

UNIVERSIDAD MILITAR

NUEVA GRANADA



ANÁLISIS METABOLÓMICO DE LA ESPECIE *Baccharis latifolia* (ASTERACEAE) EN LA SABANA DE BOGOTÁ

Jessica Katerín Prada Muñoz

Trabajo de Grado

Director:
Ericsson David Coy Barrera, PhD.
Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas
Universidad Militar Nueva Granada

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
BIORGÁNICA
BOGOTÁ
2015

CONTENIDO

Resumen

Lista de figuras

Lista de tablas

CAPÍTULO 1

Introducción.....8

1. Estado del arte

1.1. Generalidades de la familia Asteraceae.....10

1.2. Características morfológicas de la familia Asteraceae.....11

1.3. Generalidades del Género *Baccharis*121.4. Usos medicinales de géneros de *Baccharis*.....151.5. Fitoquímica del género *Baccharis*.....17

1.5.1. Flavonoides.....17

1.5.2. Terpenoides.....18

1.5.3. Diterpenos.....19

1.5.4. Cumarinas.....19

1.5.5. Compuestos aislados en aceites esenciales.....20

1.6. Clasificación taxonómica.....21

1.7. Generalidades de la especie *Baccharis latifolia*.....211.8. Descripción botánica de la especie *B. latifolia*.....211.9. Usos tradicionales de *B. latifolia*.....22

1.9.1. Usos medicinales.....22

1.9.2. Uso agroforestal23

1.9.3. Uso industrial.....23

1.10. Estudios químicos y de actividad biológica de *B. latifolia*.....24

1.11. Instituto de Biología Farmacéutica y Fitoquímica (IPBP).....24

1.12. Estudio de metabolitos secundarios.....25

1.13. Referencias.....25

2. CAPÍTULO 2: Actividad Antioxidante Y Cuantificación De Fenoles Y Flavonoides

2.1. Introducción.....30

2.2. Materiales y Métodos.....31

2.2.1. Selección del material vegetal.....31

2.2.2. Recolección y clasificación del material vegetal.....	31
2.2.3. Preparación de extractos.....	32
2.2.4. Determinación del contenido de fenoles totales	33
2.2.5. Determinación del contenido de flavonoides totales.....	33
2.2.6. FRAP (Ferric reducing/antioxidant power assay)	33
2.2.7. Captura del Radical libre DPPH [•] (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging).....	34
2.2.8. Análisis Estadístico.....	34
2.3. Resultados y discusión.....	34
2.3.1. Selección del material vegetal.....	34
2.3.2. Contenido total de fenoles.....	36
2.3.3. Contenido de flavonoides totales.....	37
2.3.4. FRAP (Ferric reducing/antioxidant power assay.....	39
2.3.5. Captura del Radical libre DPPH [•] (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging).....	40
2.4. Conclusiones.....	44
2.5. Referencias.....	44
3. CAPÍTULO 3: Análisis por cromatografía de capa fina y líquida acoplada a espectrometría de masas de hojas, tallos, fruto y flor de <i>B. latifolia</i>	
3.1. Introducción.....	48
3.2. Materiales y métodos.....	50
3.2.1. Cromatografía en capa fina.....	50
3.2.2. Perfilado por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-LC).....	50
3.3. Resultados y discusión.....	51
3.3.1. Análisis por Cromatografía de capa fina.....	51
3.3.2. Análisis por Cromatografía líquida de alta eficiencia.....	53
3.4. Conclusiones.....	56
3.5. Referencias.....	58
4. CAPÍTULO 4: RELACIONES METABOLÓMICAS EXPRESADAS ENTRE DATOS CUANTITATIVOS Y ENTRE PERFILES CROMATOGRÁFICOS	
4.1. Introducción.....	62
4.2. Materiales y métodos.....	64

4.2.1. Análisis de datos.....	64
4.3. Resultados y discusión.....	65
4.3.1. Analisis multivariado con datos cuantitativos espectofotométricos.....	65
4.3.2. Analisis multivariado con perfiles cromatograficos.....	68
4.3.3. Análisis discriminante.....	74
4.3.3.1. OPLS-DA total.....	74
4.3.4. Analisis supervisado.....	74
4.3.4.1. Score plot y S-line con FRAP.....	74
4.3.4.2. Score plot y S-line discriminado con DPPH.....	76
4.4. Conclusiones.....	77
4.5. Referencias.....	78
Conclusiones y Recomendaciones.....	81
Abreviaturas.....	83

ANEXOS

CAPÍTULO 2.....	84
Tabla 2.1. Contenido total de fenoles y flavonoides IC ₅₀ y FRAP	
CAPÍTULO 3.....	86
Cromatografía de capa fina.....	86
Tabla 3.1 Compuestos detectados por cromatografía en placa fina con Rf.	
Cromatografía líquida.....	87
Tabla 3.2 Presencia / ausencia de posibles compuestos en cada accesión de la planta.	
Tabla 3.3 Presencia / ausencia de picos en cada extracto de las hojas evaluadas	
Tabla 3.4 Presencia / ausencia de picos en cada extracto de los tallos evaluados	
Tabla 3.5 Presencia / ausencia de picos en cada extracto de los flores evaluadas	
Tabla 3.6 Presencia / ausencia de picos en cada extracto de los frutos evaluados	
Tabla. 3.7. Compuestos detectados e identificados tentativamente.	

Resumen

A partir del extracto etanólico de hojas, tallos, frutos y flores de la especie *B. latifolia* (Asteraceae) colectada en diferentes lugares, se estableció el perfil químico mediante la cuantificación de fenoles y flavonoides y la capacidad antioxidante (DPPH y FRAP). Se realizó un análisis TLC (cromatografía de capa fina) con el revelador Vainillina con el fin de detectar principalmente terpenoides. De igual forma, tales extractos se analizaron por HPLC-MS para estimar el número de metabolitos secundarios detectables presentes en cada órgano de la planta. El análisis cuantitativo mostro que existe una alta correlación entre los fenoles y flavonoides con el reactivo FRAP (ccP de 0.84 y 0.76, respectivamente). Con TLC se identificaron 22 compuestos en total, 20 en hojas, 12 en tallos, 11 en flores y 4 en frutos. Con HPLC-MS se detectaron 36 compuestos en total, 36 en hojas, 28 en tallos, 17 en flores y 4 en frutos. Se realizó una identificación tentativa y se encontraron 22 flavonoides, 10 alcaloides, 3 terpenoides y 1 lignano. Finalmente se discriminó mediante análisis OPLS-DA supervisado con FRAP y DPPH y PCA con HCA identificando diferencias y similitudes entre las muestras. En conclusión *B. latifolia* es una planta bastante versátil, mostró cambios en su metaboloma dependiendo del lugar, estado fenológico, composición química, condiciones de la planta y su entorno, ya sea produciendo o no ciertos compuestos que le ayudan a subsistir en tales entornos, como lo son los flavonoides.

Palabras clave: Asteraceae, *Baccharis latifolia*, lead finding, Metabolómica, Metabolitos secundarios.

Abstract

From the ethanol extract of leaves, stems, fruits and flowers of *B. latifolia* (Asteraceae) collected at different locations, the chemical profile was established by quantifying total phenols and flavonoids and antioxidant capacity (DPPH and FRAP). TLC (thin layer chromatography) analysis using Vanillin reagent as revealer was performed in order to mainly detect terpenoid-related compounds. Likewise, these extracts were analyzed by HPLC-MS to estimate the number of detectable secondary metabolites present in each plant organ. Quantitative analysis showed that there is a high correlation between phenols and flavonoids with FRAP reagent (CPC 0.84 and 0.76, respectively). TLC let to the detection of 22 compounds (20 in leaves, 12 in stems, 11 in flowers and 4 in fruits). Additionally, 36 compounds were globally identified with HPLC-MS: 36 in leaves, 28 in stems, 17 in flowers and 4 in fruits. The identification to those compounds was tentatively performed and 22 flavonoids, 10 alkaloids, 3 terpenoids and 1 lignan were found. Finally, they were discriminated by OPLS-DA analysis and were supervised by FRAP and DPPH, PCA with HCA allowing identifying some differences and similarities between samples. In conclusion, *B. latifolia* is a very versatile plant, since it showed changes in its metabolome depending on location, growth stage, chemical composition, plant conditions and their environment, whether producing or not certain compounds helping it to survive in such environments, such as flavonoids.

Keywords: Asteraceae, *Baccharis latifolia*, lead finding, Metabolomics, secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribución de la familia Asteraceae.....	10
Figura 1.2. Tipos de Tricomias del género <i>Baccharis</i>	13
Figura 1.3. Unidades de flavonoides aislados en <i>Baccharis</i>	17
Figura 1.4. Flavonoides aislados de extractos etanólicos de <i>B. pseudotenuifolia</i>	18
Figura 1.5. Flavonoides de <i>B. gaudichaudiana</i> y <i>B. rufescens</i>	18
Figura 1.6 Estructura del ácido oleanólico.....	19
Figura 1.7. Estructuras de diterpenos aislados del género <i>Baccharis</i>	19
Figura 1.8 Cumarinas aisladas en <i>Baccharis darwiniis</i>	20
Figura 1.9. Aceites esenciales aislados en el género <i>Baccharis</i>	20
Figura 1.10. Compuestos aislados en <i>B. latifolia</i>	23
Figura 2.1. Población en Cundinamarca de la familia Asteraceae según registros en el Herbario Nacional Colombiano.....	35
Figura 2.2. Contenido total de fenoles en diferentes partes de veinte plantas colectadas en diferentes zonas.	37
Figura 2.3. Contenido total de flavonoides en diferentes partes de veinte plantas colectadas en zonas diferentes.	38
Figura 2.4. Poder reductor (FRAP).....	40
Figura 2.5. Datos DPPH.....	41
Figura 2.6. Grafica de correlación entre cuantificación de fenoles y flavonoides y evaluación de actividad biológica (DPPH y FRAP).....	43
Figura 3.1. Placas de cromatografía de capa fina.....	52
Figura 3.2. Cromatogramas de HPLC.....	55
Figura 4.1 Rutas del proceso metabólico.....	63
Figura 4.2. Análisis de componentes principales (PCA) de la caracterización química de Hojas.....	66
Figura 4.3. Análisis de componentes principales (PCA) de la caracterización química de tallos.....	66
Figura 4.4. Análisis de componentes principales (PCA) de la caracterización química de frutos.....	67

Figura 4.5. Análisis de componentes principales (PCA) de la caracterización química de flores.....	67
Figura 4.6. Análisis de componentes principales (PCA) de la caracterización química y perfiles cromatograficos de hojas.....	70
Figura 4.7. Análisis de componentes principales (PCA) de la caracterización química y perfiles cromatograficos de tallos.....	71
Figura 4.8 Análisis de componentes principales (PCA) de la caracterización química y perfiles cromatograficos de frutos.	72
Figura 4.9. Análisis de componentes principales (PCA) de la caracterización química y perfiles cromatograficos de flores.....	73
Figura 4.10 Análisis discriminante OPLS-DA por órgano de la planta.....	74
Figura 4.11. Score y S-line supervisado por FRAP.....	75
Figura 4.12. Score y S-line supervisado por DPPH.....	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Usos medicinales de algunas especies del genero <i>Baccharis</i>	14
Tabla 2.1. Datos de muestras seleccionadas para el estudio.....	31

INTRODUCCIÓN

Las plantas representan la segunda fuente de biodiversidad, entre 300.000 y 500.000 especies (15%) (Hammond 1995 citado por Abreu, & Cuellar,. 2008). En los trópicos existen aproximadamente 155.000 especies de plantas superiores y 120.000 de ellas en los bosques húmedos tropicales, los cuales representan el 7-8% de la superficie terrestre (Cragg *et al.*, 1997 citado por Abreu & Cuellar, 2008).

Las plantas son excelentes fábricas de compuestos, eficientes, sostenibles y no contaminantes, por tanto existe un gran interés científico en el estudio de la composición química del material vegetal. Entonces, la manipulación precisa de un pequeño número de genes o de sus reguladores puede cambiar e incrementar el rendimiento y calidad de los productos vegetales, ej. La producción de compuestos químicos (Giraldo *et al.*, 2012)

La familia de las compuestas (Asteraceae) es reconocida por el hombre como plantas alimenticias y/o medicinales (Cabrera *et al.*, 2000). Esta es la más numerosa de todas las fanerógamas con aproximadamente 23.000 especies y más de 1.500 géneros distribuidas por todo el mundo, excepto en la Antártida (Cabrera *et al.*, 2000), incluyendo desde pequeñas hierbas de 1 cm de altura hasta arboles de más de 30 m (Katinas *et al.*, 2007). En Colombia, la familia Asteraceae está representada en todos los climas; sus especies exhiben una amplia plasticidad estructural y un notable ajuste ecológico, lo cual permite encontrar algunas en desiertos, otras en páramos o en manglares, así como en las cordilleras o en las sabanas, e incluso en la selva amazónica (Díaz, 1989).

Dentro de esta gran familia, en la sabana de Bogotá se encuentra ampliamente representada la especie *Baccharis latifolia*. Esta planta ha sido tradicionalmente usada en diferentes técnicas de cocimiento, para daños e inflamaciones de las articulaciones, nervios y tendones; en infusiones para dolores de estómago, reducción de flatulencias, mejoramiento del asma, enfermedades de la matriz, y cataplasma para luxaciones, torceduras, hernias (Velásquez, 2007). Según Martínez *et al.*, (2010), esta especie presenta actividad biocida frente a dos fitopatógenos *Aspergillus niger* y *Phytophthora palmivora*.

El estudio de los metabolitos por separado no es sencillo, al contrario, resulta bastante complicado, por lo que es necesario hacerlo desde un punto de vista más global, por esta razón se hace indispensable el uso de una escuela de pensamiento más holístico como es la metabolómica, rama encargada de estudiar todas las moléculas orgánicas pequeñas llamadas metabolitos (Worley y Powers, 2013), presentes en muestras biológicas

como tejidos, fluidos, células entre otras. La metabolómica incorpora bioinformática, análisis estadísticos y el manejo de información biológica, con el fin de buscar patrones únicos de metabolitos y de esta manera facilitar su cuantificación, reducción y análisis (Choi, 2005 citado por Cardoso & Villarreal, 2007).

Para el desarrollo del presente trabajo se planteó como objetivo general establecer el perfil metabolómico de diferentes accesiones (hojas, tallos, frutos y flor) de la especie *Baccharis latifolia* colectadas en diferentes zonas de Cundinamarca-Colombia. Para dar cumplimiento a este objetivo, se planteó establecer un perfil químico de los extractos mediante la cuantificación de fenoles y flavonoides y la capacidad antioxidante, para posteriormente realizar un análisis fitoquímico y registrar el perfil cromatográfico, con el fin de discriminar los datos cuantitativos y del perfil químico y así establecer las relaciones en el metabolismo expresado. Estos resultados finalmente aportarán a la investigación en curso dentro de la ResNet NPND, dando así información completa de esta especie que, además de poseer propiedades medicinales, es abundante en Colombia.

CAPÍTULO 1

1. Estado del arte

1.1. Generalidades de la familia Asteraceae

La familia de las compuestas (Asteraceae), constituye el grupo vegetal más diverso de plantas vasculares sobre el planeta (Bremer, 1994 y Smith *et al.*, 2004, citados por García *et al.*, 2014). Se estima su riqueza en aproximadamente 25.000 especies y más de 1.500 géneros.

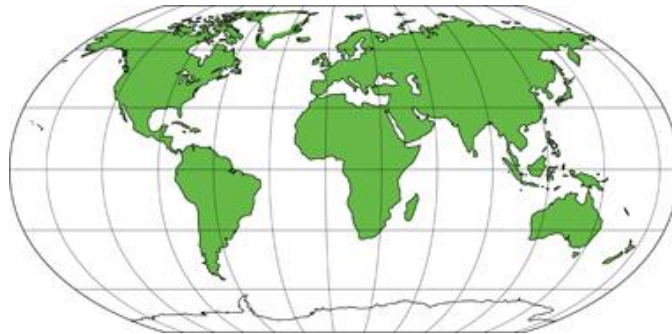


Figura 1.1 Distribución geográfica de la familia Asteraceae

Su distribución se da por todo el

mundo, excepto en la Antártida (Cabrera *et al.*, 2000; Funk *et al.*, 2009; Laboratorio de Sistemática de plantas vasculares, 2013). Son abundantes en regiones semiáridas, tropicales y subtropicales, Provincia del Cabo, Sur de América, Australia y Región Mediterránea (Oliva *et al.*, 2003), Rusia y Estados Unidos (Laboratorio de Sistemática de plantas vasculares 2013) (Fig 1.1). Debido a su alta biodiversidad han desarrollado una alta capacidad de adaptación y supervivencia, capaces de adaptarse en zonas alpinas de altas montañas hasta plantas con ciclo CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas), en zonas desérticas (*Senecio, kleinia*) (Funk *et al.*, 2009; Oliva *et al.*, 2003).

Entre los géneros más importantes de la familia Asteraceae se encuentra el *Senecio* (1.250), *Vermonia* (1.000), *Cousinia* (650), *Eupatorium* (600), *Centaurea* (600), *Artemisia* (550), *Baccharis* (500) (Verdi *et al.*, 2005). Se distinguen algunas especies ornamentales de gran importancia económica como el Girasol (*Helianthus annuus*) (Wiersema y Leon, 2013) y géneros como *Dendranthema*, *Argyranthemum*, *Leucanthemum*, *Dahlia*, *Tagetes*, *Senecio*, así como otras especies conocidas como comestibles *Cichorium* (escarola), *Cynara* (alcachofa), *Helianthus* (girasol), *Taraxacum* (diente de león), y *Lactuca* (lechuga) (Tapia, 2010). Las especies de los géneros *Tanacetum* y *Pulicaria* tienen propiedades insecticidas (Laboratorio de Sistemática de plantas vasculares 2013), y otro gran número de plantas con propiedades medicinales: manzanilla (*Matricaria chamomilla*), mercadela (*Canendula officinalis*), artemisa (*Artemisia vulgaris*), entre otras (Tapia, 2010). Además esta familia es

particularmente rica en sesquiterpenos, que poseen propiedades biológicas y farmacológicas (Cabrera *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2003; Daniel, 2006), por ejemplo aquellos sesquiterpenos que han presentado actividad antitumoral (Daniel, 2006).

En Colombia, la familia Asteraceae está representada en todos los climas, sus especies exhiben una amplia plasticidad estructural y un notable ajuste ecológico, lo cual permite encontrar algunas en desiertos, otras en paramos o en manglares, así como en las cordilleras o en las sabanas e incluso en la selva amazónica (Díaz, 1989). El Occidente de la Sabana de Bogotá (municipios de Subachoque, El Rosal, y Madrid) es una de la más diversas con 59 géneros/155 especies (Díaz, 1989).

1.2. Características morfológicas de la familia Asteraceae

La familia Asteraceae es altamente heterogénea respecto a su morfología. Respecto a su hoja, se pueden encontrar con casi todos los tipos (simples, compuestas, alternas, opuestas y arrosetadas) (Tapia, 2010), aunque por lo general son alternas y menos frecuente opuestas, con estípulas ausentes, (Watson y Dallwitz, 1992). Además sus partes vegetativas (raíces, tallos e indumento) son también de diferentes formas.

Diferente a esto, la inflorescencia es bastante homogénea y es una característica inconfundible en esta familia, la cual aparenta ser una flor, pero en realidad es una cabezuela o capítulo; consiste en una estructura formada por un receptáculo basal (Cabrera *et al.*, 2000; Tapia, 2010) ensanchado (Katinas *et al.*, 2007) donde se insertan las flores diminutas, rodeadas por un involucreo de brácteas filarias. El receptáculo puede ser plano, convexo, cónico o cilíndrico, y con pubescencia abundante. Pueden ser terminales o axilares, solitarias o pedunculadas, estar dispuestas en cimas, racimos, umbelas, corimbos o panículas.

Sus flores son pentámeras, epiginas, unisexuales o estériles, bisexuales y proterandras (Watson y Dallwitz, 1992; Cabrera *et al.*, 2000; Tapia, 2010; Redonda y Villaseñor, 2012). Su simetría puede ser actinomorfa o zigomorfa (radial o bilateral). El cáliz en forma de vilano (conjunto de pelos simples, cerdas, escamas, que rodean las diminutas flores). Corola gamopétala 5 (2-4- dentada) con cuatro formas: la primera, corola tubular 4-5 lobulada, con limbo comúnmente corto y tubo inconspicuo, característico en flores bisexuales o funcionalmente masculinas; la segunda, corola filiforme, similar a la tubular pero más angosta, se presenta generalmente en flores femeninas; la tercera forma es corola bilabiada, comúnmente en flores bisexuales, constan de un labio superior 3-lobulado o 3-dentado y 2 labios inferiores delgados y recurvados. Y por último corola ligulada o loriforme,

3-5 dentada (dientes rara vez ausentes), cuando las flores liguladas se limitan a la periferia de la cabezuela son comúnmente estériles o femeninas (cabezuela radiada) o si por el contrario la cabezuela está constituida totalmente de flores liguladas, entonces son bisexuales, la planta es dioica porque rara vez son unisexuales (cabezuelas radiadas) o la cabezuela está totalmente constituida de flores tubulares (cabezuela discoides) o todas las flores son filiformes (cabezuelas disciformes) (Laboratorio de Sistemática de plantas vasculares 2011; Redonda y Villaseñor 2012).

Los frutos se presentan en aquenio (cipselas), con o sin vilano, raramente drupáceos (Redonda y Villaseñor, 2012). El polen suele ser tricoporado, echinate, rara vez estipulado. Estilo apicalmente bifido (Zhu *et al.*, 2011).

La diversidad de formas biológicas es un reflejo de la gran cantidad de géneros y especies que existen en la familia Asteraceae (Díaz, 1989), donde predominan plantas herbáceas, raramente arbustos perennes, subarbustos (Zhu *et al.*, 2011) o lianas (Oliva *et al.*, 2003; Katinas *et al.*, 2007; Funk *et al.*, 2009) y árboles pequeños que van desde 1 cm de altura hasta árboles de más de 30 m (Katinas *et al.*, 2007). Su diversidad se puede atribuir a su plasticidad genética, a sus excelentes mecanismos de dispersión y a su capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ecológicas, viéndose favorecidas en ocasiones por perturbaciones. Por esta razón no es raro ver Asteraceae compitiendo con malezas, en medio de ruderales y/o arvenses (Tapia 2010).

