrove (*Rhizophora mangle* L.) products os coloring, antimicrobial and antioxidant agents. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 2(12), 1-7.
- Cruz, S.M., Marroquín, M.N. Gaitán, I.C., Cáceres, A. (2014). Antimicrobial activity of essential oils and ethanolic extracts of three species of laurel (*Litsea* spp.) from Guatemala. *Acta Horticulturae*, 1030, 23-29.
- Cruz, S.M., Menéndez, M.C., Valdez, A.C., Santizo, A., & Cáceres, A. (2017). Diseño de una formulación a partir de extractos de kalahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) para un posible uso como agente antisolar. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 4(2), 285-290.
- Flemming, M., Kraus, B., Rasclé, A., Jurgenliemk, G., Fuchs, S., Furst, R., Heilmann, J. (2015). Revisited anti-inflammatory activity of matricine in vitro: Comparison with chamazulene. *Fitoterapia*, 106, 122–128.
- Franke, R., & Schilcher, H. (2005). *Chamomile Industrial Profiles : Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Glowania, H.J., Raulin, C., & Swoboda, M. (1987). The effect of chamomile on wound healing-a controlled clinical-experimental double-blind study. *Zeitschrift für Hautkrankheiten*, 62, 1262-1271.
- Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H., & Schneider, G. (1992). *Hagers handbuch der pharmazeutischen praxis* (5a ed.). Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
- Holzmann, I., Cechiquel, V., Mora, T., Cáceres, A., Martínez, V., Cruz, S.M., & de Souza, M.M. (2011). Evaluation of behavioral and pharmacological effects of hydroalcoholic extract of *Valeriana prionophylla* Standl. from Guatemala. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2011, 1-9.
- Holzmann, I., Filho, V., Cáceres, A., Martínez, J., Cruz, S.M., & de Souza, M. (2016). Antidepressant-like effect of hydroalcoholic extract of *Valeriana prionophylla* Standl. from Guatemala: Evidence for the involvement of the monoaminergic systems. *International Journal of Phytopharmacy*, 6(1), 14-26.

- Jakovlev, V., Isaac, O., & Flaskamp, E. (1983). Pharmacologic studies on chamomile compounds. VI. Studies on the antiphlogistic effect of chamazulene and matricine. *Planta Medica*, 49, 67-73.
- Kinghorn, A. (2002). *Stevia: The genus Stevia*. London and New York: Taylor & Francis.
- King, R.M., & Robinson, H. (1987). *The Genera of the Eupatorieae (Asteraceae): Monographs in Systematic Botany*. St. Louis: Missouri Botanical Garden.
- Kohda, H., Yamazaki, K., & Tanaka, O. (1976). Methylripariochromene A from *Stevia serrata*. *Phytochemistry*, 15, 847-848.
- Marroquín, M.N., Cruz, S.M., Cáceres, A. (2012). Antioxidant activity and phenolic compounds in three species of Passifloraceae (*Passiflora edulis*, *P. incarnata*, *P. ligularis*) from Guatemala. *Acta Horticulturae*, 964, 93-98.
- Mitscher, L.A., Darker, S., & Gollapudi, A. (1987). A modern look at folkloric use a Anti-infective agents. *Journal of Natural Products*, 5, 1025-1041.
- Mitscher, L.A. Park, Y., Clark, D., & Beal, J. (1972). Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia*, 35, 157-166.
- MSPAS-USAC (2006). *Vademecum Nacional de Plantas Medicinales*. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Nash, D.L., & Williams, L.O. (1976). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(12), 116-125.
- Pérez Sabino, J.F., Mérida Reyes, M., & Farfán Barrera, C.D. (2012). Análise e discriminação de quimiotipos de *Lippia graveolens* H.B.K. da Guatemala por microextração em fase sólida, CG-EM e análise multivariada. *Quimica Nova*, 35(1), 97-101.
- Pruski, J.F., & Robinson, H. (2015). Asteraceae Bercht. & J. Presl. *Flora Mesoamericana*, 5(2), 554-567.
- Ramadan, M., Goeters, S., Watzer, B., Krause, E., Lohmann, K., Bauer, R.,... Imming, P. (2006). Chamazulene carboxylic acid and matricin: A natural profen and its natural