En muchas especies de la familia Asteraceae es común la presencia de estructuras secretoras como conductos, cavidades y tricomas de diferentes tipos. Sus secreciones pueden contener diferentes compuestos químicos, lo que les confiere un gran valor desde el punto de vista fitoquímico (Fahn 1979 y Evert 2006 citados por Delbon *et al.*, 2012).

1.3. Generalidades del Género *Baccharis*

El género *Baccharis* es el más rico en especies dentro de la familia Asteraceae, está compuesto por más de 400-500 (Malagarriga, 1976, Nesom, 1990 y Breme, 1994 citados por Giuliano 2001; Pires & Becker. 2010; Verdi *et al.*, 2005), especies distribuidas principalmente en regiones tropicales del continente (Troiani 1985) como: Brasil, Argentina, Colombia, Chile y México (Pires & Becker. 2010; Verdi *et al.*, 2005). Su distribución es exclusivamente americana, va desde el Sur de los Estados Unidos hasta el extremo austral de Chile y Argentina (Giuliano 2001). Su alta concentración de especies en Brasil y los Andes indica que una de estas áreas es probablemente el centro de origen pero aun no es claro (Verdi *et al.*, 2005). Se encuentra ampliamente diversificado en gran variedad de

ambientes (Giuliano, 2001). Este género no ha sido monografiado, por lo tanto no se tiene el número de especies que lo conforman (Guillano, 2001). Sin embargo, Malagarriga, 1976 citado por Guillano (2001) fue quien realizó el mayor aporte en incluir la mayor cantidad de nombres válidos y sinónimos publicados hasta la fecha, donde se reconoció un total de 431 especies y 80 entidades infraespecíficas. A estas cifras se debe agregar 37 especies y 7 taxones infraespecíficos provenientes y descritos a través de nuevas combinaciones, también cerca de 40 nombres que no fueron mencionados por el autor (cfr. Index Kewensis y Gray Herbarium Card Index) (Guillano, 2001)

La sistemática del género, básicamente neotropical, es muy confusa, debido a la gran cantidad de especies publicadas y sus distintas y variadas formas, además de la falta de estudios formalmente rigurosos (Cuatrecasas 1968). Las especies del género *Baccharis* generalmente son arbustos, que miden en promedio 0.5 a 4.0 m de altura (Verdi *et al.*, 2005), aunque se extiende también a plantas perennes herbáceas y subarbustos (Jasinski *et al.*, 2014). La mayoría de las plantas de *Baccharis* se pueden distinguir por su hoja o tallo alado (Freire *et al.*, 2007). Las hojas son morfológicamente diferentes y ayudan a la identificación (Jasinski *et al.*, 2014). Además todas las hojas de la especie se caracterizan por ser pubescentes (solo unas pocas como *B. dracunculifolia* y *B. trinervis* son subglabro en la madurez). Freire (2007), encontró que dos grupos de indumento caracterizan las plantas medicinales, el primero con tricomas aislados (Fig.1.2- A) y el segundo con tricomas en mechones (Fig.1.2-B) (vellosidad uniseriados con células terminales ramificadas (Hellwin 1992 y Ariza, 1973 citado por Freire, 2007).

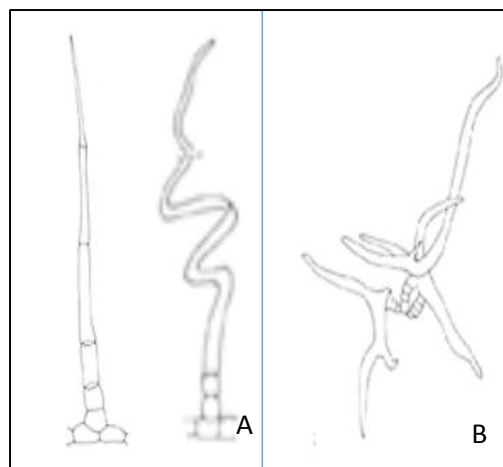


Figura 1.2. Tipos de Tricomas del género *Baccharis*. A. Aislados. B mechones. Modificado de Freire *et al.*, 2007.

Verdi *et al* (2005) reporta que *Baccharis* tiene gran importancia socioeconómica en los estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo y Rio Grande del Sur entre otras regiones del Brasil, porque es usada en la medicina tradicional para el control y tratamiento de diferentes enfermedades. La consumen principalmente cómo te, para aliviar dolencias de estómago, el hígado, inflamaciones, anemia, diabetes, desintoxicación del cuerpo y también

para enfermedades de la próstata (Korbes, 1995 y Correa, 1984 citados por Verdi *et al.*, 2005).

1.4. Usos medicinales de géneros de *Baccharis*

Las especies de este género son utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de varias dolencias, tales como contusiones, inflamaciones, también como antimicrobiano y desinfectante. (Martínez *et al.*, 2010). Estas propiedades se deben a su composición química, basada principalmente en flavonoides, diterpenos y triterpenos (Verdi *et al.*, 2005), donde los flavonoides son distinguidos por conferir resistencia frente al ataque de microorganismos (Martínez *et al.*, 2010). También se han obtenido cumarinas y aceites esenciales (Verdi *et al.*, 2005 y Abad y Bermejo, 2007). Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido un marcador químico para caracterizar a las especies de *Baccharis* (Lonni *et al.*, 2003; Lonni *et al.*, 2005).

Tabla 1.1 Usos medicinales de algunas especies del género *Baccharis*. Adaptación tomada de (Singh, 2006; Abad, y Bermejo, 2007; Carrere, 2009)

Especie	Ubicación	Forma de aplicación	Uso tradicional	Parte usada
<i>Baccharis articulata</i>	Sur de Brasil, Uruguay, Paraguay, Argentina.	Decocción e infusiones	Diabetes	Partes aéreas
<i>Baccharis alamani</i>	México		Inflamaciones	Planta entera
<i>Baccharis conferta</i>	México	Bebida Laxante	Dolor de estómago, Estimular micción	Hojas
<i>Baccharis coridifolia</i>	Sur de Brasil, Paraguay, Uruguay, Argentina.	Decocción Vapores mezclados con azufre	antiinflamatorio Moquillo de caballo y paracitos externos de los caballos.	Hierba entera
<i>Baccharis serraefolia</i> DC	México	Infusión	Diarrea y enfermedades gastrointestinales	Hojas

Tabla 1.1 (cont.) Usos medicinales de algunas especies del género *Baccharis*.
Adaptación tomada de (Singh 2006; Abad y Bermejo 2007; Carrere 2009)

Especie	Ubicación	Forma de aplicación	Uso tradicional	Parte usada
<i>Baccharis crispa</i> DC	Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina	Decocciones infusión	Antiséptico de uso externo y digestivos.	Partes aéreas
		Extracto	Afecciones al hígado y desordenes digestivos.	Hojas
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC	Brasil	Infusión	Problemas hepáticos, disfunciones estomacales y antiinflamatorio.	Hojas
<i>Baccharis douglassi</i>	Argentina	Decocción	Cólicos y anemia por pérdida de sangre.	Hojas y tallos
<i>Baccharis floribunda</i>	Oeste de américa	Decocciones o infusiones	Desinfectante Riñón y piel Cortes y heridas, diabetes y reumatismo.	
<i>Baccharis gaudichaudiana</i>	Paraguay, Argentina	Tónico	Diabetes, dolencias gastrointestinales	hoja
<i>Baccharis glutinosa</i>	Brasil		astringente y antipirético	
<i>Baccharis genistelloides</i>	México	Infusión	Trastornos ginecológicos y digestivos y enfermedades de la piel	ramas
<i>Baccharis sarothroides</i>	Perú, Amazonas	Tónico	Enfermedades del hígado, reumatismo, diabetes	
<i>Baccharis uncinella</i> DC.	México	Decocción	Resfriados, dolores de cabeza sinusal y dolencias generales.	Hojas

Tabla 1.1 (cont.) Usos medicinales de algunas especies del género *Baccharis*. Adaptación tomada de (Singh, 2006; Abad y Bermejo, 2007; Carrere, 2009)

Especie	Ubicación	Forma de aplicación	Uso tradicional	Parte usada
<i>Baccharis illinita</i> DC	Brasil	Té	Propiedades antiinflamatorias de piel, mucosa, anti infecciosos, ulcera de estomago	Hojas y tallos
		Polvo	Cicatrización de heridas de piel	Hojas maceradas y secas
<i>Baccharis incarum</i> Wedd	Argentina	Cataplasmas Infusiones	Heridas	Hojas Hojas y/o tallos
<i>Baccharis heterophylla</i>	México	Infusiones o decocciones	Trastornos gastrointestinales	Partes aéreas
<i>Baccharis latifolia</i> Pers	América del Sur	Decocciones	Reumatismo, hígado, heridas y úlceras	Hojas y tallos.
<i>Baccharis multiflora</i> <i>doblado</i>	México	Infusiones	Gripe, inflamación y problemas Urinarios	Hojas
<i>Baccharis obtusifolia</i> H.B.K.	Colombia	Decocción	Reumatismo, enfermedades del Hígado, heridas y úlceras.	Partes aéreas
<i>Baccharis pentlandii</i> DC	Bolivia		Inflamación y reumatismo	
<i>Baccharis rubricaulis</i> Rubby	Bolivia (utilizado por indígenas)	Infusiones o decocciones	Dolencia de mucosas	Hojas y tallos
<i>Baccharis salicifolia</i>	Desde Los Estados Unidos hasta Chile y Argentina.	Infusión Decocción	Inflamación Agente de higiene femenina	Hojas Hojas y tallos
<i>Baccharis teindalensis</i> L	Ecuador	Infusiones o decocciones	Antiinflamatoria, analgésico y remedio antimicrobianos.	Partes aéreas.
<i>Baccharis tricuneata</i>	Venezuela	Decocciones o infusiones	Infecciones de piel y diabetes	Hojas y tallos
<i>Baccharis vaccinoides</i>	México	Infusiones o decocciones	Trastornos gastrointestinales	Toda la planta

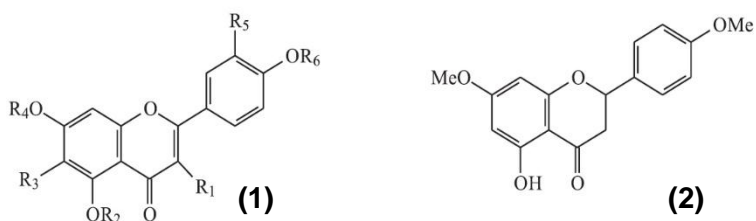
1.5. Fitoquímica del género *Baccharis*

El género *Baccharis* ha sido objeto de gran cantidad de estudios fitoquímicos y de actividad biológica. Desde principios de 1900 se inició su estudio y hoy en día, hay más de 150 compuestos aislados e identificados de este género (Abad y Bermejo, 2007). Entre los compuestos reportados se encuentran principalmente flavonoides, diterpenos y triterpenos (Verdi *et al.*, 2005). También se han obtenido cumarinas y aceites esenciales (Verdi *et al.*, 2005; Abad y Bermejo, 2007). A continuación se describirán los núcleos más representativos de metabolitos aislados del género *Baccharis*.

1.5.1. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos casi universales en los vegetales. Algunos de ellos son los responsables de la coloración de las flores, frutos y a veces de las hojas (Abad y Bermejo, 2007). Son un grupo de metabolitos secundarios, están formados por un anillo aromático unido por lo menos a un grupo oxhidrilo (Bedascarrasbure *et al.* 2004).

Por lo general están presentes como agliconas libres y pocas veces glicosilados, una característica de la familia Asteraceae. Se tiene un registro de 298 flavonoides en *Baccharis* con 109 compuestos diferentes, de los cuales 24 unidades son de flavanona (**2**) y 85 unidades de flavona (**1**), donde un 48% tienen el oxígeno en C3. Sin embargo, la oxigenación patrón ocurre en C5 y C7 del anillo A y C4



del anillo B (Verdi *et al.*, 2005). **Figura 1.3.** Unidades de flavonoides aislados en *Baccharis* (Tomado de Verdi *et al.* 2005)

Por ejemplo, en estudios fitoquímicos del extracto en metanol de *B. pseudotenuifolia* se aislaron los flavonoides hispidulina (**3**), naringenina (**4**), 3'- metoxiluteolina (**5**), apigenina (**6**), kaempferol (**7**), eriodictiol (**8**), quercetina (**9**) (Moreira *et al.*, 2003 citado por Abad y Bermejo 2007).. Los flavonoides (**3**) y (**4**) también fueron aislados de *B. ligustrina* (Moreira *et al.*, 2003 citado por Abad y Bermejo 2007).

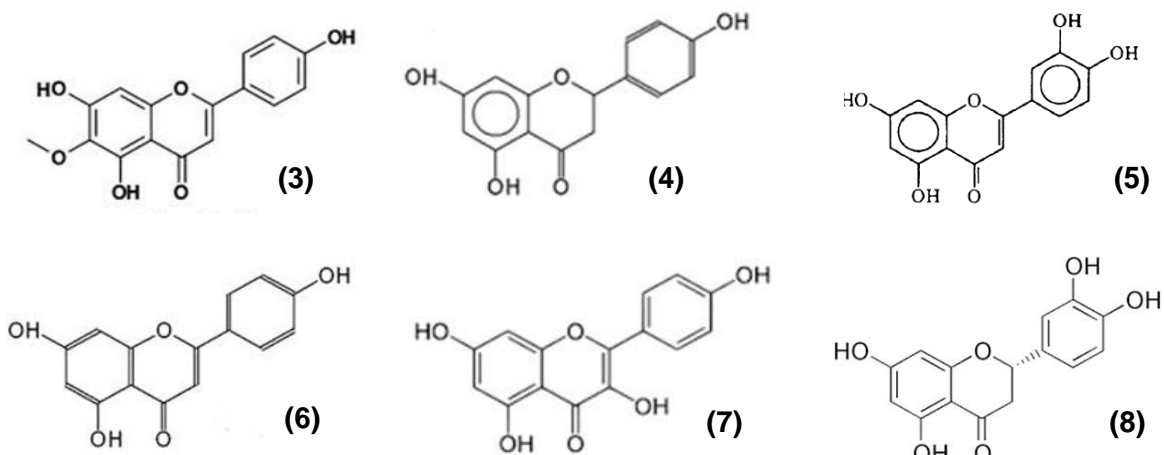


Figura 1.4. Flavonoides aislados de extractos etanólicos de *B. pseudotenuifolia*.

En las especies *B. gaudichaudiana* y *B. rufescens* se han aislado dos flavonoides en común: cirsimaritin (9) y cirsililol (10).

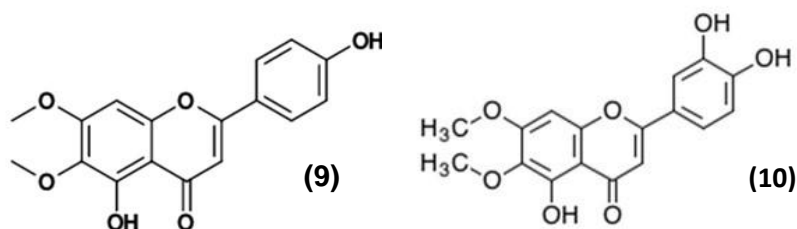


Figura 1.5. Flavonoides aislados de *B. gaudichaudiana* y *B. rufescens*.

Los flavonoides han sido estudiados durante décadas, por su amplia gama de actividades biológicas (Anzenbacher y Zanger 2012). Numerosos estudios han asociado los flavonoides con beneficios en la salud e importantes propiedades antioxidantes ya que reducen la peroxidación lipídica y el efecto negativo de los radicales libres, contribuyendo a la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares (Bedascarrasbure *et al.*, 2004), diabetes y algunos tipos de cáncer (Andersen y Jordheim, 2006; Sottocasa *et al.*, 1989 citados por Raymond, 2009; Tapia *et al.*, 2004). Grecco *et al.*, (2012) reportaron un flavonoide aislado de *B. retusa* denominado sakuranetina evaluado *in vitro* contra *Leishmania* spp presentando una razonable actividad antiparasitaria.

1.5.2. Terpenoides

Inicialmente se creía que este tipo de metabolitos eran producidos exclusivamente por hongos del género *Fusarium* y *Myrothecium* y se les denominó Tricotecenos. Sin embargo,

en 1976 este tipo de metabolito se aisló en *B. megapotamica*, lo que hizo sospechar que era por contaminación con hongos (Verdi, *et al* 2005). Pero Jarvis *et al.*, (1991), citado por VEDI *et al.*, (2005), en su estudio en *Baccharis* con el fin de encontrar el origen de estos tricotecenos, demostraron que estos metabolitos se biosintetizan en algunas especies de plantas después de la polinización de las plantas femeninas, como es el caso *B. coridifolia*. Aunque existen pocos reportes sobre la composición de triterpenos en el género *Baccharis*, los compuestos más comunes son triterpenoides de núcleo oleanólico (11) (Abad y Bermejo 2007)

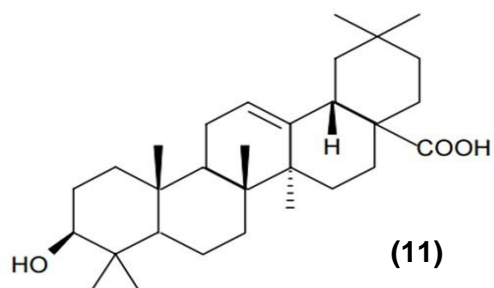


Figura 1.6. Estructura del ácido oleanólico. (Tomado de Abad y Bermejo 2007)

1.5.3. Diterpenos

Los diterpenos característicos del género *Baccharis* son los de tipo neoclerodano, además se han aislado derivados de kaurano y labdano. De *B. gaudichaidiana* se aisló dos nuevos diterpenos clerodano, denominados gaudichanolides A y B (12) y otro llamado bacchariol (13) (Abad y Bermejo 2007).

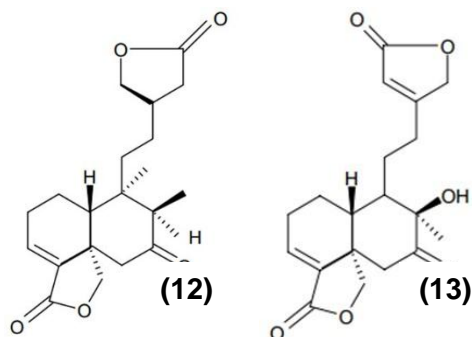


Figura 1.7. Estructuras de diterpenos aislados del género *Baccharis* (Tomado de Abad y Bermejo 2007)

1.5.4. Cumarinas

En extractos de *Baccharis darwiniis* se aislaron tres cumarinas llamadas 5'-hidroxiaurapteno (anisocoumarin H) (14), aurapteno (7-geraniloxicumarina) (15) y 5'-oxoaurapteno (diversinina) (16) (Kurdela *et al.*, 2010). La anisocoumarina H y diversinina han demostrado tener actividad antifúngica (Kurdela *et al.*, 2010).

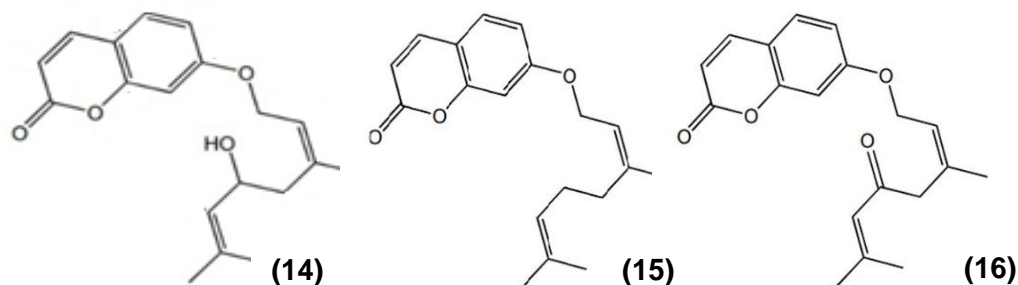


Figura 1.8. Cumarinas aisladas en *Baccharis darwiniis*

1.5.5. Compuestos encontrados en aceites esenciales

Los aceites esenciales no son compuestos puros, puesto que son la mezcla de varios metabolitos volátiles. Este tipo de sustancias han sido aislados de las hojas de cinco especies del género. Así, a partir de *B. racemosa*, *B. linearis*, y *B. obovata* (Molares *et al.*, 2009) se han identificado compuestos como limoneno (**17**), δ -cadineno (**18**), mirceno (**19**), y de *B. salicifolia* compuestos como α -tujeno (**20**), α - y β -pineno (**21**), α -felandreno (**22**), limoneno, β -ocimeno (**23**), terpinen-4-ol (**24**) (Malizia *et al.*, 2005 citado por Abad y Bermejo 2007). Por último, de la especie *B. tenelia* se obtuvo el sesquiterpeno llamado espatulenol (**25**) (Biurrun *et al.*, 2005 citado por Abad y Bermejo 2007).

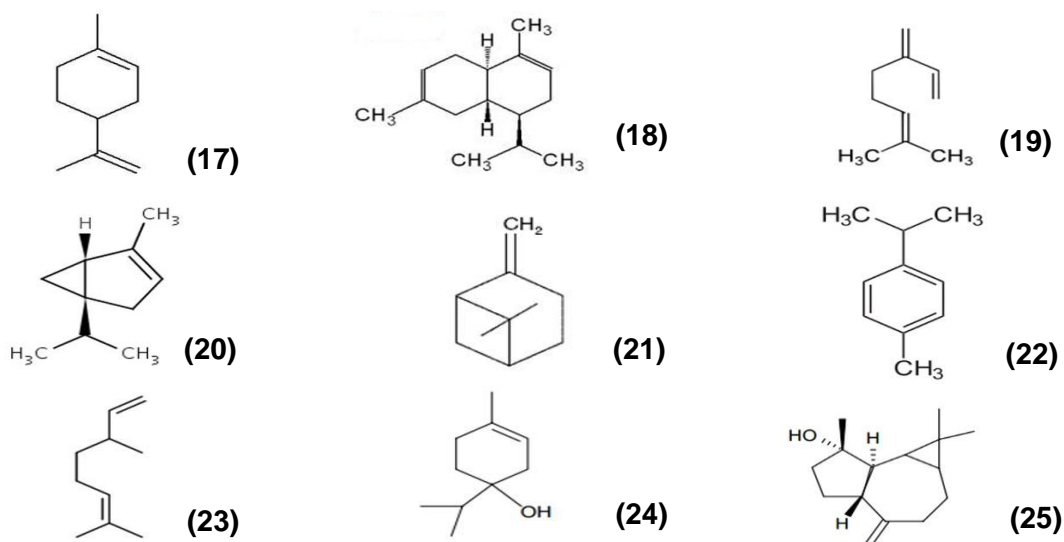


Figura 1.9. Compuestos identificados en aceites esenciales obtenidos de especies del género *Baccharis*.

1.6. Clasificación taxonómica de la especie *Baccharis latifolia*

Según información obtenida en el Herbario Nacional Colombiano, la especie objeto de estudio corresponde a la siguiente clasificación taxonómica.

Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Baccharis
Epíteto Específico	Latifolia (Ruiz & Pav.) Pers.

1.7. Generalidades de la especie *Baccharis latifolia*

Esta especie se distribuye por toda la zona tropiandina, de Venezuela a Bolivia y norte de Argentina. Presenta un rango altitudinal entre los 1600 y 3800 m.s.n.m pero predominan entre los 2500-3000 m.s.n.m. Sin embargo, tiene una amplia distribución, pues puede llegar a establecerse en un rango altitudinal bajo de 1500 m.s.n.m hasta descender a 500 a 1100 m.s.n.m. Se ha observado en zonas heladas eventualmente y con una temperatura media que oscila entre 7-19 °C (Hoyos y Yep 2008).

Esta planta presenta una alta tolerancia a suelos pobres y difíciles. Es capaz de tolerar suelos con alta pedregosidad y estaciones carentes de agua (Reynel y Leon 1990; Hodson *et al.*, 1988, citado por Hoyos y Yep 2008). Es por esta razón que su distribución en tales zonas es bastante amplia (Abad y Bermejo 2007).

Baccharis latifolia ha sido tradicionalmente usada en diferentes técnicas de cocimiento, para daños e inflamaciones de las articulaciones, nervios y tendones; en infusiones para dolores de estómago, reducción de flatulencias, mejoramiento del asma, enfermedades de la matriz, y cataplasma para luxaciones, torceduras, hernias. Según Martínez *et al* (2010) esta especie presenta actividad biocida frente a dos fitopatógenos *Aspergillus niger* y *Phytophthora palmivora*.

Existen diversos antecedentes químicos y biológicos de esta especie. Los trabajos fitoquímicos han reportado la extracción de cuatro compuestos de las raíces: óxido de escualen-baccharis, un derivado de Tymol y 3 *p*-hidroxiacetofenonas, germacreno D, escualeno y un hidrocarburo sesquiterpénico (Madigan *et al* 1999 citada en Velásquez 2007). También se ha evaluado la bioactividad de extractos metanólicos frente a diversos

microorganismos responsables de algunas patologías (Hernández & Prieto 1999, citado por Velásquez 2007).

1.8. Descripción botánica de la especie *B. latifolia*

La especie *Baccharis latifolia* es un arbusto que alcanza una altura de 1.5 a 3 metros. Posee hojas simples alternas, con peciolo de 1,5 a 2 cm de largo, oblongo-lanceolada, de apice acuminado, base cuneiforme, uniformemente aserrada en la margen, (Velásquez 2007), de color verde brillante por el haz, pegajosas y con tres nervios pronunciados que salen desde la base. Las hojas sirven como una característica importante para diferenciarlas taxonómicamente (Hoyos y Yep 2008). Las ramas son delgadas, glabras y resinosas (Velásquez 2007). La inflorescencia es blanquecina paniculada, terminal y ramificada (Hoyos y Yep 2008), los capítulos son numerosos dispuestos en los ápices de las ramas. Su involucreo o umbrela es acampanado, las brácteas en tres o más hileras o series de borde hialino (Transparente) (Velásquez 2007). Presenta numerosas flores con corola filiforme; aquenios oblongos, vilano blancuzco de aproximadamente 1.2 mm de largo. Los frutos son de tipo aquenios de color café de 4 a 5 mm de longitud (Hoyos y Yep 2008) y glabros (Madigan *et al* 1999, Mendivil 1995 citado por Velásquez 2007).

1.9. Usos tradicionales de *B. latifolia*

1.9.1. Usos medicinales

Esta especie tiene importantes usos en la medicina tradicional, principalmente en los pueblos de América. Es usada en cocimiento, ya que tiene la virtud de reducir la inflamación de las articulaciones (Velásquez 2007; Hoyos y Yep 2008), también adormece los nervios y tendones, facilitando de este modo la reducción del hueso y/o aquellos huesos dislocados. Se utiliza también en infusión de las hojas para el dolor de estómago causado por el frío, además alivia las flatulencias. La cocción de hojas, tallos e inflorescencias es un tónico antidiabético y para enfermedades hepáticas. Se usan las hojas molidas en cataplasma para torceduras, luxaciones y hernias, pues son eficaces para desinflamar y fortificar las áreas afectadas. El cataplasma de hojas secas, molidas con grasa (formando una pomada) es útil para cicatrizar sin provocar infección, cerrar heridas. También como analgésico contra dolores reumáticos y de la cintura (Velásquez 2007).

1.9.2. Uso agroforestal

Esta especie es utilizada para la protección y conservación de los suelos, ya que tiene un sistema radicular denso y no largo, lo cual no genera competencia con otras plantas ni cultivos. Es útil como cercas vivas y/o cortinas rompevientos (Paredes 2002), por su fácil propagación y tolerancia a diferentes temperaturas. También es importante para la recuperación de suelos afectados por el sobrepastoreo. Su tallo es útil para usar como leña, ya que por contener sustancias resinosas puede generar fuego fácilmente, incluso a pesar de estar fresco (Reynel y León 1990; Brack 1999, citados por Hoyos y Yep 2008).

1.9.3. Uso industrial

En el área industrial, las hojas de *B. latifolia* son útiles para teñir de amarillo o verde (Hoyos y Yep 2008; Paredes 2002).

1.10. Estudios químicos y de actividad biológica de *B. latifolia*

Estudios realizados por diferentes investigadores, han reportado compuestos tales como flavonoides, alcaloides y compuestos triterpénicos y/o esteroidales (Hoyos y Yep 2008). Se han reportado compuestos como α -felandreno, canfeno (**26**) y óxido de cariofileno (**27**) aislados tanto en *B. latifolia* como de otras especies, como *B. salicifolia*, *B. paniculata*. Con *B. dranunculifolia* comparte compuestos como terpinen-4-ol (**24**) y gama-gurjunena (**28**) (Concha *et al.*, 2014). De extracciones a partir de raíz se han aislado cuatro compuestos: uno derivado de timol (**29**) y tres sesquiterpenos (germacreno D (**30**), escualeno (**31**) y un sesquiterpeno sustituido altamente oxigenado (**32**) (Velásquez 2007).

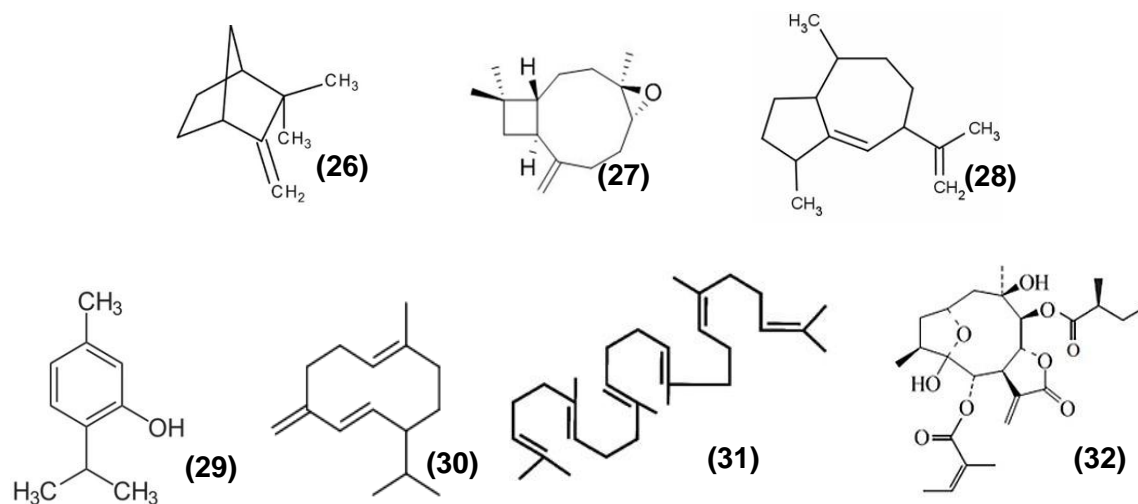


Figura 1.10. Compuestos aislados en *B. latifolia*.

1.11. El enfoque reciente en el estudio de los metabolitos secundarios: la metabolómica

La metabolómica es la ciencia más nueva de las “ómicas”, que forma parte de lo que se conoce como “genómica funcional” con la genómica, transcriptómica y proteómica (Filete y Frederich 2015). Se considera como el análisis exhaustivo tanto cualitativo como cuantitativo de todos los metabolitos secundarios (es decir, compuestos de bajo peso molecular) (Fiehn, 2001), en un sistema celular (tejidos, células (Goodacre *et al.*, 2004) y fluidos biológicos (Worley y Powers, 2013) en un estado de desarrollo específico, es decir proporcionar una visión global u holística) (Worley y Powers, 2013).

Los metabolitos son el producto final de todos los procesos celulares, de la actividad enzimática y de la proteína (Patel y Ahmed, 2015; Worley y Powers, 2013). Son entidades químicas (Goodacre *et al.*, 2004) que pueden ser analizadas mediante herramientas de análisis químico, tales como espectroscopia y espectrometría, las cuales se pueden acoplar a cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (Goodacre *et al.*, 2004). A pesar de ser técnicas relativamente nuevas se presentan algunas fluctuaciones inevitables en los datos espectrales, pues cambios en la posición del pico o anchura del mismo causados por la inestabilidad del instrumento o al momento de la alineación, provocan variación/alteración en los resultados. Además la presencia de metabolitos desconocidos dificulta el análisis y la interpretación del metaboloma (Worley y Powers 2013). Esa búsqueda y análisis global trae consigo una alta cantidad de información por lo que se requiere de formas especializadas de análisis de datos. El análisis multivariado, como análisis de componentes principales (PCA) y regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), ayuda a la labor de reducción, separación e identificación para su posterior análisis (Worley y Powers 2013).

El análisis metabolómico consiste en identificar los cambios en el metaboloma; estos cambios se deben a causas internas o externas (Filete y Frederich 2015). Una causa interna puede estar correlacionada con variaciones genéticas, pero aún con mayor influencia las causas externas pueden ocasionar la alta variabilidad de metabolitos producidos, tales como diferentes condiciones de conservación (Filete y Frederich 2015), condiciones del suelo, el estrés al que se deben exponer, la competencia y ambiente que la rodea, la radiación, entre otras.

La metabolómica ha demostrado tener ventajas y aportes únicos al igual que las demás ciencias ómicas (Goodacre *et al.*, 2004). Por ejemplo, tiene un potencial importante en la

investigación farmacéutica y clínica así como el aporte de biomarcadores que pueden servir como indicadores en el avance o estado de una enfermedad, también la reacción y progreso de esta frente a una terapia. También han facilitado el desarrollo de medicamentos nuevos o tratamientos (Goodacre *et al.*, 2004; Filete y Frederich, 2015; Puchades y Pineda, 2015).

1.12. Red de Investigación en Productos Naturales contra Enfermedades Desatendidas (Research Network Natural Products Against Neglected Diseases – ResNet NPND)

El Instituto de Biología Farmacéutica y Fitoquímica (IPBP) de la Universidad de Muenster, en Alemania, mantiene una iniciativa de investigación en productos naturales con el fin de descubrir compuestos activos como alternativa terapéutica para el control de los parásitos/patógenos responsables de enfermedades desatendidas u olvidadas, mediante la conformación y puesta en marcha de la Red de Investigación de Productos Naturales contra Enfermedades Desatendidas (Research Initiative on Natural Products against Neglected Diseases, ResNetNPND), del cual el Grupo Integrado de Investigación en Química y Biología (InQuiBio) hace parte desde 2014, y el presente trabajo corresponde a un aporte a la mencionada Red, en el estudio, basado en *lead finding*, de una especie de la familia Asteraceae (*B. latifolia*), dado que uno de los objetivos de esta red comprende el estudio de compuestos naturales bioactivos obtenidos de extractos de especies de la familia Asteraceae a nivel mundial (Nour *et al.*, 2009). Por esta razón, se consideró realizar un estudio holístico basado en herramientas metabolómicas, con el fin de analizar los perfiles metabólicos y así establecer cuántos metabolitos secundarios podrían encontrarse y cómo pueden variar a lo largo de las diferentes accesiones de la especie *Baccharis latifolia*, y así aportar más datos que contribuyan a los propósitos de la Red ResNet NPND.



1.13. Referencias

- ✚ Abad, M., Bermejo, P. 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7, pp. 76-96.
- ✚ Abreu, G., Cuéllar, C. 2008. Estrategias en la selección de las plantas medicinales. *Rev. Cubana Planta Medica*, 13, 3.

- # Anzenbacher, P., Zanger. 2012. Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics. Ed. John Wiley & Sons, pp. 543-550.
- # Bedascarrasbure, E. Maldonado, L. Álvarez, A. Rodríguez, E. 2004. Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propóleos Argentino. Acta Farmacéutica Bonaerense, 23, 3, pp. 369-372.
- # Cabrera, A., Crisci, J., Delucchi, G., Freire, S., Giuliano, D., Iharlegui, L., Katinas, L., Saenz, A., Sancho, G., Urtubey, E. 2000. Catalogo Ilustrado De Las Compuestas (=Asteraceae) de la Provincia De Buenos Aires. Argentina: Sistemática, Ecología y Usos.
- # Carrere, R. 2009. La Chirca Blanca (*Baccharis dracunculifolia*): Aromática, melífera, medicinal, ornamental y útil para la ecología, pp. 20-21.
- # Cardoso, A., Villarreal, L. 2007. Estudio metabólico-farmacológico *in silico* de poblaciones de la Planta ansiolítica y sedante *galphimia glauca*. Centro de investigación en biotecnología, universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- # Concha, J., Gaston, C., Hernández, V. 2014. Essential oil composition of *Baccharis linearis* (Ruiz & Pav.) and *Baccharis paniculata* DC. Leaves from Chile. American Journal of Essential Oils Natural Products. 1, 4, pp. 6-8.
- # Cuatrecasas, J. 1968. Notas adicionales, Taxonómicas y Corológicas, sobre *Baccharis*. Rev. Academia Colombiana de Ciencias 13, 50, pp. 201- 226.
- # Daniel, M. 2006. Medicinal Plants: Chemistry and Properties. Science Publishers.
- # Delbon, N., Cosa, M.T., Bernardello, G. 2012. Exmorfoloía y anatomía de órganos vegetativos aéreos en especies de *Flourensia* DC. (Asteraceae) con importancia fitoquímica. Acta Botánica Brasileira. 26, 1.
- # Díaz, P. 1989 Origen y desarrollo de la sinanterología en Colombia. Rev. Académica Colombiana de Ciencias. 17, 65, pp. 189-206.
- # Fiehn, O. 2001. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. Comparative and Functional Genomics, 2, pp. 155-168.
- # Filete, M., Frederich, M. 2015. The emergence of metabolomics as a key discipline in the drug discovery process. Drug Discovery Today: Technologies, 28.
- # Freire, S., Urtubey, E., Giuliano, D. 2007 Epidermal Characters of *Baccharis* (Asteraceae) Species used in Traditional Medicine. Caldasia, 29, 1, pp 23-38.

- # Funk, V., Susanna, A., Stuessy, T. y Robinson, H. 2009. Classification of Compositae. Systematics, evolution and biogeography of the Compositae. Vienna, pp. 171-189.
- # García, C., González, A., Villaseñor, J. 2014. La familia Asteraceae en el parque Nacional Los Mármoles, Hidalgo, México. Acta Botánica Mexicana, 106, pp. 97-116.
- # Giraldo, M., Escobar, J., Taborda, N. 2012. Introducción a la Industria de los Aceites Esenciales de plantas Medicinales y aromáticas. Centro de Gestion de Mercados, Logistica y TIC's.
- # Grecco, S., Reimao, J., Tempone, A., Sartorelli, P., Cunha, R., Romoff, P., Ferreira, M., Favero, O., Lago, H. 2012. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). Experimental Parasitology. 130, 2, pp.141-145.
- # Guiliano, D. 2001. Clasificación infragenérica de las especies Argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). Darwiniana, 39, pp 131 -154.
- # Hoyos, M y Yep, M. 2008. Diseño de una formulación de aplicación tópica a base de *Baccharis latifolia* (Chilca), con efecto antiinflamatorio. Tesis para obtener título de Químico Farmacéutico. U. Nacional Mayor de San Marcos. Lima- Perú.
- # Jasinski, V., Silva, R., Pontarolo, R., Budel, J., Campos, F. 2014. Morpho-anatomical characteristics of *Baccharis glaziovii* in support of its pharmacobotany. Rev. Brasileira de Farmacognosia 24, 6, pp. 609-616.
- # Katinas, L., Gutiérrez, D., Grossi, M., Crisci, J. 2007. Panorama de la familia Asteraceae (= Compositae) en la República Argentina. Boletín de la Sociedad de Argentina de Botánica, 42 pp. 1-2.
- # Kurdelas, R., Lima, B., Tapia, A., Feresin, G., Gonzalez, M., Rodríguez, M., Zacchino, S., Enriz, R., Freile, M. 2010. Antifungal Activity of Extracts and Prenylated Coumarins Isolated from *Baccharis darwinii* Hook & Arn. (Asteraceae). Molecules, 15, pp. 4898-4907.
- # Laboratorio de Sistemática de plantas vasculares 2013. Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales. Consultado el 25 de febrero del 2015 en http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/asteraceae.html.
- # Lonni, A., Scarminio, L., Silva, L., Ferreira, D. 2003. Differentiation of Species of the *Baccharis* Genus by HPLC and Chemometric Methods. Analytical Sciences. 19, pp 1013- 1017.

- ✚ Lonni, A., Scarminio, L., Silva, L., Ferreira, D. 2005. Numeral Taxonomy Characterization of *Baccharis* Genus Species by Ultraviolet- Visible Spectrophotometry. *Analytical Sciences*. 21, pp 235- 239.
- ✚ Martínez, S., Terraza, E., Álvarez, T., Manani, O., Vila, J., Mollinedo, P. 2010. Actividad Antifúngica *in Vitro* de Extractos Polares de Plantas del Género *Baccharis* Sobre Fitopatogenos. *Rev. Boliviana De Química*, 27, 1.
- ✚ Molares, S., Gonzales, B., Ladio, A., Agueda, M. 2009. Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. et Arn. (Asteraceae: Astereae). *Acta Botánica Brasileira*, 23, 2, pp. 578-589.
- ✚ Nour, A.M.M., Khalid, S.A. Brun, R., Kaiser, M., Schmidt, T.J. 2009. The antiprotozoal activity of sixteen Asteraceae species native to Sudan and bioactivity-guided isolation of xanthanolides from *Xanthium brasiliicum*. *Planta Médica*. 75, pp. 1363-1368.
- ✚ Oliva, R., Raimundo, F., Valdés, B. 2003. Especies ornamentales de la familia Asteraceae cultivadas en las áreas verdes de Sicilia occidental. *Lagascalía* 23, pp. 75-84.
- ✚ Paredes, B. 2002. Análisis y obtención de colorante natural a partir de la *Baccharis latifolia* (Chilca). Trabajo de tesis para obtener título de ingeniero textil. Universidad Técnica del Norte. Ibarra- Ecuador.
- ✚ Patel, S., Ahmed, S. 2015. Emerging field of metabolomics: Big promise for cancer biomarker identification and drug discovery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 107, 25, pp. 63-74.
- ✚ Pires, P. y Becker, S. 2010. Actividade antimicrobiana dos extractos *Baccharis dracunculifolia* D.C (Asteraceae). *Sabios- Revista de Saúde e Biologia*. 5:2- pp.1-6.
- ✚ Puchades, L., Pineda, A. 2015. Metabolomics in pharmaceutical research and development. *Current Opinion in Biotechnology*, 35, pp. 73-77.
- ✚ Raymond, K. 2009. Nutrition and Diet Research Progress: Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources. Nova Science Publishers, Inc. pp. 1-3.
- ✚ Redonda, R. y Villaseñor, J. 2011. Flora del Valle de Tehuacan- Cuicatlan. Departamento de Botanica. Instituto de Biología, UNAM. pp. 1-2.
- ✚ Singh, A. 2006. Compendia of Medicinal Plants of the World. Science Publishers. pp. 89-90.

- ✚ Tapia, A., Rodríguez, J., Theoduloz, C., Lopez, S., Egly, G., Schameda, G. 2004. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology*. 95, 2, pp 155-161.
- ✚ Tapia, M. 2010. La familia Asteraceae. Herbario, Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mexico. pp. 183.
- ✚ Troiani, H. 1985. Las especies de *Baccharis* (Compositae) de la provincial de la Pampa. *Rev. Facultad de Agronomía Universidad Nacional de la Pampa*. 1, pp. 1-2.
- ✚ Velásquez, A. 2007. Actividad Antimicrobiana de Extractos de *Franseria artemisioides*, *Rumex palistris*, *Baccharis latifolia*, *Cestrum parqui* y *Piper asterifolium* Frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*. Universidad Mayor de Sna Andres. Facultad de Ciencias Farmaceuticas y Bioquímicas. La paz –Bolivia.
- ✚ Verdi, G., Brighente, C, Pizzolatti, G. 2005. Género *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, económicos e biológicos. *Nova* [online], 28, 1, pp. 85-94.
- ✚ Watson, L. y Dallwitz, MJ 1992. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval.
- ✚ Worley, B., Powers, R. 2013. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*, 1, pp. 92-107.
- ✚ Wiersema, J. y León, B. 2013. *World Economic Plants*. Second Edition. CRC Press. pp. 341.
- ✚ Zhu, S., Chen, Y., Yousheng, C., Yourun, L., Shangwu, L., Xuejun, G., Tiangang, G., Shixin, Z., Ying, L., Quiner, Y., Humphries, C., Raab, E., Gilbert, M., Nordenstam, B., Kilian, N., Brouillet, L., Illarionova, I., Hind, N., Jeffrey, C., Bayer, R., Kirschner, J., Greuter, W., Anderberg, A., Semple, J., Stepanek, J., Freire, S., Martins, L., Koyama, H., Kawahara, T., Viincent, L., Sukhorukov, A., Mavrodiev, E., Gottschlich, G. 2011. Asteraceae (Compositae). Consultado el 25 de febrero en <http://www.eflora.cn/foc/pdf/Asteraceae.pdf>.