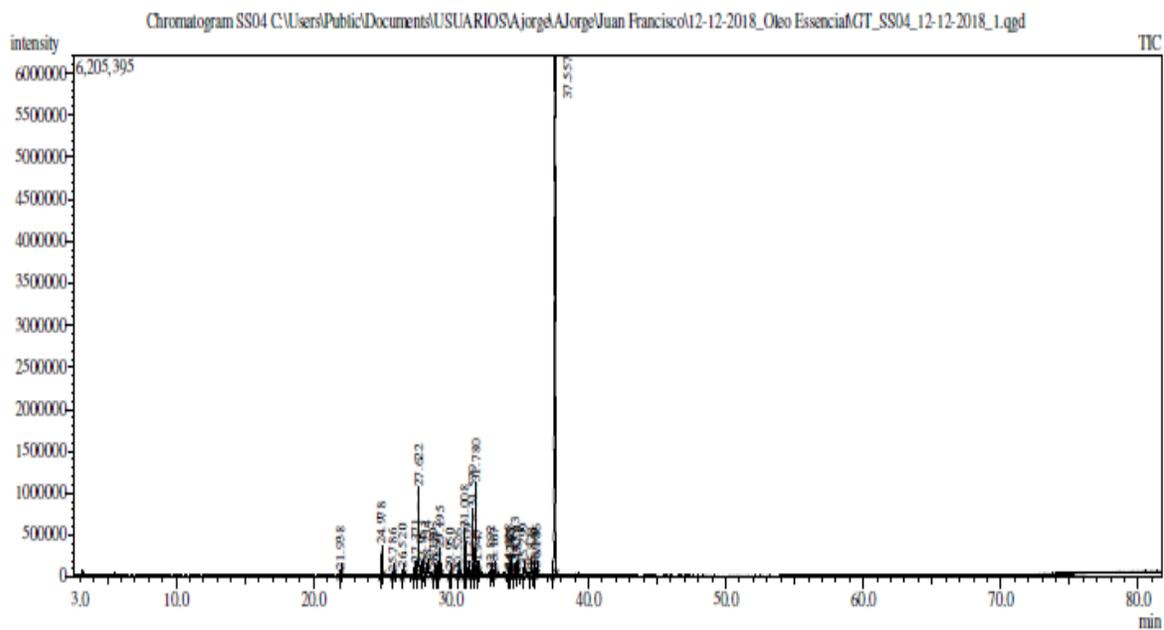
- prodrug identified through similarity to synthetic drug substances. *Journal of Natural Products*, *69*, 1041-1045.
- Román, L. U., Mora, Y., & Hernández, J.D. (1990). *Stevia serrata*, a source of chamazulene. *Phytoterapia*, *61* (1), 84.
- Robinson, H., & King, R.M. (1977). *Eupatorieae—systematic review: In The Biology and Chemistry of the Compositae*. New York: Academic Press.
- Sánchez-Arreola, E., Cerda-García-Rojas, C.M., Joseph-Nathan, P., Román, L.U., & Hernández, J.D. (1995). Longipinene derivatives from *Stevia serrata*. *Phytochemistry*, *39* (4), 853-857.
- Simas, D.L., Mérida-Reyes, M., Muñoz-Wug, M., Cordeiro, M., Giorno, T.B., Taracena, E.A.,...Ribeiro da Silva, A.J. (2017). Chemical composition and evaluation of antinociceptive activity of essential oil of *Stevia serrata* Cav. from Guatemala. *Natural Products Research*, 1-3. doi:10.1080/14786419.2017.1399376
- Ticktin, T., & Dalle, S.P. (2005). Medicinal plant use in the practice of midwifery in rural Honduras. *Journal of Ethnopharmacology*, *96*, 233-248.
- Vibrans, H., Alipi, A.M., & Pichardo, J.M. (2009). Malezas de México. Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/stevia-serrata/fichas/ficha.htm>

Apéndice I

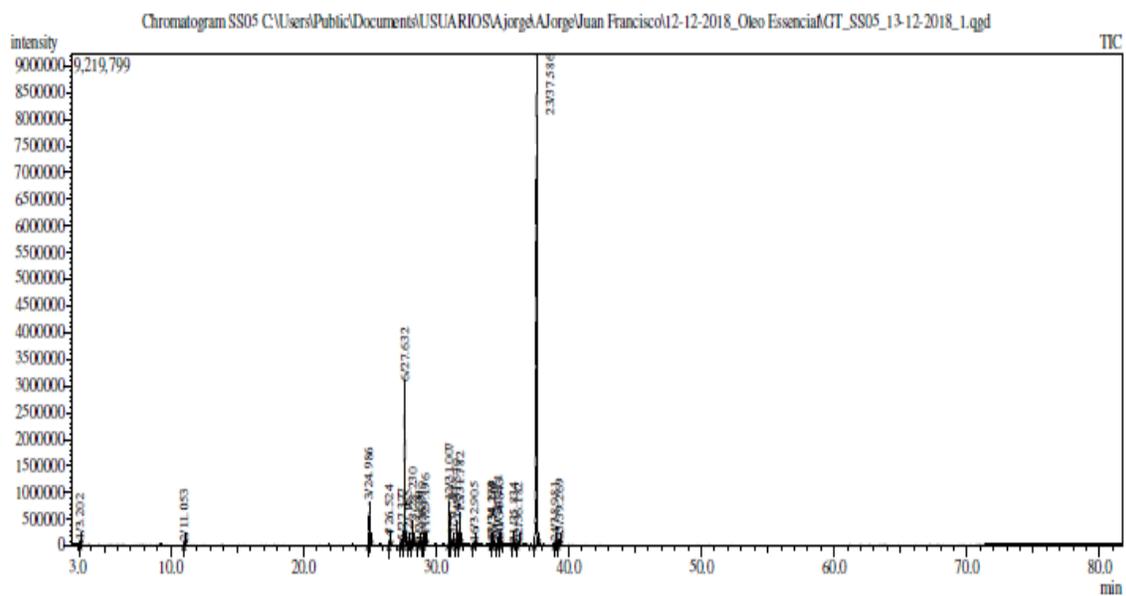
Cromatograma de la composición del aceite esencial de las partes aéreas de individuos de Stevia serrata Cav. de la localidad SM-SMI



Cromatograma de la composición del aceite esencial de las partes aéreas de individuos de Stevia serrata Cav. de la localidad QCH-CH



Cromatograma de la composición del aceite esencial de las partes aéreas de individuos de Stevia serrata Cav. de la localidad T-SMCI



Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
M.A. Rodolfo Marineli Orozco Chilel	
M.A. Isabel Cristina Gaitán	
Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva	

Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
Lic. Manuel Alejandro Muñoz Wug	Investigador	20090848	x		
Lic. Max Samuel Mérida Reyes	Investigador	20060419	x		

Guatemala, 11 de enero de 2019

Dr. Juan Francisco Pérez Sabino
 Coordinador del Proyecto de Investigación

Dra. Hilda Valencia de Abril
 Coordinadora del PUISS

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar
 Coordinador General de Programas