CAPÍTULO 2

CUANTIFICACIÓN TOTAL DE FENOLES Y FLAVONOIDES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ACCESIONES DE *B. latifolia* (ASTERACEAE)

2.1 Introducción

Las plantas son una fuente importante de sustancias naturales que han servido de base para el desarrollo de nuevas entidades químicas para usos terapéuticos. En los últimos años se han estudiado gran cantidad de plantas con el fin de cuantificar los contenidos de fenoles y flavonoides, así como conocer su actividad y capacidad antioxidante (Parejo *et al.*, 2003). Estos compuestos fenólicos se distribuyen ampliamente por todo el reino vegetal (Anttonen y Karjalainen, 2005; Lasheras *et al.*, 2000), y aparte de ello son considerados como componentes fitoquímicos que promueven la salud (Duthie *et al.*, 2000). Se ha demostrado además que presentan propiedades anticancerígenas, antivirales, antiinflamatorias y vasodilatadores (Bedascarrasbure *et al.* 2004; Duthie *et al.*, 2000; Mattila y Hellstrom, 2006).

Los fenoles y flavonoides se sintetizan en las plantas como parte del metabolismo secundario y se involucran en varios procesos de ellas, como lo es la interacción planta-patógeno, polinización, respuesta al estrés ambiental, detección de la luz (radiación UV), alelopatía, traducción de señales, reproducción sexual y fertilidad (Brown *et al.*, 2001; Croteau *et al.*, 2000; Winkel-Shirley 2001a, 2001b). En este sentido, más de 8.000 compuestos fenólicos han sido identificados en materiales vegetales (Luthria *et al.*, 2006).

La familia de las compuestas (Asteraceae) es reconocida por el hombre como plantas alimenticias y/o medicinales (Cabrera *et al.*, 2000). En muchas especies de la familia Asteraceae es común la presencia de estructuras secretoras como conductos, cavidades y tricomas de diferentes tipos. Sus secreciones pueden contener diferentes compuestos químicos, entre ellos los compuestos fenólicos, lo que les confiere un gran valor fitoquímico (Fahn 1979 y Evert 2006 citados por Delbon, 2012). Este valor se debe a la presencia de estos compuestos con actividad antioxidante debido a la presencia de los grupos hidroxilo fenólicos (Muñoz y Ramos 2007). Motivo por el cual se evaluaron estos compuestos en esta especie de la familia Asteraceae.

En el género *Baccharis* se han llegado a aislar más de 150 moléculas, generalmente con interés químico o farmacológico. *Baccharis* ha sido estudiada desde principios de 1900,

debido a sus propiedades medicinales en varias de sus especies (Abad y Bermejo 2007; Parejo *et al.*, 2003), donde se han encontrado varios compuestos tales como terpenoides, tricotecenos y flavonoides (Bohlamn *et. al.*, 1979, Labbe *et al.*, 1986, Jarvis *et al.*, 1991 y Zdero *et al.*, 1989 citados por Grecco *et al.*, 2012; Gonzaga *et al.*, 2005).

La especie *Baccharis latifolia* a pesar de ser abundante en diferentes regiones de Colombia (según datos del Herbario Nacional Colombiano) y conocida como alternativa terapéutica en la medicina tradicional, no dispone de información sobre los componentes fenólicos y su capacidad antioxidante. Por consiguiente, el presente trabajo será pionero en generar este tipo de información con el perfil químico de diferentes accesiones de *B. latifolia* y de un espécimen de *B. macrantha*.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Selección del material vegetal

La especie objeto de estudio fue seleccionada luego de una búsqueda detallada de la información registrada en el Herbario Nacional Colombiano sobre el levantamiento de la familia Asteraceae. Se tuvieron en cuenta algunos criterios de selección como la abundancia en la sabana de Bogotá, su reconocimiento como planta medicinal tradicional y la ausencia de estudios similares

2.2.2 Recolección y clasificación del material vegetal

Se colectaron 20 individuos en total. El muestreo se realizó en diferentes zonas de la sabana de Bogotá. Se registraron los órganos obtenidos (hojas, tallo, flores y frutos). Un espécimen testigo de cada material fue registrado en el Herbario Nacional Colombiano para su debida clasificación. En la tabla 2.1 se observa las partes colectadas de cada muestra, nombre de la especie clasificada y lugar de colecta.

Tabla 2.1 Datos de muestras seleccionadas para estudio

Especie de planta	N° muestra	Partes usadas	Lugar	Norte	oeste
<i>Baccharis macrantha</i>	BM 1	Hojas, tallos, flor	Campus UMNG	04° 55' 15,1"	74° 00' 33,6"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 2	Hojas, tallos, flor	Monserate bajo	04° 36' 48,8"	74° 03' 34,9"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 3	Hojas, tallos, flor, fruto	Monserate medio	04° 36' 46,5"	74° 03' 32,3"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 4	Hojas, tallos, flor, fruto	Monserate medio	04° 36' 46,8"	74° 03' 30,4"

Tabla 2.1 (cont.) Datos de muestras seleccionadas para estudio

Especie de planta	N° muestra	Partes usadas	Lugar	Norte	oeste
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 5	Hojas, tallos, flor, fruto	Monserate alto	04° 36' 38,9"	74° 03' 34,3"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 6	Hoja, tallos	Quebrada Honda Represa	05° 05' 36,4"	73° 37' 07,0"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 7	Hoja, tallo, flor	Regadera Zipaquira-	04° 24' 02,4"	74° 08' 11,6"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 8	Hoja, tallos	Cajica	04° 58' 24,4"	74° 00' 13,5"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 9	Hojas, tallos, flor, fruto	La conejera	04° 45' 39"	74° 04' 35"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 10	Hojas, tallos, flor	Cruz Grande Briceño-	05° 05' 09,2"	73° 37' 17,1"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 11	Hoja, tallo	Zipaquirá	04° 58' 13,8"	73° 57' 56,8"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 12	Hoja, tallo	Peaje Albarracín	05° 17' 57,0"	73° 34' 57,8"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 13	Hoja, tallo, fruto	Samacá alto	05° 28' 56,5"	73° 28' 09,5"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 14	Hoja, tallo	Entrada Samaca	05° 33' 02,3"	73° 26' 04,2"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 15	Hoja, tallos, flor	Puente Boyacá	05° 26' 21,9"	73° 26' 25,7"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 16	Hoja, tallo	Sisga Cajica-	05° 05' 24,2"	73° 43' 16,4"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 17	Hoja, tallos, flor	Autonorte	04° 55' 15,1"	74° 00' 04,0"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 19	Hoja, tallos, flor	Entrada Sopo Villapinzón-	04° 56' 20,0"	73° 57' 33,7"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 19	Hoja, tallos, flor	Tunja	05° 17' 57,0"	73° 34' 57,8"
<i>Baccharis latifolia</i>	BL 20	Hoja, tallos, flor	colina rural	4° 44' 8"	74° 04' 3"

2.2.3 Preparación de extractos

Se dejaron secar las muestras vegetales. Se molió por separado cada una de las partes de la planta. Los extractos crudos también por separado se mezclaron con 100 g de hojas, tallos, flores, y frutos secos y se pusieron en contacto con etanol al 96% en proporción 1:1,5 v/v, durante una semana, agitándose diariamente. Se utilizó etanol porque los compuestos alcohólicos rompen la membrana celular y así se logra extraer grandes cantidades de material endocelular, además de ser un disolvente que puede solubilizar un amplio rango de metabolitos. Pasado el tiempo, la mezcla fue sometida a destilación a presión reducida para separar el disolvente de los compuestos solubles en etanol, obteniendo así el extracto etanólico crudo (Colegate & Molyneaux, 2008). De cada extracto

etanólico crudo se pesaron 25 mg, se disolvieron en etanol, se transfirieron a un balón aforado de 10 mL y se llevó a volumen con etanol; a esta disolución se denominó “disolución problema inicial”. Se determinaron las diluciones apropiadas para la cuantificación de fenoles y flavonoides con el fin de ajustar a la ley de Lambert-Beer. Los extractos analizados fueron denominados, para *B. macrantha* (identificado con color verde en las gráficas) **BM H (Hojas), BM T (Tallos), BM F (Flor)**; y *B. latifolia* **BL (Hojas), BL (Tallos), BL F (Flor), BL (Fruto)**, acompañado del número de la accesión de acuerdo a la Tabla No 2.1.

2.2.4 Determinación del contenido de fenoles totales

El contenido total de fenoles se midió utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965 citado por Netzel, et al, 2007). En una celda para espectrofotómetro se tomó la alícuota de cada dilución apropiada, obtenida en el anterior numeral, con 400 μ L del reactivo de Folin Ciocalteu y se dejó reposando durante 3 min, posteriormente se agregó 1500 μ L de Na_2CO_3 al 7,35 %. La mezcla se agitó y se midió la absorbancia a 765 nm después de permanecer en la oscuridad durante 2 horas. Cada medición se realizó con tres réplicas. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de extracto seco (mg GAE / 100 g ES, utilizando una curva de calibración de ácido gálico).

2.2.5 Determinación del contenido de flavonoides totales

Para evaluar el contenido total de flavonoides se utilizó el método de acomplejamiento con tricloruro de aluminio AlCl_3 . Se tomó una alícuota de la dilución apropiada obtenida en el numeral 2.2.3 del presente capítulo y se llevó a un volumen de 1000 μ l con etanol, además se agregó 800 μ L de etanol, 150 μ L de disolución de AlCl_3 y 150 μ L de disolución de acetato de sodio (0.1 M), se agitó y se dejó en oscuridad durante 40 min. Posteriormente se leyó la absorbancia a 420 nm. Cada medición se realizó con tres réplicas. Los resultados se expresaron como mg equivalentes a quercetina por 100 g de extracto seco (mg QE / 100 g ES).

2.2.6 FRAP (Ferric reducing/antioxidant power assay)

El ensayo FRAP se realizó de acuerdo a Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones. El reactivo FRAP se preparó mezclando 25 mL de Buffer pH 3.5 con 25 mL de FeCl_3 20mM y 2,5 mL de TPTZ 10 mM el cual se incubo a 37 ° C en oscuridad por 30 minutos. Éste reactivo es estable por corto tiempo. En celdas para espectrofotometría se tomó la alícuota de cada dilución apropiada, obtenida en el numeral 2.2.3 y se completó a

volumen con etanol, se adicionó 1900 μL del reactivo FRAP recién preparado y se dejó a 37°C por 30 minutos en oscuridad. Luego se leyó la absorbancia a 593 nm y se determinó los equivalentes de Trolox mediante la curva de calibración. Cada medida tuvo tres réplicas. Los resultados se expresaron como μM Trolox / g de material fresco.

2.2.7 Captura del Radical libre DPPH[•] (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging)

El ensayo de DPPH fue realizado de acuerdo con el método de Brand et al. 1995 con algunas modificaciones. En celdas de espectrofotometría se agregó 25 μL , 50 μL , 100 μL , 150 μL , 200 μL de la solución trabajo, se llevó a un volumen de 200 μL con etanol, y posteriormente se adicionó 1950 μL de DPPH 10 mM. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora antes de medir su absorbancia a 515 nm. Se utilizó etanol como blanco. Cada medida tuvo tres réplicas. Mediante el programa GraphPad 5.0, se construyeron las curvas dosis-respuesta y, mediante una regresión no lineal, se calcularon las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) en $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.2.8 Análisis Estadístico

Los resultados de actividad antioxidante y de cuantificación se compararon por separado entre medias con sus réplicas para cada tipo de análisis. Para ello, inicialmente se realizó la prueba de Shapiro-Wilks para determinar si los valores evaluados presentan una distribución normal y de esta manera posibilitar la realización de la prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de TUKEY, con el fin de determinar si hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variables respuesta evaluadas. Finalmente, se realizó una gráfica de correlación con los datos obtenidos en la cuantificación y capacidad antioxidante y se obtuvieron los coeficientes de correlación de Pearson. Para estos análisis se usó el software estadístico Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), licencia estudiantil.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Selección del material vegetal

De acuerdo a la búsqueda virtual realizada sobre la información relacionada al levantamiento de especies de la familia Asteraceae en Cundinamarca (ver diagrama de distribución frecuencias, figura 2.1), la especie con mayores registros de la Familia Asteraceae en Cundinamarca fue *Espeletia grandiflora*, con un registro de 29 levantamientos. Sin embargo, no se seleccionó como especie objeto de estudio dado que

ya existe bibliografía al respecto. En el segundo lugar se encontró la especie *Baccharis latifolia*, con 26 reportes de levantamientos. La falta de estudios metabólicos y su potencial como aporte científico a la ResNetNPND (nombrada en el anterior capítulo), fue lo que impulsó el hecho de tomarla como objeto de estudio.

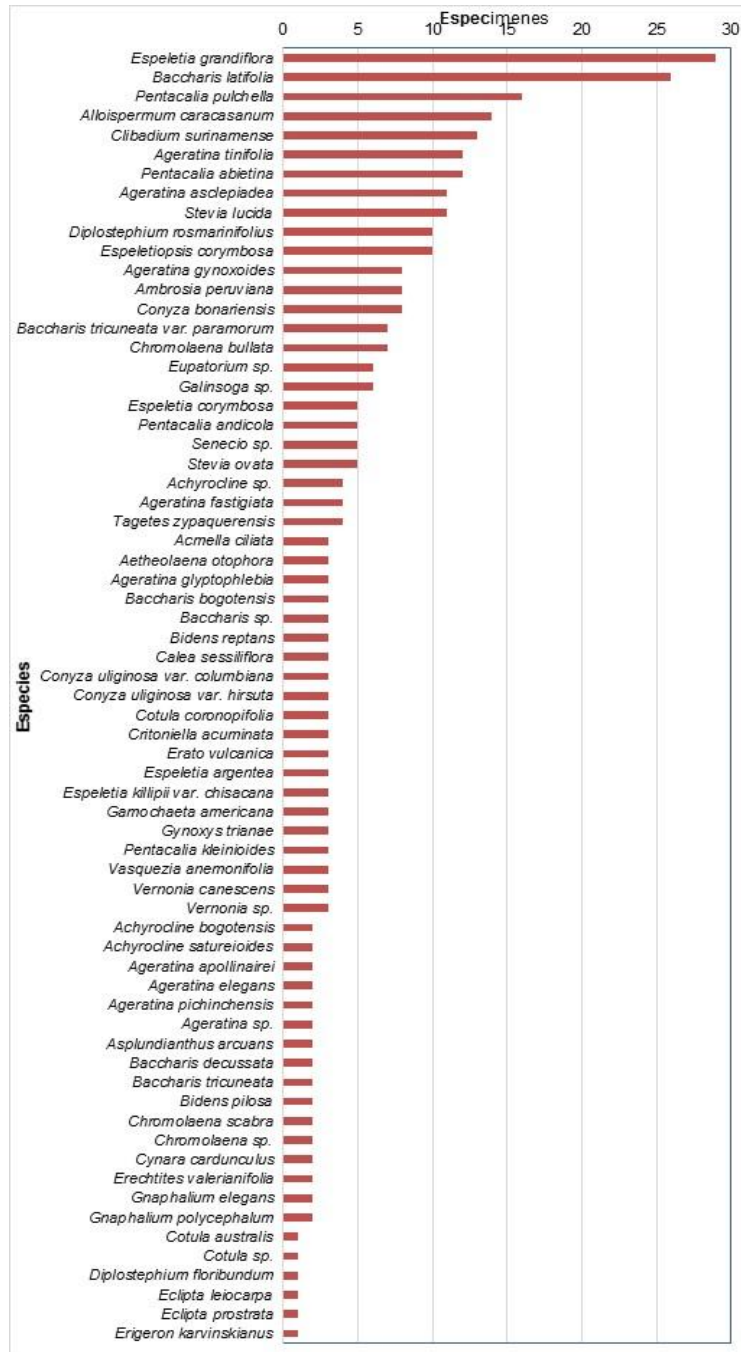


Figura 2.1. Estudio de población en Cundinamarca de la familia Asteraceae según registros en el Herbario Nacional Colombiano (<http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/>).

2.3.2 Contenido total de fenoles

El contenido total de fenoles en extractos de hoja (Fig. 2.2A) de *B. latifolia* y *B. macrantha* estuvo entre 80,1 y 522,4 mg de ácido gálico / g de extracto seco (ES). Mediante un análisis estadístico ANOVA se encontró que existen diferencias significativas ($p < 2e^{-16}$) entre los extractos. La máxima concentración corresponde a **H1** con $513,1 \pm 14,1$ mg EAG/g ES correspondiente a *B. macrantha*. Entre los extractos de *B. latifolia*, la mayor concentración fue de **H4** seguido por **H18** con $283,4 \pm 22,4$ y $276,2 \pm 17,8$ mg EAG/g ES, respectivamente, los cuales son significativamente similares según el test Tukey; la concentración más baja en fenoles fue de **H2** con $81,3 \pm 3,5$ mg EAG/g ES.

En cuanto al contenido total de fenoles en extractos de tallo (Fig 2.2B), la mayor concentración corresponde a **T1** con $332,3 \pm 14,1$ mg EAG/g ES, seguido por **T10** con $309,7 \pm 11,3$ según el test Tukey estas dos muestras comparten similitudes. El análisis estadístico ANOVA arrojó que existen diferencias significativas entre las muestras ($p < 2e^{-16}$). La concentración más baja correspondió a **T8** y **T12** con $60,0 \pm 3,60$ y $90,6 \pm 4,6$ mg EAG/g ES, respectivamente, y presentan similitud según el test Tukey.

En la concentración fenólica de los frutos (Fig. 2.2C) se descartó de los análisis estadísticos el extracto **Fr9** por ser un dato atípico, con $6140,4 \pm 416,8$ mg EAG/g ES. Además, **Fr4** con $476,7 \pm 12,4$ mg EAG/g ES fue la muestra con mayor concentración de fenoles, mientras que **Fr13** fue la que menos concentración de fenoles tiene con $121,8 \pm 10,3$ EAG/g ES. El análisis estadístico ANOVA arrojó diferencias significativas entre las muestras ($p < 3.75e^{-09}$).

Finalmente, el análisis del contenido total de fenoles en flores (Fig. 2.2D) estuvo entre 477,8 y 62,8 mg EAG/g ES, siendo el mayor **F4** con $482,7 \pm 47,7$ mg EAG/g ES. El extracto con menos concentración de fenoles es **F20** con un $65,5 \pm 4,8$ mg EAG/g ES. El análisis estadístico ANOVA arrojó diferencias significativas entre las muestras ($p < 2e^{-16}$).

Brighente *et al.*, (2007) reportó que el contenido total de fenoles en las hojas de *B. illinita* DC y *B. platypoda* DC fue de $351,9 \pm 1,48$ y $149,13 \pm 3,91$ mg EAG/g de ES, respetivamente. Este rango fue superado por **H1** con $513,1 \pm 14,1$ mg EAG/g de ES, lo cual indica que las hojas de *B. macrantha* presentan un alto contenido de fenoles en comparación con lo reportado en bibliografía para especies del género *Baccharis* y lo encontrado en *B. latifolia*. El contenido total de fenoles en tallos de *B. illinita* DC fue de $230,98 \pm 1,48$ mg EAG/g de ES y *B. platypoda* DC con $127.63 \pm 1,49$ mg EAG/g de ES, cifras superadas por **T1** y **T10**. En

cuanto al contenido de fenoles en flores solo se reportó a *B. illinita* con $188,15 \pm 2,63$ mg EAG/g de ES, datos superados por **Fr9** y **Fr4**.

De igual manera Guimaraes *et al.*, (2012) reportó que las hojas de *B. dracunculifolia* tienen un $21,18 \pm 0,156$ mg EAG/g de ES, valores mucho menores a los encontrados en las especies objeto de estudio. No se encontraron registros reportados de cuantificación de fenoles en frutos en especies de *Baccharis*.

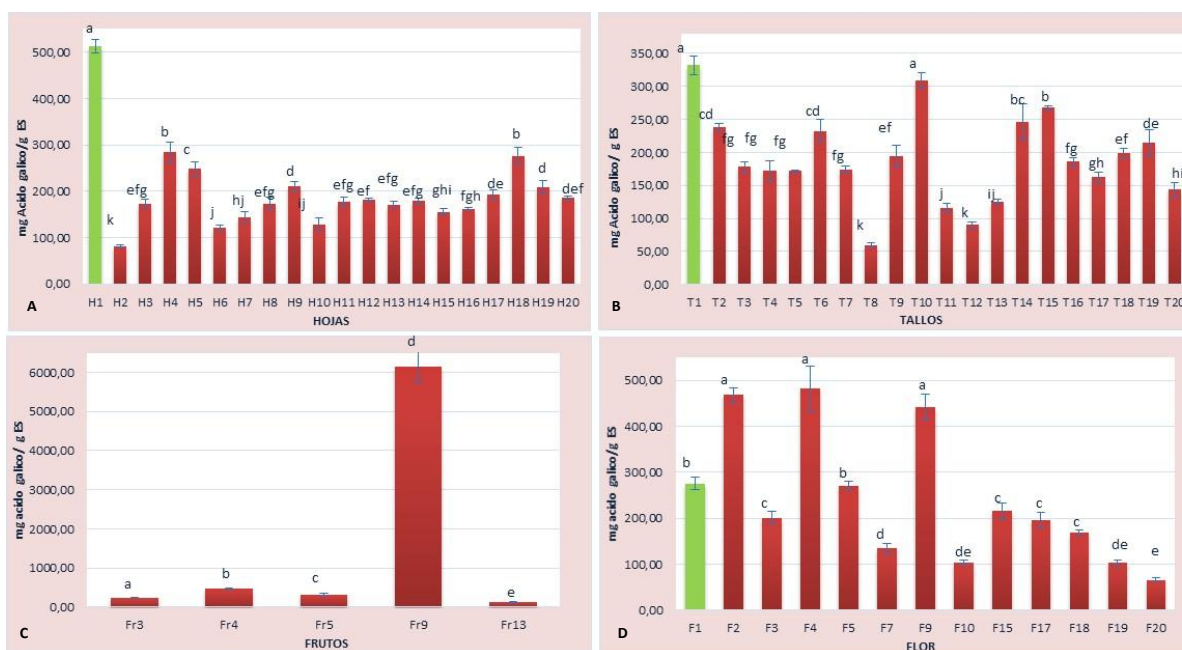


Fig. 2.2. Contenido total de fenoles A: hojas; B: tallos; C: frutos; D: flores. BM (color verde). Media \pm intervalo de confianza. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, según el Test de Tukey.

2.3.3 Contenido de flavonoides totales

En cuanto a la concentración total de flavonoides en hojas (Fig. 2.3A) de BM y BL estuvo entre 21,2 y 199,9 mg EQ / g de extracto seco (ES). La muestra con mayor contenido de flavonoides fue **H20** con $192,4 \pm 17,8$ mg EQ / g de ES, mientras que la de menor concentración fue **H19** con $21,8 \pm 1,0$ mg EQ / g de ES. El análisis estadístico ANOVA arrojó diferencias significativas entre las muestras ($p < 2e^{-16}$).

En las muestras de tallos (Fig. 2.3B), la mayor concentración tuvo lugar en **T18** y **T11** con $18,9 \pm 0,7$ y $20,4 \pm 0,9$ mg EQ / g de ES, respectivamente. El test de Tukey arrojó similitud entre estas dos muestras; en tanto las muestras con menor concentración fueron **T4** y **T12** con $7,8 \pm 0,5$ y $8,7 \pm 0,62$ mg EQ / g de ES, respectivamente, presentando similitud

según el test de Tukey. Se encontraron diferencias significativas entre las muestras según el análisis estadístico ANOVA ($p < 2e^{-16}$). En los frutos (Fig. 2.3C) evaluados se encontró que la mayor concentración fue de **Fr9** con $40,4 \pm 4,3$ mg EQ / g de ES, las demás muestras, **Fr3** con 6.6 mg EQ /g de ES, **Fr4** y **Fr5** con 6,7 mg EQ /g de ES y **Fr13** con 6.5 mg EQ /g de ES, además el test de Tukey arrojó similitud en estas cuatro muestras. Por lo tanto, se consideró a **Fr9** como un dato atípico dejándose por fuera del análisis estadístico. El análisis estadístico ANOVA sin **Fr9** arrojó diferencias significativas ($p < 3.29e^{-09}$).

En cuanto a las muestras de flor (Fig. 2.3D), el máximo contenido de flavonoides fue de **F2** con $49,2 \pm 2,0$ mg EQ / g de ES y el de menor contenido fue **F17** con $8,8 \pm 0,9$ mg EQ / g de MS. El análisis estadísticos ANOVA realizado también arrojó diferencias significativas ($p < 2e^{-16}$).

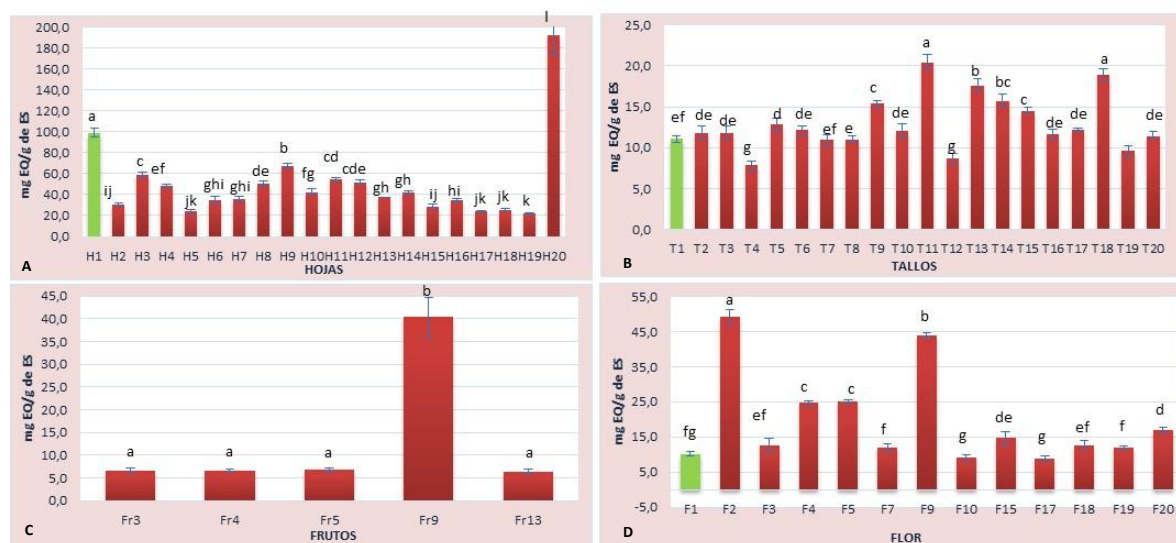


Fig. 2.3 Contenido total de flavonoides A: hojas; B: tallos; C: frutos; D: flores. BM (color verde). Media \pm intervalo de confianza. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, según el Test de Tukey.

Según reportes de Brighente *et al.*, (2007), *B. illinita* tiene un contenido total de flavonoides en sus hojas de $61,82 \pm 0,02$ mg EQ / g de ES, rango superado por los extractos **H20**, **H1** y **H9**; el contenido total de flavonoides en las flores de *B. illinita* fue de $53,10 \pm 0,10$ mg EQ / g de ES, dato superior a las muestras de BM y BL; en tallos el contenido total de flavonoides fue de $48,11 \pm 1,45$ mg EQ / g de ES, valor que supera a los datos de BM y BL. Sin embargo, en la especie *B. platypoda* del mismo estudio presentó en sus hojas un contenido total de flavonoides de $28,88 \pm 0,02$ mg EQ / g de ES, dato muy cercano al de **H15**

con $28,9 \pm 2,28$ mg EQ / g de ES, mientras que en los tallos presentó un $35,87 \pm 0,01$ mg EQ / g de ES, dato superior al de BM y BL. Según Guimaraes *et al.*, (2012), las hojas de *B. dracunculifolia* contienen $13,64 \pm 0,01$ mg EQ / g de ES, dato superado por todas las muestras de BM y BL.

2.3.4 FRAP (Ferric reducing/antioxidant power assay)

En cuanto a la capacidad antioxidante relativa al poder reductor (Fig. 2.4) se observa que hay una amplia gama en términos de capacidad antioxidante. Los valores oscilaron entre $1,7 \times 10^7$ y $1,7 \times 10^5$ uMTrolox/g ES correspondientes a **Fr9** y **H11**, respectivamente. Los frutos (Fig. 2.4 C) son la parte de la planta con mayor poder reductor, seguido por los extractos de flor y con menor poder reductor se encuentran las hojas y los tallos. En el análisis estadístico ANOVA se excluyó **Fr9** por ser un dato atípico y de esta manera las muestras mostraron normalidad según el test de Shapiro- Wilks. **Fr3** tiene el valor más alto dentro de los datos analizados estadísticamente con $8,4 \times 10^6 \pm 7,0 \times 10^4$ uMTrolox/g de ES, mientras que **Fr13** fue el extracto de frutos con menor capacidad antioxidante con $5,1 \times 10^6 \pm 6,0 \times 10^4$ uMTrolox/g de ES. El ANOVA arrojó diferencias significativas entre las muestras ($p < 4,23 \times 10^{-7}$).

En el caso de los extractos de flor (Fig. 2.4 D) se observa una capacidad reductora similar entre diez de los trece extractos evaluados (**Fr2**, **F3**, **F4**, **Fr5**, **Fr7**, **Fr9**, **Fr 10**, **Fr 15**, **Fr17** y **Fr18**), diferente sucede con **F1**, **F19** y **F20** que presentan la más baja capacidad con $1,7 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$, $9,7 \times 10^5 \pm 3,7 \times 10^4$ y $2,7 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$ uMTrolox/g de ES respectivamente El análisis estadístico ANOVA arrojó diferencias significativas entre las muestras ($p < 2 \times 10^{-16}$).

T2, **T3** y **T7** (Fig. 2.4 B) son los extractos de tallos con mayor poder reductor con $2,0 \times 10^6 \pm 4403$, $2,0 \times 10^6 \pm 61177$ y $2,0 \times 10^6 \pm 10993$ uMTrolox/g de ES. Estas tres muestras presentaron similaridad según el test de Tukey. En el caso de las hojas (Fig. 2.4 A), **H12** y **H16** fueron los extractos con mayor poder reductor con $2,0 \times 10^6 \pm 11604$ y $2,0 \times 10^6 \pm 18260$ uMTrolox/g de ES; según el test de Tukey, estas dos muestras comparten similitudes, mientras que **H11** obtuvo la más baja capacidad reductora de todas las muestras evaluadas. El análisis estadístico ANOVA arrojó diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).

De acuerdo a los datos encontrados por Ferreira *et al* (2014) para *B. trimera* ($1.080,01 \pm 196,34$ mM TE / L) mostró una capacidad reductora menor que BL y BM.

Mientras que *B. sessiliflora* se reportó que su capacidad antioxidante es de $675,9 \pm 6,3$ (mol de Fe (II) / g), superado por **Fr9** (Borneo *et al.*, 2009).

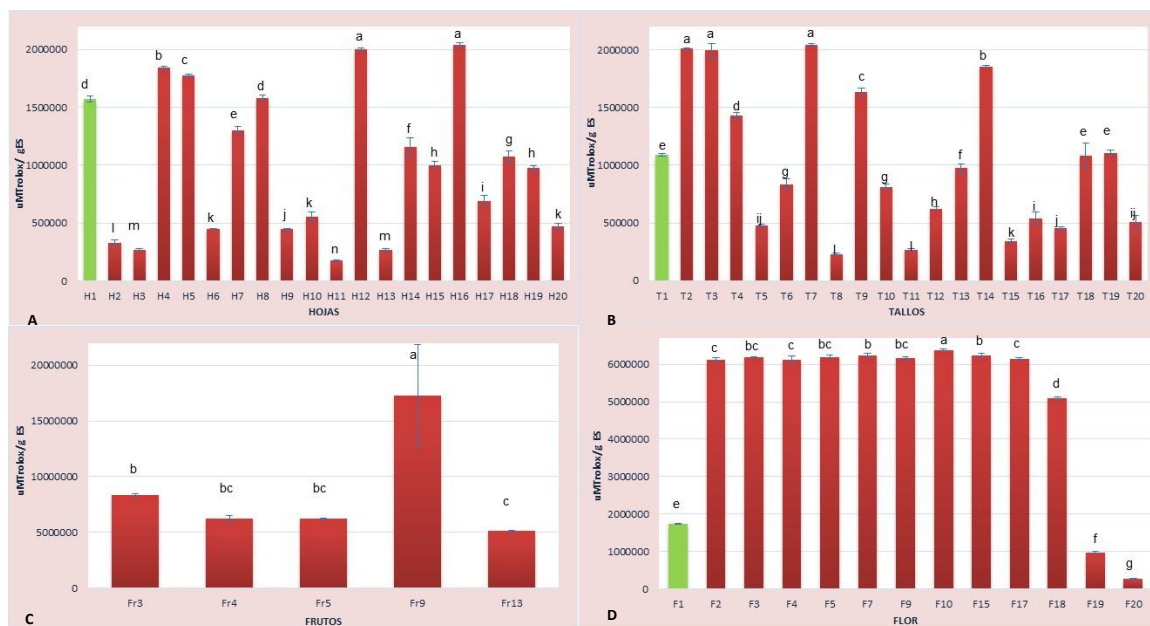


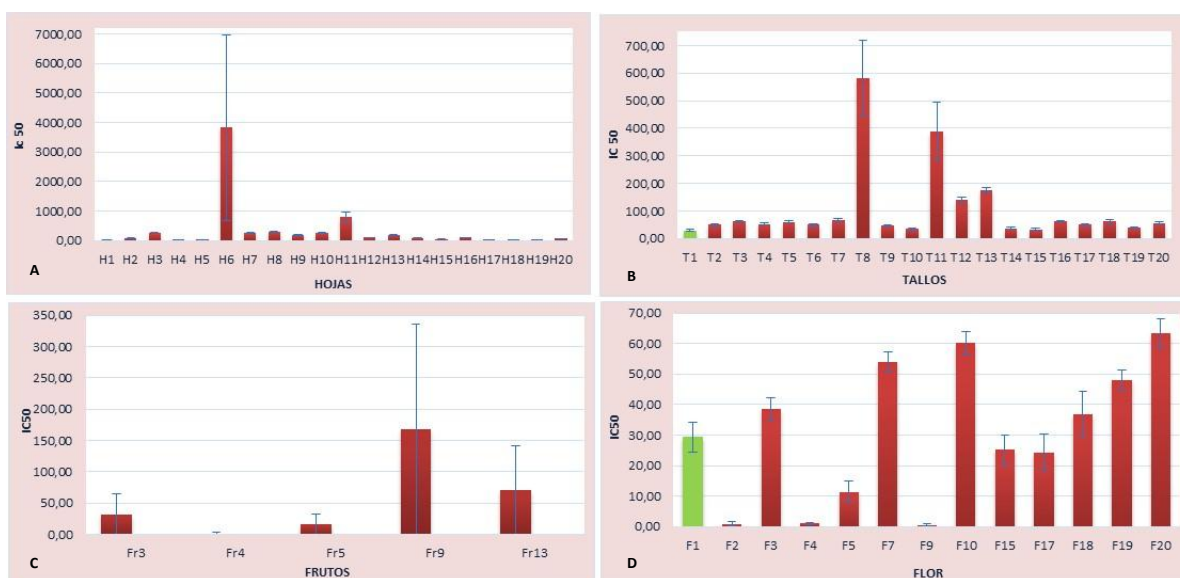
Fig. 2.4. Poder reductor (FRAP) A: hojas; B: tallos; C: frutos; D: flores. BM (color verde). Media \pm Intervalo de confianza. Letras distintas indican diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, según Test de Tukey

2.3.5 Captura de Radical libre DPPH^{*} (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging)

Para la capacidad antioxidante (Fig. 2.5), determinada por el método DPPH, se observó que los extractos obtenidos a partir de las flores son los más activos, con un promedio de $IC_{50}=30,27$ $\mu\text{g/mL}$, indicando que se requiere una concentración del antioxidante baja para inhibir el 50% de la población de radicales libres respecto a los demás órganos. Con valores intermedios están los frutos con un promedio de $IC_{50}= 57,77$ $\mu\text{g/mL}$; mientras que los tallos y las hojas presentaron la más baja capacidad con un promedio de $IC_{50}= 103,90$ y $181,26$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

No todas las muestras de la misma accesión presentaron igual actividad. En frutos (Fig.2.5D), por ejemplo, los valores IC_{50} variaron entre $63,27$ y $0,56$ $\mu\text{g/mL}$, siendo las muestras con mayor actividad **F2** y **F9** con $IC_{50}=0,56$ y $0,90$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, y con la menor capacidad de captación de radicales dentro de los frutos están las muestras **F20** y **F10** con $IC_{50}=63,27$ y $60,11$ $\mu\text{g/mL}$.

De igual modo, en los extractos de frutos (Fig. 2.5C), **Fr4** fue la muestra con mayor capacidad captadora con $IC_{50}=1,45 \mu\text{g/mL}$, seguido por **Fr5** con $IC_{50}=16,47 \mu\text{g/mL}$ y con la menor capacidad de inhibir radicales libres esta **Fr9** con un $IC_{50}=168 \mu\text{g/mL}$. Este último extracto igualmente presentó el mayor contenido de fenoles y flavonoides, lo cual se podría considerar como un indicativo que el tipo de fenoles y flavonoides presentes en *B. latifolia* no está relacionado con la capacidad de capturar radicales libres. En los extractos de tallos y hojas se observan algunas muestras con un alta capacidad de captura de radicales libres, como lo son **H1** y **T1** con $IC_{50}= 20,74$ y $29,90 \mu\text{g/mL}$; respectivamente, y **H18**, **T10** con $IC_{50}= 20,09$ y $35,17 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.



Sartor *et al.* 2013, evaluaron los compuestos fenólicos y las actividades biológicas de *B. dendata* en las cuatro estaciones, encontrando que la mayor concentración de compuestos fenólicos estaba en las plantas muestreadas en invierno, seguidas de otoño y verano, siendo la menor concentración encontrada en primavera por estar en la etapa de floración. En Colombia no se tienen estaciones, pero las plantas colectadas se tomaron en diferentes zonas donde se ven afectadas por la temperatura a la que se exponen, el ambiente que las rodea (ej., contaminación), por tanto esto pudo haber influenciado en los cambios de cantidad y capacidad de compuestos para cada uno de los extractos. Además, estos compuestos actúan como defensa de la planta contra la radiación UV (Brown *et al.*, 2001; Croteau *et al.*, 2000; Sartor *et al.*, 2013; Winkel-Shirley, 2001a, 2001b), lo cual lleva

a pensar que las muestras con mayor exposición solar, tendrán mayor contenido de compuestos fenólicos.

Las hojas presentaron mayor cantidad de fenoles y flavonoides que las demás partes de la planta estudiadas, pero la más baja en capacidad antioxidante (Ver Anexo tabla 2.1). Los compuestos fenólicos son ácidos débiles que actúan como donantes de hidrógeno, capaces de reaccionar con O_2^* a través de diferentes mecanismos, dependiendo de su naturaleza, y el número de los sustituyentes en el anillo fenólico (Rene *et al.*, 2010 citado por citado en Guimares *et al.*, 2012), así los fenoles se oxidan con facilidad y actúan como antioxidantes (Almanza 2004). Igualmente, los flavonoides presentan ciertas características para su actividad de captación de radicales libres, incluyendo la presencia de grupos hidroxilo en posiciones 3 y 5, también el doble enlace 2,3 conjugado con una función 4-oxo, así como el grupo di-OH en el anillo B (Soobratte *et al.*, 2005; Dorta *et al.*, 2008 y Rene *et al.* 2010 citados por Guimares *et al.*, 2012). La cantidad de fenoles y flavonoides cuantificados en flores y frutos fue baja a comparación de hojas y tallos, pero estos presentan compuestos con características estructurales que les confieren la capacidad de capturar radicales libres.

2.3.6 Gráfica de correlación de variables

En la fig. 2.6 se observan las correlaciones que se presentaron con la cuantificación y capacidad antioxidante de las plantas de BM y BL. Se encontró una baja correlación entre el contenido total de fenoles y el contenido de flavonoides con un 0.08 de coeficiente de correlación de Pearson (ccP), por lo cual se puede inferir que la biosíntesis de flavonoides en *B. latifolia* no está relacionada a su vez con las rutas de producción de fenoles.

De igual manera, la correlación entre el contenido total de fenoles y flavonoides con la captura de radicales DPPH (ccP de 0.17 y 0.51, respectivamente) fue baja a diferencia de la correlación que se presentó entre el contenido de fenoles y flavonoides con el poder reductor (ccP de 0.84 y 0.76, respectivamente). Por lo tanto, los fenoles y flavonoides presentes están más relacionados con el poder reductor del ion Fe^{3+} al ion Fe^{2+} , que con la captura de radicales libres del DPPH y esto puede atribuirse al tipo de fenoles y flavonoides presentes en las diferentes partes de la planta. Esta alta correlación se debe a que los fenoles presentes poseen un patrón de sustitución tal que permite la generación y la deslocalización de un electrón desapareado, capaz de ser transferido para reducir el ion férrico del FRAP; mientras que la baja correlación del contenido de fenoles totales y

flavonoides con DPPH se puede deber a que, en las condiciones del ensayo, la capacidad de hacer homólisis (o ruptura homolítica) de tales fenoles es muy baja y, por ende, dificultar la generación del correspondiente radical libre que atraparía al DPPH (Muñoz y Ramos 2007).

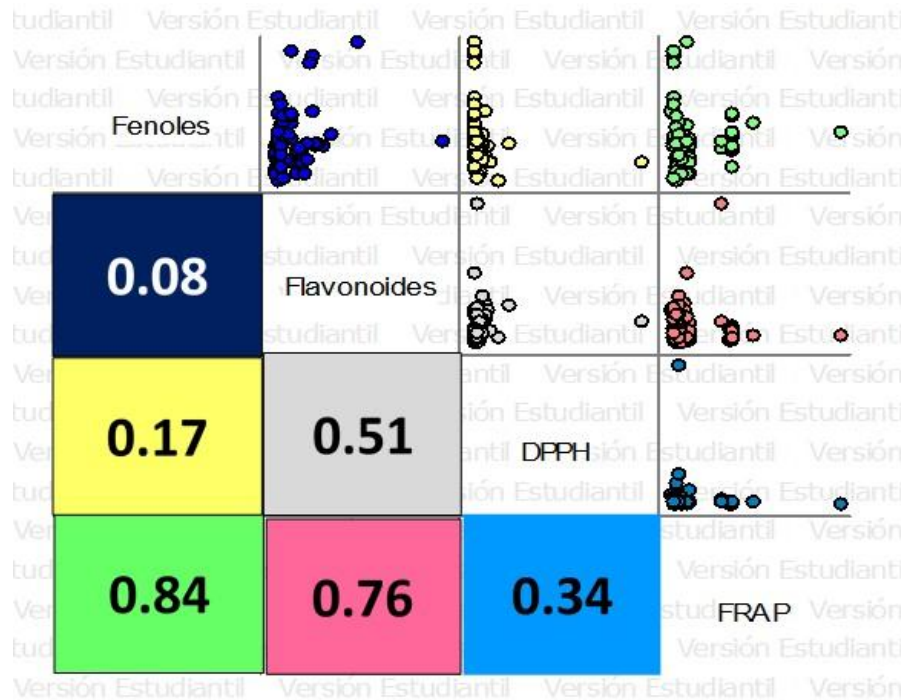


Fig. 2.6 Gráfica de correlación entre cuantificación de fenoles y flavonoides y evaluación de actividad biológica (DPPH y FRAP)

Otra consideración que se debe tener en cuenta, es que la alta correlación entre los fenoles y FRAP se deba solo a la presencia de compuestos fenólicos, pues en su composición química pueden existir una gran variedad de metabolitos secundarios que por su estructura contribuyan al poder reductor (Amzad *et al.*, 2011; Asami *et al.*, 2003). No se debe olvidar que la actividad antioxidante también está influenciada por otra serie de metabolitos (Palomino 2009), que a su vez dependen de variables como el ambiente, las interacciones, defensa contra animales, defensa contra la radiación solar (Brown *et al.*, 2001; Croteau *et al.*, 2000; Sartor *et al.*, 2013; Winkel-Shirley, 2001a, 2001b).

En Ferreira *et al.*, (2014) se ratifican los resultados del presente estudio con *B. trimera* donde los fenoles ($176,60 \pm 50,86$) y flavonoides ($58,65 \pm 4,61$) tuvieron mayor relación con el reactivo FRAP ($1.080,01 \pm 196,34$) que con el reactivo DPPH ($18,32 \pm 9,36$).

2.4 Conclusiones

Se encontró que la cuantificación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante de *B. latifolia* presenta una amplia variabilidad. A pesar de que 19 de las muestras son de la misma especie, se observó que variaron tanto en cuantificación como capacidad antioxidante (cada una de las accesiones de la planta presentó diferencias significativas entre las muestras), lo cual indica que el lugar de colecta (ej., el entorno) interviene en la expresión de metabolitos (Brown *et al.*, 2001). Además, se estimó el hecho que los fenoles y flavonoides presentes poseen diferente comportamiento en la capacidad antioxidante, pues contienen compuestos que están más relacionados con el poder reductor que con la captura de DPPH. De esta forma, se encontró que los extractos provenientes de las hojas presentaron mayor contenido y capacidad antioxidante. Lo anterior se confirma con lo reportado por Crozier *et al.*, 2009 citado por Zhimin y Luke, (2012), quienes describen que los fenoles y flavonoides se encuentran preferentemente en la epidermis de las hojas.

Cada planta mantiene condiciones diferentes del entorno, también llamado microambiente, por lo tanto deben enfrentar diferentes situaciones, defenderse de los posibles depredadores, sobrevivir a factores ambientales tales como la radiación UV, temperatura, factores bióticos y abióticos en general (Gliessman 1998) u otros factores que propician los cambios químicos en las plantas. Esto justificaría el hecho que cuatro de las plantas evaluadas **BL2**, **BL3**, **BL4** y **BL5** colectadas a pocos metros tengan diferentes características químicas.

En cuanto a *B. macrantha* **BM1** se observó un alto contenido de fenoles en las hojas y tallos, mientras que en flavonoides solo las hojas presentaron un mayor contenido a diferencia de BL. Su correlación con el poder reductor del Fe^{3+} fue alta a diferencia con DPPH. Este resultado permitiría promover estudios adicionales con *B. macrantha* con el fin de buscar moléculas bioactivas para diferentes usos.

2.5 Referencias

- ✚ Abad, M. y Bermejo, P. 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update. Arkivoc, 7, pp. 76-96.
- ✚ Almanza 2004. Radiación solar UV-B y estrés en las plantas. Rev. Científica de la fundación San Juan de D. Castellanos, pp. 11-14.

- ✚ Amzad, M., Dawood, M. 2011. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of Chemistry*, 8, 1, pp 66-71.
- ✚ Anttonen, M., Karjalainen, R. 2005. Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, pp 759-769.
- ✚ Asami, D., Jeong, Y., Barrett, D., Mitchell, A. 2003. Comparison of the Total Phenolic and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Grown Using Conventional, Organic, and Sustainable Agricultural Practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 1237-1241.
- ✚ Brand Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, pp. 25-30.
- ✚ Bedascarrasbure, E. Maldonado, L. Álvarez, A. Rodríguez, E. 2004. Contenido de Fenoles y Flavonoides de Propóleos Argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23, 3, pp. 369-372.
- ✚ Benzie, I. Strain, J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, pp. 70–76.
- ✚ Borneo, R., León, A., Aguirre, A., Ribotta, P., Cantero, J. 2009. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. *Food Chemistry*, 112, 3, pp. 664-670.
- ✚ Brighente, M.C., Dias, M., Verdi, L.G., Pizzolatti, MG. 2007. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. *Pharmaceutical Biology*, 45, 2, pp. 156–161.
- ✚ Brown, D., Rashotte, A., Murphy, A., Normanly, J., Tague, B., Peer, A., Taiz, L., Muday, G. 2001. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 126, pp. 524– 535.
- ✚ Cabrera, A., Crisci, J., Delucchi, G., Freire, S., Giuliano, D., Iharlegui, L., Katinas, L., Saenz, A., Sancho, G., Urtubey, E. 2000. *Catálogo Ilustrado De Las Compuestas (=Asteraceae) de la Provincia De Buenos Aires*. Argentina: Sistemática, Ecología y Usos.
- ✚ Colegate, S., Molyneaux, R. 2008. *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination*. Second Edition.

- ✚ Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B.; Grissem, W.; Jones, R., Eds.). American Society of Plant Physiologists, pp. 1250–1318.
- ✚ Delbon, N., Cosa, M.T., Bernardello, G. 2012. Exmorfología y anatomía de órganos vegetativos aéreos en especies de *Flourensia* DC. (Asteraceae) con importancia fitoquímica. *Acta Bot. Bras*, 26, 1.
- ✚ Duthie, G., Duthie, S., Kyle, J., 2000. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Review*, 13, pp. 79–106.
- ✚ Ferreira, A., Isidoro, C., Alberti, A., Alessandro, A., Demiate, I., Granato, D. 2014. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. *Food Research International*, 60, pp. 246-254.
- ✚ Gonzaga, L., Costa, I., Pizzolatti, M. 2005. Género *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos Químicos, Econômicos E Biológicos. *Química Nova*, 28, pp. 85-94.
- ✚ Gliessman, S. 1998. *Agroecology: ecological processes in sustainable agricultura*, CR, pp. 167-172.
- ✚ Grecco, S., Reimao, J., Tempone, A., Sartorelli, P., Cunha, R., Romoff, P., Ferreira, M., Favero, O., Lago, H. 2012. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. *Experimental Parasitology* 130, pp. 141-145.
- ✚ Guimaraes, N., Mello, J., Paiva, J., Bueno, P., Berretta, A., Torquato, R., Nanrtes, I., Rodríguez. 2012. *Food and Chemical Toxicology*, 50, pp. 1091-1097.
- ✚ Muñoz, J., Ramos, E. 2007. Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Rev. Horizonte Medico*, 7, 1, pp. 23- 31.
- ✚ Lasheras, C., Fernandez, S., Patterson, A.M., 2000. Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, nonsmoking elderly people. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, pp. 987–992.
- ✚ Luthria, D., Mukhopadhyaya, S., Krizek, D. 2006. Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, pp. 771–777.
- ✚ Mattila, P., Hellstrom, J., 2006. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, pp. 152-160.

- ✚ Netzel, Tian. Schwartz, Konczak. 2007. Native Australian fruits — a novel source of antioxidants for food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies ScienceDirect* 8, pp.: 339-346.
- ✚ Palomino, L., García, C., Gil, J., Rojano, B., Durango, D. 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16, 3, pp. 388-395.
- ✚ Parejo I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas, A., Saavedra, G., Murcia, A., Jimenez, A. Codina, C. 2003 Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sciences*, 73, pp. 1667-1681.
- ✚ Sartor, T., Xavier, V., Falcao, M., Mondin, C., Santos, M., Cassel, E., Astarita, L., Santarem, E. 2013. Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso. *Industrial Crops and Products*, 51, pp. 355-359.
- ✚ Soobrattee, M., Neergheen, V., Luximon, A., Aruoma, O., Bahorun, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 57, pp. 200-213.
- ✚ Winkel-Shirley, B. 2001a. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 126, pp. 485– 493.
- ✚ Winkel-Shirley, B. 2001b. It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiology*, 127, pp. 1399– 1404.
- ✚ Zhimin, X. y Luke H. 2012. *Analysis of antioxidant- rich phytochemicals* Ed. John Wiley & Sons, pp. 207- 346.

CAPÍTULO 3

ANÁLISIS POR CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA Y CROMATOGRFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE HOJAS, TALLOS, FRUTO Y FLOR DE *B. latifolia*

3.1 Introducción

La cromatografía es una técnica con un amplio número de metodologías que permiten la separación, cuantificación, aislamiento e identificación de componentes en una mezcla (Fried y Sherma 1999; Gurdeer y Madhu 2006; Gehrke y Robert 2010). Consiste en un proceso por el cual una muestra se desplaza en una fase móvil, que puede ser líquida o gas, a través de una fase estacionaria fijada a una columna o superficie sólida (Alfonso 2008).

Proviene de las palabras “chroma” (color) y “graphein” (escribir), a razón de los pigmentos vegetales separados por primera vez por el botánico Tswett en 1906 citado por Berthod *et al.*, (2009), los cuales se mostraron como bandas de colores. Esta técnica ha venido jugando un papel cada vez más importante en la caracterización química de sustancias (Berthod *et al.*, 2009), además de la aplicación en otras áreas de investigación como biología, bioquímica, fitopatología, genética u otras (Legaz *et al.*, 2011).

Para el desarrollo experimental mostrado en el presente capítulo, se llevaron a cabo dos metodologías con el fin de separar y detectar posibles compuestos de hojas, tallos, flor y frutos de la especie *Baccharis latifolia*. La cromatografía en capa fina (TLC), es el método más simple de cromatografía (Sherma y Fried 2003), es sencillo y rápido, donde se requiere menos sorbente y muestra, además de ser relativamente económica (Wall y Smith 2005). Es un tipo de cromatografía líquida, en el cual se siembran las muestras como un pequeño punto o raya sobre una placa con sorbente adecuado (fase estacionaria) según características de la muestra (Sherma y Fried 2003; Wall y Smith 2005; Reich y Schibli 2007).

Existen al menos 25 materiales disponibles como sorbentes en TLC. Para lograr separaciones óptimas es importante elegir el sorbente adecuado (Wall y Smith 2005). El tipo de sorbente más común y útil es Silica gel (Wall y Smith 2005), también llamado ácido silícico o Kieselgel, el cual es un material poroso amorfo de color blanco, común por permitir la separación de muchos tipos de compuestos (Sherma y Fried 2003).

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de Masas (HPLC-MS o LC-MS), es una metodología eficiente para el análisis metabolómico, permitiendo el análisis de una amplia gama de metabolitos de alta y baja polaridad, incluyendo aquellos no volátiles (Ogura y Sakamoto S.f.; Bull 2005), la cual ha ganado popularidad por su sensibilidad, precisión y cobertura del metaboloma. Mediante esta metodología se pueden detectar, separar, caracterizar y cuantificar los metabolitos de forma relativa o absoluta (Masana 2013; Alfonso 2008; Zhou 2011). El acoplamiento de un detector de MS a un sistema de separación cromatográfico permite que se resuelvan los problemas de identificación y cuantificación con la suficiente garantía. Cuando los detectores de masas operan en modo *scan* suministran una información espectral muy precisa, y cuando operan en modo *SIM* (modo de selección de ion) proporciona una alta especificidad, lo que permite el análisis cuantitativo (Quintela *et al.*, 2005).

A la hora de elegir qué tipo de cromatografía usar, se debe tener en cuenta las desventajas de estas. En TLC la estandarización de la técnica es una desventaja, ya que la gran mayoría de trabajo es manual, por lo que dificulta ciertos aspectos; además es sensible a efectos ambientales tales como el aire (oxígeno), factores climáticos como la humedad y la temperatura, por lo que las muestras pueden verse afectadas por estos factores; de igual modo no tiene suficiente resolución para todos los componentes; no es adecuada para todo tipo de muestras (tales como biopolímeros) (Tomas y Benjamin 2010; Reich y Schibli 2007); finalmente es un ensayo cualitativo, lo que requiere de un análisis y cuantificación posterior (Budhiraja 2004). En el caso de HPLC-MS se encuentran inconvenientes espectrales, tales como cambios en la posición del pico o anchura del mismo, causado por la inestabilidad de los instrumentos y variabilidad de la muestra (Worley y Powers 2013). Además su mayor inconveniente es el alto costo de esta metodología, y también requiere de personal con una alta experiencia y conocimiento del instrumento (Santos 2012).

Teniendo en cuenta las ventajas y desventajas de las metodologías de cromatografía, se procedió con la investigación, donde se realizó la detección e identificación tentativa de algunos metabolitos presentes en las diferentes accesiones de la planta *B.latifolia*.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Cromatografía en capa fina

Una vez obtenido el extracto (capítulo 2, sección 2.2.3), se procedió a realizar cromatografía de capa fina (TLC). Se empleó como fase estacionaria placas cromatográficas de sílica gel (60 F254 Merck®), las cuales fueron divididas según el número de muestras a analizar. Con ayuda de un tubo capilar se sembró una pequeña cantidad de cada extracto, a una distancia aproximada de 0.5 ml entre una y otra. Se introdujo la placa de sílica gel en una cámara cromatográfica previamente saturada con 16 mL de *n*-hexano/0,4 mL de acetato de etilo (relación 8:2), para iniciar la elución. Luego se sacó la placa y se dejó evaporar el disolvente. Finalmente se reveló la placa con el revelador Vainillina/H₂SO₄ con el fin observar la posible presencia de terpenoides.

3.2.2 Perfilado por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS).

Cada extracto obtenido fue perfilado por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas a través del equipo LC-MS Shimadzu QP2020 y LC-DAD del laboratorio de Química Bioorgánica de la UMNG. Para ello, cada extracto se pasó por un filtro en PTFE de 0.2 µm. La separación de los componentes de los extractos se llevó a cabo en una columna Premier C-18 estándar (4,6 mm x 150 mm, 3,5 µm) usando el sistema LC-MS que consta de un módulo de separación equipado con un detector con arreglo de fotodiodos (DAD), una interface por electrospray y un detector de masas con analizador cuadrupolar. El caudal fue de 0,7 mL /min. Las fases móviles utilizadas fueron ácido trifluoroacético (TFA) al 0.005% agua como eluyente A y acetonitrilo (ACN) como eluyente B, las cuales se determinaron en ensayos previos para la obtención de perfiles con buena resolución y selectividad. El tiempo total de ejecución fue de 42 min usando el siguiente gradiente lineal de múltiples etapas: 0 min, 10% de B; 18 y 20 min, 60% B; 26 y 28 min, 90% B; 30 y 32 min, 100% B; 34 y 38 min, 70% B y finalmente 40 y 42 min, 10% B. El volumen de inyección fue de 20 µL. Los compuestos se chequearon con una longitud de onda (270 y 330 nm) y después con un detector de espectrometría de masas.

Con la información del cromatograma relacionada con cada compuesto mayoritario, se estableció, en lo posible, la naturaleza química del compuesto mediante análisis de sus espectros UV y EM, así como la abundancia relativa a través del porcentaje de área de cada señal.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Análisis por Cromatografía de capa fina

Mediante el análisis por TLC y su posterior revelado con Vainillina/H₂SO₄, se detectó la presencia de un total de 22 bandas reveladas, de las cuales 20 de ellas se detectaron en los extractos de hojas, 12 a tallos, 11 a flor y finalmente 4 compuestos a fruto (Tabla 3.1-anexos). Es probable que las bandas detectadas contengan la presencia de más de un compuesto pero, para efectos prácticos en el análisis de los resultados y teniendo en cuenta las limitaciones de esta técnica, se tomó cada banda como un compuesto. A cada compuesto (=banda) se le asignó una letra mayúscula como parámetro de individualización dependiendo del valor del factor de retención (Rf).

Las placas cromatográficas se revelaron con vainillina en ácido sulfúrico, ya que este tipo de revelador es específico para localizar principalmente terpenoides (Wagner y Bladt 1996; Soberón *et al*/2014) y algunos derivados de fenilpropano (Sgariglia *et al.*, 2013). Reportes bibliográficos han encontrado que el género *Baccharis* es rico en terpenoides tales como diterpenos y sesquiterpenlactonas, entre otros (Norte *et al.*, 1993; Zdero, *et al.*, 1991). Este tipo de compuestos tiene propiedades antiparasitarias, interés principal de la ResNetNPND de obtener compuestos en plantas de la familia Asteraceae con este tipo de propiedades.

Por esta razón, se hizo la detección con el revelador vainillina en ácido sulfúrico para detectar la presencia de tales metabolitos en *B. latifolia* (Rojas, 2010). Su revelado es de color violeta o morado como se observa en las placas de TLC Fig. 3.1. Por lo tanto se asume que *B. latifolia* contiene este tipo de compuestos, con mayor abundancia en las hojas y tallos y la más baja en frutos, incluyendo a la especie de *B. macrantha*.

El compuesto **F** se encuentra en todos los extractos excepto Fr9, a diferencia de los demás compuestos que son selectivos a diferentes extractos. Por ejemplo, en las hojas los compuestos **D**, **G**, **H**, **J**, **K**, **L** y **N** tienen una ocurrencia entre 10 - 14 extractos; mientras que los compuestos **C**, **E**, **M**, **O**, **Q**, **R** y **S** están presentes en un intervalo entre 9 y 5 extractos; la menor ocurrencia la tienen los compuestos **A**, **B**, **I** y **P** con una presencia entre 1 - 4 extractos (Fig 3.1-A)

En cuanto a los extractos de tallo se encontró que el compuesto **F** está presente en los veinte extractos evaluados; mientras que el extracto **W** tiene una ocurrencia en 19 extractos, a diferencia de compuestos como **A**, **C**, **D**, **H**, **J** y **O** que tienen una ocurrencia

con un intervalo entre 5 - 10 extractos y finalmente con una ocurrencia entre 1 - 5 extractos se encuentran los compuestos **B**, **E**, **N** y **T** (Fig. 3.1-B).

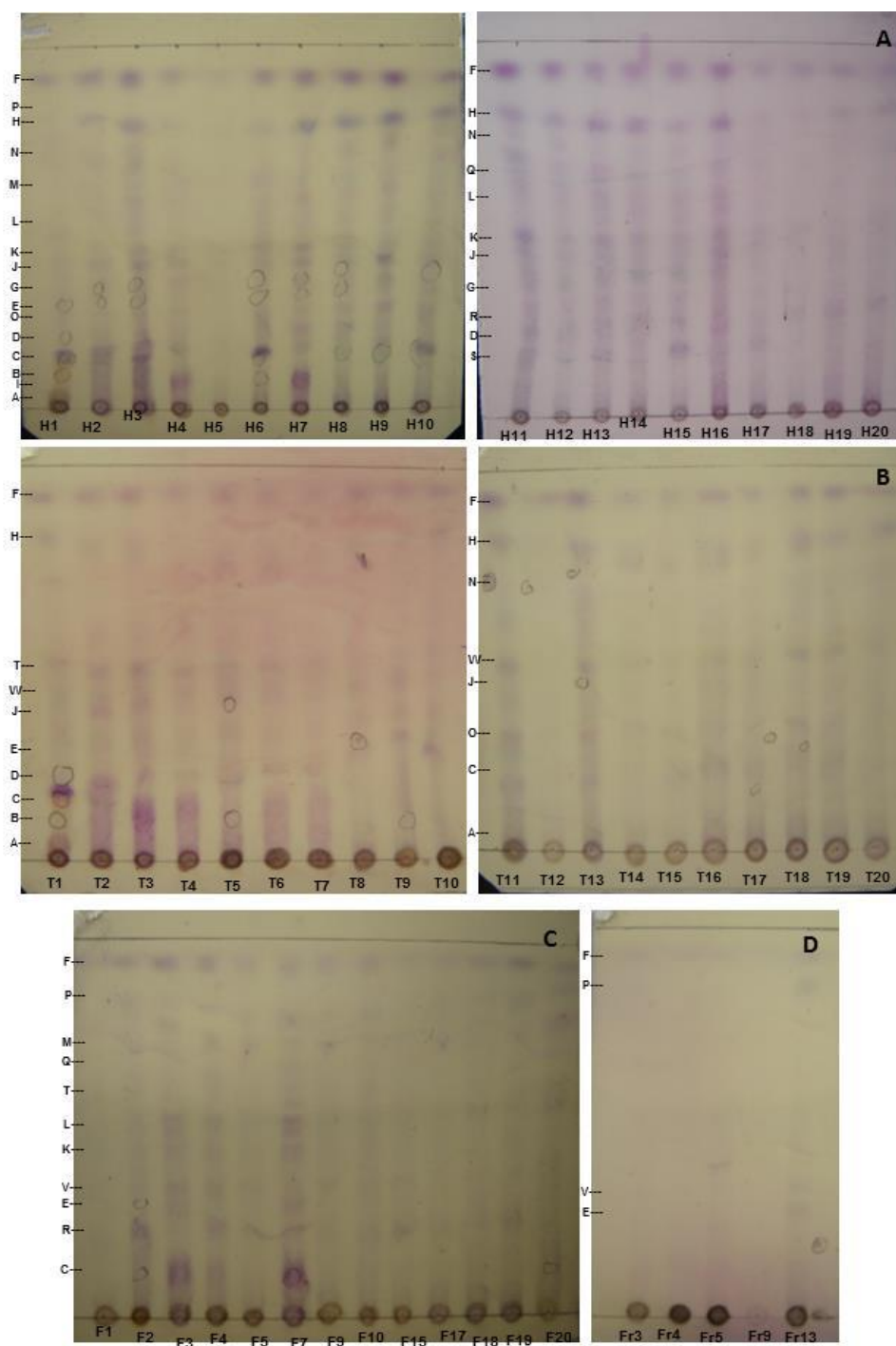


Figura 3.1. Placas de cromatografía de capa fina (TLC) de extractos de *B. latifolia*. **A:** hojas; **B:** tallos; **C:** Flor; **D:** Frutos.

Se evaluaron en total trece extractos de flor, de estos se encontró que el compuesto **F** está presente en todos los extractos, mientras que el compuesto **L** se encuentra en 12 de los extractos; los compuestos **K**, **P**, **R** y **V** se encuentran con una ocurrencia entre 5 -10 extractos; con la menor ocurrencia de 1-4 extractos se encuentran los compuestos **C**, **E**, **M**, **Q** y **T** (Fig. 3.1-C).

Finalmente, de los cinco extractos de fruto evaluados, se encontró que los compuestos **E** y **F** están presentes en cuatro de los extractos (Fr3, Fr4, Fr5 y Fr13), mientras que los compuestos **P** y **V** están presentes en dos extractos (Fig. 3.1-D). Los datos de Rf se pueden observar en la tabla 3.1 de la sección de anexos.

3.3.2 Análisis por Cromatografía líquida de alta eficiencia

Mediante el análisis por HPLC con DAD se detectó la presencia de 36 compuestos mayoritarios en total, entre las cuatro partes de la planta y los extractos evaluados. Además, a partir del análisis de sus espectros de masas, apoyado de una búsqueda en bases de datos (i.e, MassBank) se identificaron tentativamente los compuestos, cuya identidad es mostrada en la Tabla 3.7 –Anexos. Se encontró que los compuestos **1**, **2**, **3**, **4**, **6**, **8**, **11**, **13**, **14**, **15** y **30** están presentes en todas las partes de la planta, pero no en todos los extractos evaluados. (Tabla 3.2- Anexos)

Se identificaron 36 compuestos en total, entre las cuatro partes de la planta y los extractos evaluados. Se encontró que los picos **1**, **2**, **3**, **4**, **6**, **8**, **11**, **13**, **14**, **15** y **30** están presentes en todas las partes de la planta, pero no en todos los extractos evaluados.

En el caso de los picos **1**, **6** y **13** se encuentran presentes en los veinte extractos de hojas evaluados; mientras que los demás picos se presentan en algunos extractos, como lo son los picos **3**, **8**, **10** y **19** que solo están presentes con una ocurrencia entre 15 a 19 extractos. Con una menor ocurrencia entre 10 y 14 extractos se encuentran los picos **2**, **4**, **5**, **9**, **12**, **15**, **16**, **17**, **20**, **21**, **23**, **26**, **30** y **31**; con una ocurrencia entre 5 y 9 extractos se encuentran los picos **7**, **8**, **11**, **14**, **18**, **22**, **24**, **25**, **33** y **34**; con la menor ocurrencia entre 1 y 4 extractos se encuentran los picos **27** y **28**; finalmente los picos **29**, **35** y **36** no están presentes en los extractos de hojas (Tabla 3.3-anexos)

En cuanto a los extractos de tallos, los picos **1** y **3** están presentes en todos los extractos. Mientras que los picos **2**, **6**, **11** y **30** presentan una ocurrencia entre 15 y 20 extractos; los picos **13** y **33** están presentes con una frecuencia de 10 y 14 extractos; mientras que los picos **4**, **8**, **9**, **14**, **18**, **25** y **31** tienen una ocurrencia entre 5 y 9 extractos; y la menor frecuencia la presentan los picos **5**, **7**, **10**, **12**, **15**, **17**, **19**, **20**, **21**, **28**, **29** y **34** con

una ocurrencia de 1 a 5 extractos y finalmente los picos **16, 22, 23, 24, 26, 27, 32, 33, 34, 35** y **36** no están presentes en esta parte de la planta (Tabla 3.4.-Anexo).

De igual manera se evaluaron 13 extractos de flores donde se identificaron 18 picos en total. Tres de estos picos (**1, 2, 3**) están presentes en todos los extractos. Los picos **6, 8, 11, 13, 23, 30** presentan una ocurrencia entre 13 y 7 extractos; entretanto los picos **4, 14, 15, 16, 21, 27, 34, 35** y **36** tienen una ocurrencia entre 6 y 1 extracto (Tabla 3.5-anexos)

Finalmente se evaluaron cinco extractos de frutos con un total de 14 picos identificados, donde tres de estos (**1, 3, 5**) se encuentran en los cinco extractos evaluados, mientras que los picos **2, 6, 11, 14,** presentan una ocurrencia entre 4 y 2 extractos; los picos **4, 8, 9, 13, 15, 23** y **35** están presentes en un solo extracto **Fr13, Fr9, Fr13, Fr13, Fr3, Fr13** y **Fr9**, respectivamente (Tabla 3.6- anexos).

Del género *Baccharis* se han aislado compuestos como triterpenoides como el ácido oleanólico (*B. pseudoteunifolia* II) (Abad & Bermejo 2007), diterpenos de tipo clerodano, labdano y kaurano, ésteres del ácido cinámico, derivados de algunos flavonoides y cumarinas (Chidiak, 2007; Rojas *et al* 2009). Adilfa *et al* (2014) reporta dos diterpenos de núcleo neo-clerodano y ent-clerodano aislados de *B. trimera* (Less.).

En la presente investigación se identificaron diez compuestos aislados de plantas de la familia Asteraceae, donde tres de estos, se detectaron en plantas del género *Baccharis*, tales como dillenitina (*B. salicifolia*) y eupalitina y Kaempferida (*B. pilulares, B. vaccinoides*) según la información obtenida de la base de datos MassBank. Bohm y Stuessy (2001), reportó el flavonoide 5,7,2',5'-tetrahidroxiflavanona (pico **13**), también presente en Sunflower (girasol) de la familia Asteraceae.

B. latifolia es una planta con características medicinales (Abad & Bermejo 2007), debido al contenido de terpenoides (Díaz 2007), flavonoides, fenoles y otros compuestos presentes (Abad & Bermejo 2007). De esta especie existen pocos registros de compuestos aislados. Barboza *et al* (2009) presenta una lista de plantas medicinales nativas de Argentina, donde cita *B. latifolia* con algunos compuestos identificados como germacreno-D, α -tujeno, α -pineno, limoneno, ledol, 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona, 3,5,4-trihidroxi-7,3'-dimetoxiflavona, 3,5-dihidroxi-5,7,3',4'-trimetoxiflavona, 3-hidroxi-5,7,3', 4'-tetrametoxiflavona, 5-hidroxi-7,3, 4'-trimetoxiflavona.

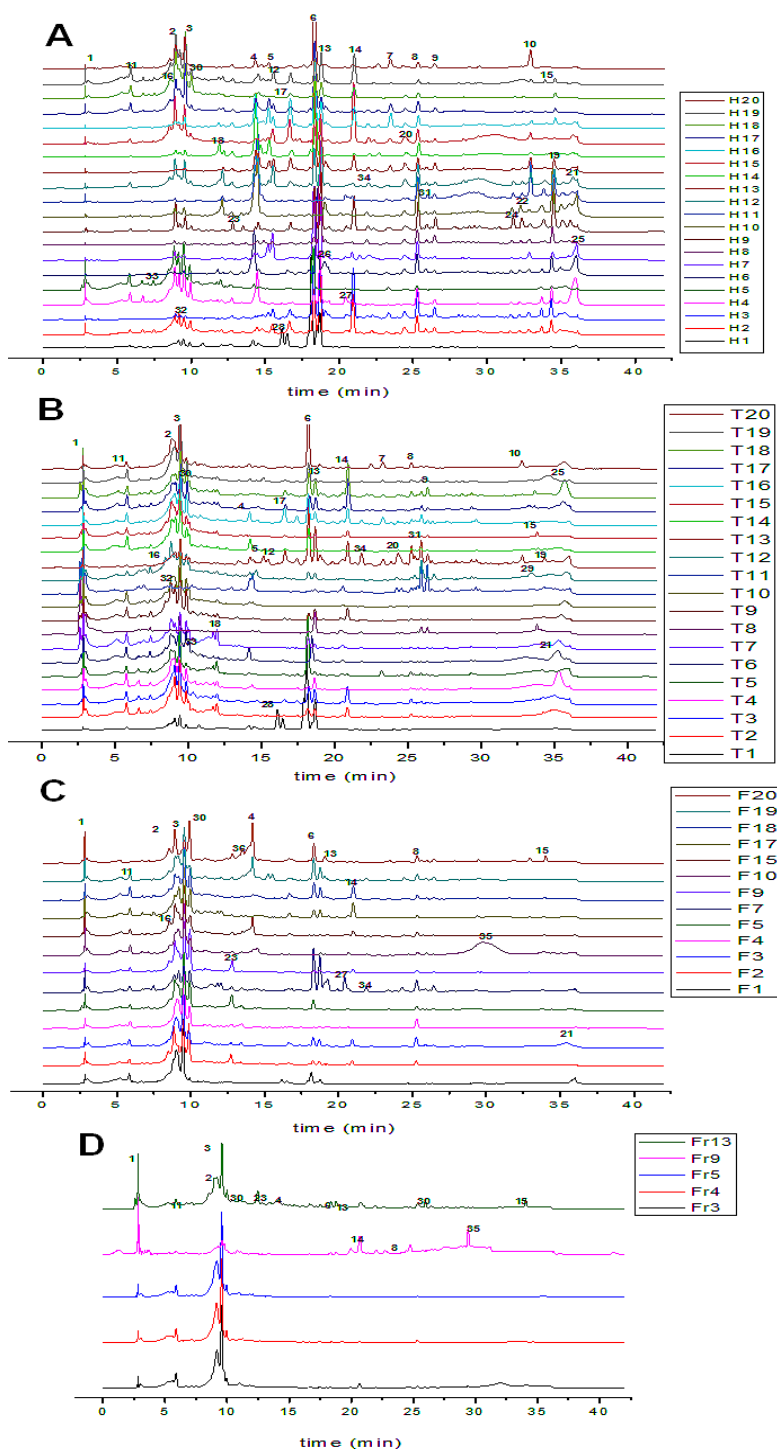


Figura 3.2 Cromatogramas de HPLC de extractos de *B. latifolia*. A: Hojas; B: Tallos; C: Flor; D: Fruto.)

En la identificación tentativa realizada en el presente estudio se encontraron tres compuestos de tipo terpenoide (**oblonganósido A**, **askendósido C** y **beesiosido D**), los

demás compuestos en su gran mayoría son flavonoides, como es el caso de **galangin-8-sulfonato**, **acacetina**, **exiguaflavanona K**, **fasciculiferina**, entre otros; también alcaloides como **flavopereirina**, **lepidilina B**, **poligonafolina**, en la tabla 3.7-anexos se pueden observar todos los compuestos identificados.

Se observó una alta variabilidad en cuanto a los compuestos identificados, tanto entre las plantas como en la misma accesión evaluada. Esta variabilidad se debe a la capacidad que tienen los organismos de cambiar y/o adaptarse a las condiciones que los rodean, la cual varios autores describen como “plasticidad” (Campbell y Reece 2005). Según Brunetti *et al.*, (2013) el entorno natural propicia grandes desafíos que las plantas deben enfrentar como es el caso de la capacidad de crecer, la presión del ambiente con sus factores bióticos y abióticos (Walters 2005), la competencia generada por plantas vecinas, el cambio en la disponibilidad de nutrientes, temperatura e irradiación, lo cual puede variar en una escala espacial de pocos metros o distancias mayores. Por lo tanto, cada planta reacciona diferente con el fin de adaptarse a cualquier zona, generando un cambio en su metabolismo, lo cual induce a la variación de ciertos compuestos o metabolitos secundarios según su condición, distribución y hábitat (Kusano *et al.*, 2011 citado por Brunetti *et al.*, 2013).

Un ejemplo de este caso lo reporta Muñoz *et al.*, (2004), donde presenta la variación de compuestos químicos en hojas de *Drymys* spp., comúnmente llamado Canelo, en diferentes zonas de Chile. En este trabajo se encontraron importantes cambios entre las poblaciones, pues variaron en la cantidad de aceites esenciales, terpenos y flavonoides, a lo que atribuyen su amplia distribución geográfica.

3.4 Conclusiones

El método de TLC permitió simplemente un análisis cualitativo, indicando la presencia de algunos metabolitos secundarios, en este caso dirigidos a detectar principalmente la posible presencia de terpenoides. TLC es una metodología económica, fácil y rápida de hacer, pero con ciertas desventajas que dificultan la confiabilidad de los datos generados. Por ejemplo, al momento del revelado, no es fácil distinguir si una banda correspondía a un único compuesto o era la mezcla de dos o más compuestos con un Rf cercano, además es una técnica totalmente manual y sensible a cambios ambientales lo que puede afectar los resultados. Por lo tanto esta metodología depende en gran parte del investigador y su observación. En este caso se identificaron 22 compuestos en total. Las

hojas presentaron la mayor cantidad de compuestos con 20 picos, seguido por los tallos y las flores con 12 y 11 compuestos respectivamente, finalmente los frutos con 4 compuestos. Además se observaron diferencias entre las muestras de la misma accesión. Esta técnica de cromatografía es muy útil y funciona como complemento a otras técnicas como es el caso de HPLC-MS, la cual permite separar y detectar ciertos compuestos que luego con ayuda del banco de datos (MassBank) permite acercarse de manera tentativa a los compuestos correspondientes. La identificación de compuestos es tentativa, pues se basa en el tiempo de retención y en un espectro de masas de baja resolución, los cuales pueden alterarse al igual que los datos espectrales por variaciones indeseables e inevitables, una de ellas es causada por cambios en la posición del pico o anchura del mismo, generados por la inestabilidad del instrumento y la versatilidad de las condiciones de la muestra (Worley y Powers 2013). Además, al momento de la búsqueda en la base de datos (MassBank), esta arroja cierto número de posibles compuestos y es decisión del investigador, de acuerdo a un criterio meramente quimiotaxonómico, el hecho de elegir a cuál compuesto corresponde. Por esta razón, se tiene un cierto grado de incertidumbre en los compuestos identificados de forma tentativa, agregando que existe un gran vacío en la identificación de varios metabolitos, por lo que se desconoce aún una gran cantidad de ellos (Stashenko y Martinez 2009). No obstante, pese a estas limitaciones/incertidumbres, la identificación tentativa es todavía importante y esta importancia radica en el acercamiento, con datos propios de la muestra y obtenidos experimentalmente, de la identidad de los compuestos (o al menos al núcleo correspondiente), presentes en una mezcla tan compleja como lo es un extracto. Con los avances en las metodologías analíticas y la construcción de bases más enriquecidas en datos y compuestos, en un futuro estas limitaciones se irán venciendo de manera progresiva.

La identificación tentativa arrojó en su gran mayoría compuestos de tipo alcaloide y flavonoide. De los 36 compuestos identificados, 22 pertenecen a flavonoides, 10 a alcaloides y 3 a terpenoides. Según la base de datos (MassBank), diez de estos compuestos han sido identificados en la familia Asteraceae y tres del género *Baccharis*.

No todas las partes de la planta, ni los extractos de cada una contienen los mismos compuestos, pues cada accesión es un sistema biológico diferente (pese a compartir características genéticas definidas); cada una reacciona, genera y produce compuestos dependiendo de la necesidad (Campbell y Reece 2005). De sus características tanto externas como internas, esta versatilidad de la planta se debe a que cada una enfrenta

situaciones diferentes, ya sea en cuanto a la cantidad y cambios de radiación, los nutrientes del suelo, la genética de la planta, sus posibles peligros y daños como los depredadores (Filete y Frederich 2015). Todo este tipo de variables hacen que las circunstancias de las plantas cambien por cercanas (ubicación) que se encuentren con el fin de sobrevivir.

3.5 Referencias

- ✚ Abad, M., Bermejo, P. 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc* 7, Pp. 76-96.
- ✚ Alfonso, M. 2008. Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura. Tesis doctoral. Fac. De Veterinaria, Universidad Santiago de Compostela, pp. 42-50.
- ✚ Adilfa, F., Tanae, M., Brandao, L., Lapa, A., Riggio, M., Souccar, C. 2014. A comparative study of two clerodane diterpenes from *Baccharis trimera* (Less.) DC. on the influx and mobilization of intracellular calcium in rat cardiomyocytes. *Phytomedicine* 21, pp. 1021-1025.
- ✚ Barboza, GE., Cantero, J., Nuñez, C., Pacciaroni, A., Ariza, E. 2009. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 34, 1-2, pp. 7- 365.
- ✚ Berthod, A., Maryutina, T., Spivakov, B., Shpigun, O., Sutherland, L. 2009. Countercurrent Chromatography in Analytical Chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, 81, 2, pp. 355- 387.
- ✚ Bohm, B., Stuessy, T. 2001. *Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae)*. Springer-Verlag/Wien, pp. 183-210.
- ✚ Brunetti, C., George, R., Tattini, M., Field, K., Davey, M. 2013. Metabolomics in plant environmental physiology. *Journal of Experimental Botany*, pp. 1-10.
- ✚ Budhiraja R. 2004. *Separation Chemistry*. Ec. New Age International, pp 251-267.
- ✚ Bull, I. 2005. *High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC/MS)*. University of Bristol. Consultado de <http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/hplcms.html> el día 30 de marzo 2015.
- ✚ Campbell, N., Reece, J. 2005. *Byology*. 7^{ed}. Pearson Education, Inc, pp. 710-717.
- ✚ Chidiak, S., Guada, M., Buitrago, D. Morales, A. 2007. Flavonoides aislados de la especie *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon Pers). *Ciencia* 15, 3 Maracaibo.

- ✚ Díaz, R. 2007. Farmacología de terpenoides de *Helianthus annuus* L. Academia Nacional de Farmacología, 73, pp. 725-746.
- ✚ Filete, M., Frederich, M. 2015. The emergence of metabolomics as a key discipline in the drug discovery process. *Drug Discovery Today: Technologies*, 28.
- ✚ Gehrke, C., Robert, W 2010. *Chromatography: A science of Discovery*. Ed John Wiley & Sons, Publication, pp. 2-13.
- ✚ Gurdeer, C., Madhu, A. 2006. *Analytical Chromatography*. Himalaya Publishing House, pp. 1- 5.
- ✚ Fried, B., Sherma, J. 1999. *Thin- Layer Chromatography*. Ed Marcel Dekker, 8, pp. 1- 2.
- ✚ Legaz, M., Sacristán, M., Díaz, E., Alarcón, B., Vicente, C. 2011. Curso de Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Practicas de Laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte I: Introducción y práctica de laboratorio: Calculo de la eficiencia y representación gráfica de la ecuación de van Deemter. *Reduca (Biología)*, 4, 3, pp.1-32.
- ✚ Masana, I. 2013. Introducción a las herramientas utilizadas en Metabolómica. *Integrated Biology. CEK/CIBEK (Centre d'Investigació Biomèdica Esther Koplowitz – Fundació Clínic)*. Barcelona.
- ✚ Muñoz, D., Vogel H., Razmilic, I. 2004. Variación de compuestos químicos en hojas de poblaciones de *Drymys* spp. (Magnoliophyta: Winteraceae) en Chile. *Rev. Chilena de Historia Natural*. 77, 1, pp. 43-50.
- ✚ MassBank. Consultado <http://www.massbank.jp/> consultado el 16 de mayo 2015.
- ✚ Norte, M., Cataldo, F., Sanchez, A., Gonzalez, A. 1993. Spartidienedione, a new sesquiterpene with a novel carbon skeleton from *Baccharis spartioides*, 34, 32, pp. 5142-5146.
- ✚ Ogura, T., Sakamoto, Y. S.f. Application of Metabolomics Techniques using LC/MS and GC/MS Profiling Analysis of Green Tea Leaves. *Application Note 10*. Shimadzu, pp. 1- 5.
- ✚ Quintela, O., Cruz, A., Concheiro, M., De Castro, A., López-Rivadulla, M. 2005. Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología *Revista de Toxicología*, 22, 1, pp. 7-14.
- ✚ Reich, E., Schibli, A. 2007. *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*. Thieme Medical Publishers. Inc

- ✚ Rojas, J. 2010. Caracterización Fitoquímica De Compuestos Presentes En La Subfracción De Las Hojas De *Iserbia laevis* (Rubiáceas) Con Actividad Anticariogénica. Tesis de magister. Pontificia Universidad Javeriana, pp. 47-49.
- ✚ Rojas, L., Uribe Y., Martínez, N., Niño, D. 2009. Análisis Fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana krukoff*). Rev. Colombia forestal, 12, pp. 161-170.
- ✚ Santos, J. 2012. Trascricpción de HPLC. consultado de <https://prezi.com/1kkhy2yhsxz6/hplc/> el día 30 de marzo del 2015.
- ✚ Sgariglia, M., Soberon, J., Poveda, A., Sampietro, D., Vattone, M. 2013. Anti-inflammatory properties of phenolic lactones isolated from *Caesalpinia paraguariensis* stem bark. Journal of Ethnopharmacology, 147, 1, pp. 63-73.
- ✚ Sherma, J., Fried. 2003. Handbook of Thin- Layer Chromatography. Third Edition. Chromatographic Science series, 89, pp. 2- 55.
- ✚ Soberón, J., Sgariglia, M., Maderuelo, M., Andina, M., Sampietro, D., Vattuone, M. 2014. Antibacterial activities of *Ligaria cuneifolia* and *Jodina rhombifolia* leaf extracts against phytopathogenic and clinical bacteria. Journal of Bioscience and Bioengineering, 118, 5, pp. 599-605.
- ✚ Stashenko, E., Martínez, J. 2009. Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga- Colombia.
- ✚ Thomas, B., Benjamin, B., Raymond, S. 2000. Quantitative Chromatographic Analysis. Ed CRC Press, pp. 321- 378.
- ✚ Wagner, H. y Bladt, S. 1996. Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas. 2da ed, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.
- ✚ Wall, P., Smith, R. 2005. RSC Chromatography Monographs. Vol 12: Thin-Layer Chromatography: A Modern Practical Approach. Ed. Royal Society of Chemistry, pp. 6- 55.
- ✚ Walters, R. 2005. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. Journal of Experimental Botany. 56, 411, pp. 435-447.
- ✚ Worley, B., Powers, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. Current Metabolomics, 1, pp. 92-107.
- ✚ Zdero, C., Bohlmann, F., Niemeyer, H. 1991. An unusual dimeric sesquiterpene and other constituents from Chilean *Baccharis* species, 30, 5, pp. 1597-1601.

- ✚ Zhou, B. 2011. Computational Analysis of LC-MS/MS Data for Metabolite Identification. Thesis submitted to the faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science In Electrical Engineering.

CAPÍTULO 4

RELACIONES METABOLÓMICAS EXPRESADAS ENTRE DATOS CUANTITATIVOS Y ENTRE PERFILES CROMATOGRÁFICOS

4.1 Introducción

Las plantas contienen numerosos productos naturales llamados metabolitos secundarios, estos pueden no participar directamente en su desarrollo y crecimiento (Itokawa.2000 citado por Civjan 2012), pero si en las interacciones ecológicas con otros organismos. La función que desempeñan los metabolitos secundarios en el organismo productor es un tema bastante controversial (Tang *et al.*, 2003 y Lee 2004, citados por Civjan 2012), mientras que la diversidad química de los productos naturales es conocida y se cree que mucho mayor que la diversidad funcional. (Tang *et al.*, 2003, Lee 2004, Mukherjee *et al* 2001 y Cragg y Newman 1999 citados por Civjan 2012)

Se han sugerido dos modelos que explican la abundancia química de los productos naturales en las plantas. En el primer modelo se estima que los metabolitos secundarios se producen para estar involucrados en las respuestas fisiológicas durante las interacciones con su entorno biótico y abiótico. Por lo tanto la abundancia de compuestos producidos por la planta dependerá de las estrategias de vida y de defensa a las que se enfrenta (Cragg y Newman 2004 y Oberlies y Kroll 2004 citados por Civjan 2012). El segundo es un modelo evolutivo, que sugiere que una importante actividad biológica es una propiedad rara generada por un producto natural presente y por lo tanto no le crea ningun valor a la planta productora (Itokawa *et al.*,2000 citado por Civjan 2012). Este modelo se basa en la hipótesis de Proyección de Jones y Firm 2003, citado por Civjan (2012), que sugieren que los organismos que producen mayor número de productos naturales tienen mayor posibilidad de mejorar (es decir, términos evolutivos) ya que la diversidad química será mayor, al igual que la probabilidad de producir metabolitos con actividades biológicas importantes y útiles (Civjan 2012).

Las características químicas (en términos de metabolitos secundarios) están directamente relacionados con los sistemas biológicos, los cuales son altamente perturbados por cualquier factor experimental o del medio ambiente, tales como la dieta, la temperatura, la fase de crecimiento, la edad, los nutrientes, su entorno natural entre otras (Alvarez *et al.*, 2010; Croteau *et al.*, 2000 citado por Villa *et al.*, 2011). Por esta razón y otras

mas, las plantas son la base de los sistemas tradicionales de salud (Agrawall 2009; Daur 2015), puesto que juegan un papel importante en el desarrollo de nuevos fármacos (Agrawall 2009), dado que hoy en día existen gran cantidad de productos terapéuticos hechos a base de estas (Hall, et al., 2002).

Para estudiar los metabolitos secundarios se han desarrollado diferentes herramientas y en los últimos años se ha desarrollado un concepto más holístico para su estudio: La metabolómica. Esta área es la última de las ciencias ómicas. Desde la década de los noventa, ha emergido con fuerza (Ciberdem, 2013). Es el estudio y comparación de los metabolomas, es decir, la colección de todos los metabolitos (moléculas de bajo peso molecular) presentes en muestras biológicas (fluidos, tejidos, cultivos celulares entre otros) (Goodacre *et al.*, 2004; Sumner *et al.*, 2003; Kell 2004). Los metabolitos son entidades químicas producto final de todos los procesos celulares (Nirbhay *et al.*, 2015), por tanto, los metabolitos son más cercanos a un fenotipo o a enfermedad genética o a información de proteómica, y por ello la metabolómica ha sido utilizada para identificar biomarcadores de enfermedades (Worley y Powers 2013).

Esta es una nueva área de la bioinformática que analiza el flujo final de la información metabólica en la expresión fenotípica. En el análisis metabolómico se generan datos multi y megavariados por la presencia de miles de metabolitos secundarios. Por lo que se usa un proceso estadístico conocido como Análisis Multivariado para la reducción de datos y procesamiento en función de sus similitudes y diferencias metabólicas. (Choi 2005 citado por Cardoso y Villarreal, 2007; Carrasco y Gómez, 2012).

Existen dos rutas de trabajo en la metabolómica (Fig. 4.1). La primera ruta (Fig. 4.1-A) es un proceso de perfilado donde no se tienen patrones y por ello se discriminan y reducirán datos mediante Análisis de Componentes Principales (PCA) para luego hacer una identificación de los metabolitos. En la segunda ruta de trabajo (Fig. 4.1-B), se busca un(os) metabolito(s) específico(s), a partir de

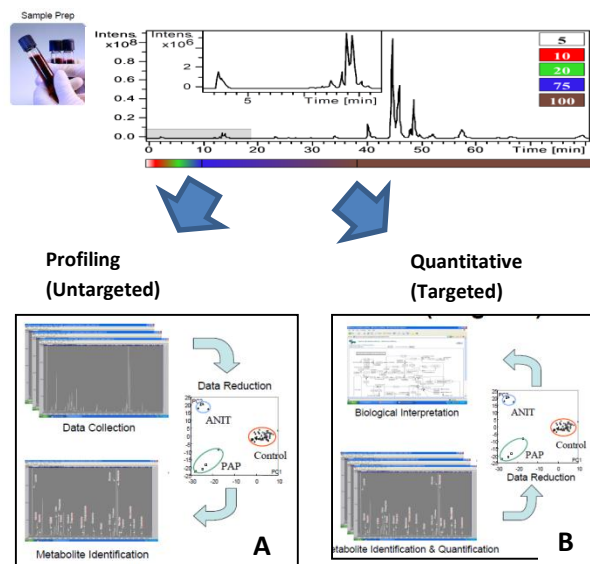


Figura 4.1. Rutas del proceso metabolómico.

patrones (puede ser aquellos obtenidos en la primera ruta), los cuales se cuantificarán y se reducirán los datos e interpretarán los resultados biológicos de un determinado metabolito o grupo de metabolitos (Goodacre et al., 2004; Harrigan y Goodacre 2003).

La metabolómica se ha aplicado a diversos campos, entre los que se cuenta el estudio de las plantas medicinales, lo cual ha aportado conocimiento valioso para contrarrestar enfermedades devastadoras como el cáncer, el SIDA, la malaria (paludismo), la diabetes, que afectan gran parte de la población mundial (Villa, *et al.*, 2011). Con base en lo anterior, en el presente capítulo se busca discriminar los datos cuantitativos y de perfil químico con el fin de establecer relaciones en el metabolismo expresado.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Análisis de datos

Se utilizó regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA), análisis de componentes principales (PCA) y análisis de agrupación jerárquica (HCA), implementando el software SIMCA (v 13.3, Umetrics), con el fin de identificar patrones en los datos y expresarlo de tal forma que resalte las similitudes y diferencias entre las muestras. Inicialmente se realizó el análisis discriminante con todos los datos de cada una de las partes evaluadas (hojas, tallos, fruto y flor), supervisado con los datos de FRAP y DPPH. Posteriormente se realizaron dos grupos de análisis PCA: en el primero se tomaron los resultados obtenidos mediante caracterización de fenoles y flavonoides totales y su capacidad antioxidante (DPPH y FRAP) (Capítulo 2) como observaciones. En el segundo grupo de análisis se discriminó tanto la caracterización y capacidad antioxidante más los datos arrojados por los perfiles cromatográficos (HPLC, Capítulo 3) luego de ser alineados, como observaciones. En ambos casos se costuyeron las matrices [como observaciones vs variables (muestras)] y se importaron en el algoritmo multivariado de PCA. Las similitudes se calcularon sobre la base de la distancia euclídiana mediante HCA y se obtuvo cada dendograma imponiendo jerarquía y comparando los resultados entre los grupos formados. El método COW modificado por Skow *et al.*, (2006), utilizado en este trabajo tiene como objetivo alinear los cuatro perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC por tramos o partes, con estiramiento y compresión según el eje de tiempo. Esto consiste en dividir los perfiles cromatográficos en una serie de secciones y escoger la solución más óptima, es decir, deben permanecer en el mismo orden y no solaparse, para esto se debe tener en cuenta el eje de tiempo (Nielsen *et al.*, 1998). Este método se realizó con ayuda del programa Matlab

® 2013a. La alineación se hizo por parte de la planta, para esto se seleccionó una muestra como referencia para cada una de las partes (hojas, tallos, frutos y flores). La elección de la muestra referencia se realizó teniendo en cuenta la muestra con mayor número de picos.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Análisis multivariado con datos cuantitativos espectrofotométricos

El análisis de componentes principales (PCA), procedimiento de reconocimiento y reducción de patrones multivariados (Cheng *et al.*, 2015; Yi *et al.*, 2015) y el análisis de conglomerados jerárquico (HCA) son dos enfoques principales en Quimiometría (Yi *et al.*, 2015). En la presente sección se encontraron patrones que determinan diferencias en los datos químicos o cuantitativos obtenidos a partir de espectrofotometría (contenido total de fenoles, contenido de flavonoides totales y capacidad antioxidante) de diferentes partes de la planta *B. latifolia* (hojas, tallos, fruto y flor), con el fin de caracterizar y referenciar la química de la planta, la cual es la base del metaboloma, y de esta manera discriminar los cambios totales relacionando las variables externas o datos cualitativos. Cabe resaltar que este análisis no se considera un análisis metabólico ya que únicamente se está estudiando una característica de la planta y no el conjunto completo de los metabolitos (Cardoso & Villarreal, 2007). Cabe también destacar que en todas las partes de la planta el componente principal 1 (CP1) explica la totalidad de la variabilidad (100% del CP1).

Los resultados del PCA indican que las muestras de hoja fueron separadas a lo largo del primer componente principal (Fig 4.5). Fueron excluidas las muestras **H6** y **H11** porque tienen la más baja capacidad para inhibir los radicales libres DPPH. En el análisis de agrupamiento jerárquico (dendograma) se sugirieron cinco grupos. Los extractos de los grupos 1 y 2 tienen la mayor capacidad reductora. El grupo 3 presenta las muestras con un poder reductor medio entre todas las muestras, mientras los grupos 4 y 5 son los que menor capacidad reductora mostraron y, además, agrupa las plantas con un estado fenológico dado por la presencia de frutos y flor, respectivamente. Los fenoles y flavonoides están influenciados más que todo con la capacidad antioxidante relativa al poder reductor. La mayoría de las muestras de hojas tienen una alta capacidad para inhibir los radicales libres excepto las muestras excluidas.

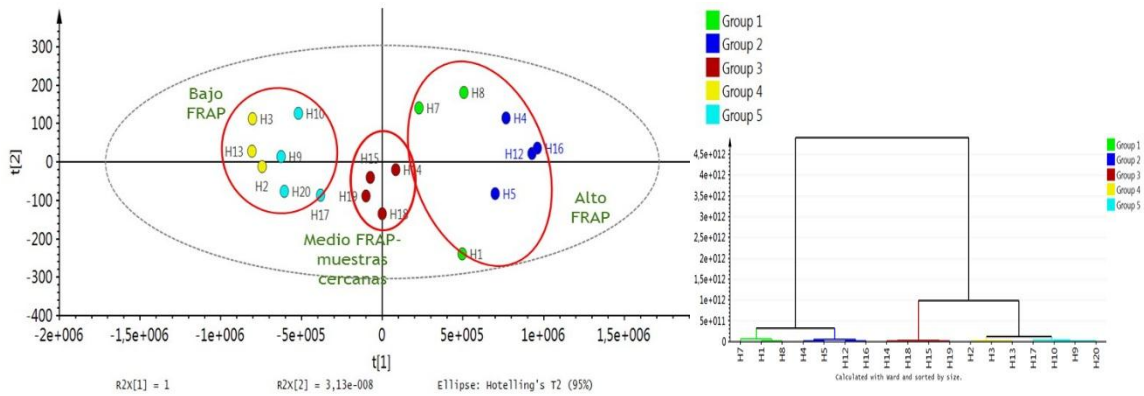


Figura 4.2. Análisis de componentes principales (PCA) de la caracterización química. Score scatter plot (izquierda) y dendograma (derecha) de hojas de *B. latifolia*.

En cuanto a los extractos de tallos fueron excluidas las muestras **T8** y **T11** porque presentaron la más baja capacidad para inhibir radicales libres. El dendograma (Fig 4.6) agrupó las muestras en cinco grupos. El 1^{ro} y 2^{do} grupo reúne los extractos con el mayor poder reductor, siendo el grupo 2 más reductor que el grupo 1; los grupos 3 y 4 comparten extractos con un poder reductor medio entre las muestras, además se caracterizan por tener flores y/o frutos excepto el extracto **T6**. Finalmente el grupo 5 representa los extractos con el menor poder reductor de radicales Fe⁺³. La gran mayoría de las muestras de tallos mostraron ser activas, indicando que necesitan una concentración baja para inhibir los radicales libres, excepto **T8** y **T11** los cuales fueron excluidos en el PCA. Una particularidad fue en la planta **BL11**, pues tanto en hojas como tallos mostraron no tener capacidad suficiente para inhibir radicales libres.

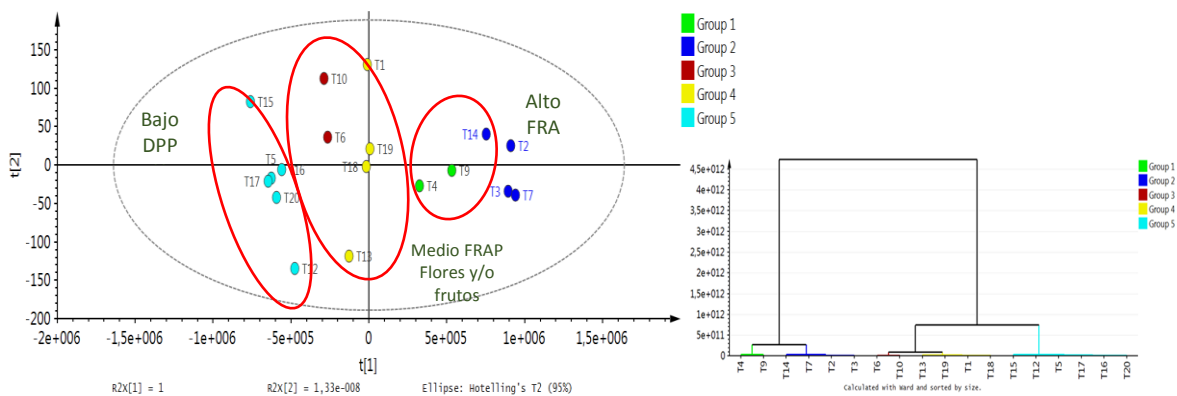


Figura 4.3. Análisis de componentes principales (PCA) de la caracterización química. Score scatter plot (izquierda) y dendograma (derecha) de tallos de *B. latifolia*.

Los frutos (Fig 4.7) fueron agrupados en cuatro clústeres donde el grupo 1 corresponde al extracto **Fr9**, el cual fue tratado como dato atípico por estar tan distante del resto de los datos, dado que fue el que mayor cuantificación y capacidad antioxidante presentó a diferencia de los demás extractos. El grupo 2 corresponde al extracto con menor poder reductor; mientras que los grupos 3 y 4 son los extractos con una capacidad reductora en un rango intermedio a comparación de los demás extractos.

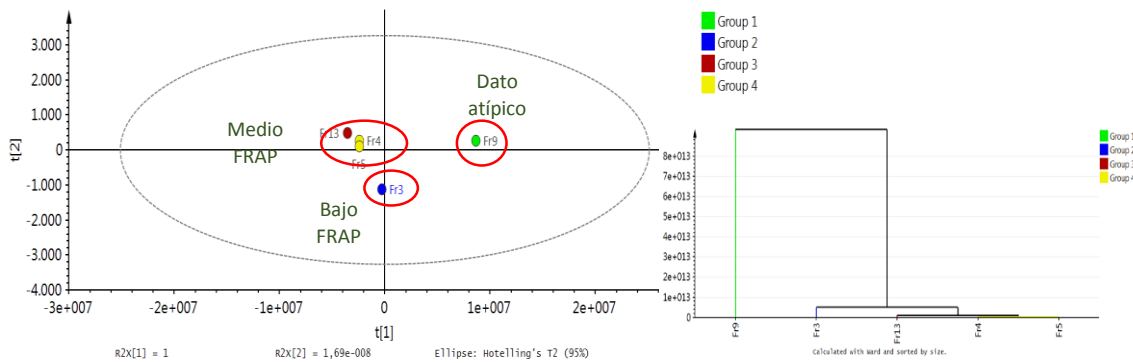


Figura 4.4. Análisis de componentes principales (PCA) de la caracterización química.

Score scatter plot (izquierda) y dendograma (derecha) de frutos de *B. latifolia*.

Finalmente el dendograma de extractos de flor (Fig 4.8) sugiere cuatro grupos, donde el grupo 1 corresponde a la especie *B. macrantha* y que tuvo un poder reductor medio en comparación con las demás muestras; los grupos 2 y 3 reúnen los extractos con mayor poder reductor, además agrupó las muestras que presentaban los cuatro órganos; el grupo 2 corresponde a los extractos con menor capacidad reductora. Todos los extractos mostraron ser activos, es decir que se necesita una concentración baja para inhibir los radicales libres.

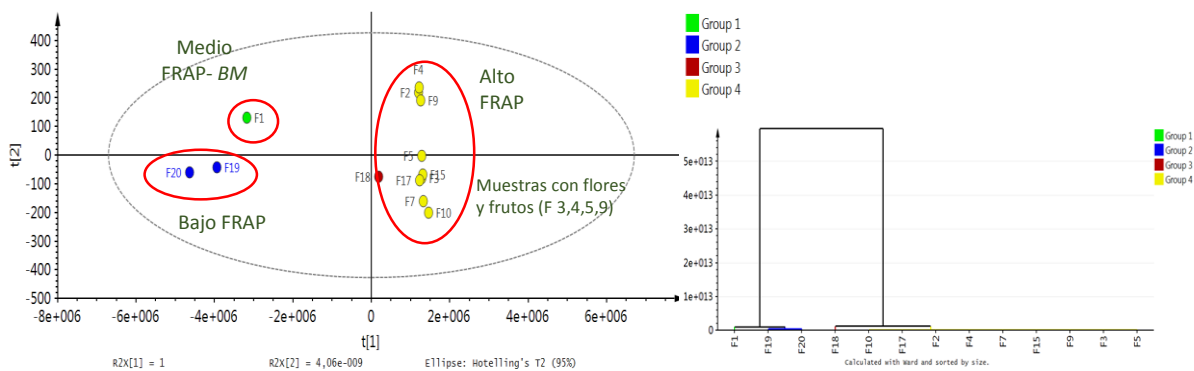


Figura 4.5. Análisis de componentes principales (PCA) de la caracterización química.

Score scatter plot (izquierda) y dendograma (derecha) de flores de *B. latifolia*.

Las agrupaciones observadas en cada una de las gráficas con los datos del análisis quimiométrico se debieron en gran parte a la capacidad reductora, sin embargo las muestras excluidas del análisis estaban principalmente influenciadas por la capacidad inhibitoria de radicales. Además, el estado fenológico de la planta influyó únicamente en las hojas, viendose afectados por los cambios fenológicos según el estudio, lo cual se atribuye a que al producir frutos y flores reduce o cambia la distribución de nutrientes o la especialización de órganos, las demás no fue clara su distinción ni agrupación. En cuanto al entorno y estado de la planta, no se encontró discriminación en el análisis químico, lo cual puede llevar a pensar que el ambiente y otros factores no contemplados por dificultades en su definición, afectaron la producción de metabolitos de una forma asociada a las condiciones de muestreo, la cual fue completamente al azar. Todo lo anterior indica que, para el caso de *B. latifolia*, es necesario un estudio adicional donde se tengan en cuenta de manera rigurosa variables medibles del ambiente, como la radiación, la precipitación, las plantas vecinas y posibles amenazas.

Barros *et al.*, (2010), quienes realizaron un estudio químico comparativo entre hojas, flores, frutos y tallos de *Malva sylvestris*, reportaron que la composición química y propiedades medicinales dependen de la parte de la planta que se estudie. Esto se debe a que cada órgano enfrenta distintas situaciones. Por ejemplo, las hojas son el principal órgano fotosintético de las plantas, por lo tanto deben defenderse a cambios bruscos en la radiación, también el aumento o disminución en la precipitación, a la depredación de los animales, además sufren la reducción de nutrientes en la etapa de floración y fructificación, por lo que era de esperarse que presentará características diferentes a los demás órganos, como se evidenciará en el análisis OPLS-DA en una sección posterior.

4.3.2 Análisis multivariado con perfiles cromatográficos

Similar a lo realizado en la sección anterior (con datos cuantitativos), se realizó un análisis multivariado a partir de los datos obtenidos de los perfiles cromatográficos por cromatografía líquida de alta eficiencia de las diferentes partes de las plantas BM y BL donde se sometieron a PCA y HCA, como parte del proceso conocido como perfilado metabólico o análisis metabólico no supervisado y no dirigido. En este caso, los datos a utilizar expresaron una amplia información que abarca de forma general y completa el estudio de los metabolitos secundarios, pues relaciona los datos cuantitativos, con las características ambientales (externas e internas), el sistema de defensa, genética de la planta, entre otras. A este análisis se le llama análisis metabólico, porque es el estudio en conjunto de los

metabolitos y sus posibles influencias. Con este tipo de estudios se espera encontrar relación de los metabolitos detectados con las variables evaluadas, tal como el análisis químico, entorno, influencia ambiental, estado fenológico, y estado de la planta.

Por ejemplo, Muller *et al* (2015), evaluaron los efectos del ambiente con diferentes intensidades de radiación fotosintética: dos intensidades de 906 y 516 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con y sin radiación UV-B (0 y 0.4 W m^{-2}), para evaluar la producción de algunos metabolitos como lignanos y hinoquinina en hojas y tallos de *Hydrocotyle leucocephala*. Ellos encontraron las condiciones del ambiente afecta la producción de metabolitos, pues en tallos se encontró un mayor contenido de hinoquinina y la acumulación era mejor en una exposición de radiación UV-B baja, por lo que lo atribuyen a que la hinoquinina contribuye a la estabilización de la pared celular y por lo tanto a una mayor resistencia a factores ambientales. También concluyeron que la concentración de los compuestos dependía del órgano de la planta, la edad de la hoja, los regimenes de luz, y la duración de la exposición. Mediante el análisis de componentes principales (PCA) con los datos extraídos del HPLC-UV encontraron diferencias y similitudes entre los órganos de la planta y las fechas de cosecha.

Dado el anterior panorama, y de forma análoga, en la presente sección se busca discriminar entre todos los datos posibles con el fin de establecer las relaciones en el metabolismo expresado.

Los datos del análisis multivariado sobre los extractos de hojas indican que el componente principal 1 (CP1) explicó hasta 31.5 % de la varianza total y PC2 explicó el 25.1 %. Así el gráfico explicó un total del 56,6 % de la variabilidad en los datos correspondientes a extractos de hojas. El análisis de agrupamiento jerárquico (Fig. 4.9) sugirió seis agrupamientos, donde los grupos 1 y 2 se caracterizaron por muestras con flores y frutos, excepto **H15** y **H18** que solo presentaban flores; los grupos 3 y 4 se caracterizaron por estar en zonas cercanas a carreteras, pero también acompañadas de otra vegetación; en los grupos 5 y 6 todas las muestras excepto **H16** se caracterizaban por tener flores, sin embargo en el grupo 6 se agruparon las muestras **H13**, **H14**, **H15** y **H16** que son relativamente cercanos y se ubican al norte de Cundinamarca.

La agrupación dependiendo el estado fenológico de la planta coincide con lo reportado por Ruiz (2008), quien obtuvo resultados interesantes sobre la composición de la planta (*Lippia organoides*) en tres estados fenológicos distintos, encontró que en estado de floración las plantas aumentaron la cantidad de compuestos con actividad biológica tal

como timol y *p*-cimeno, además obtuvo mayor rendimiento de aceites esenciales al final de la floración.

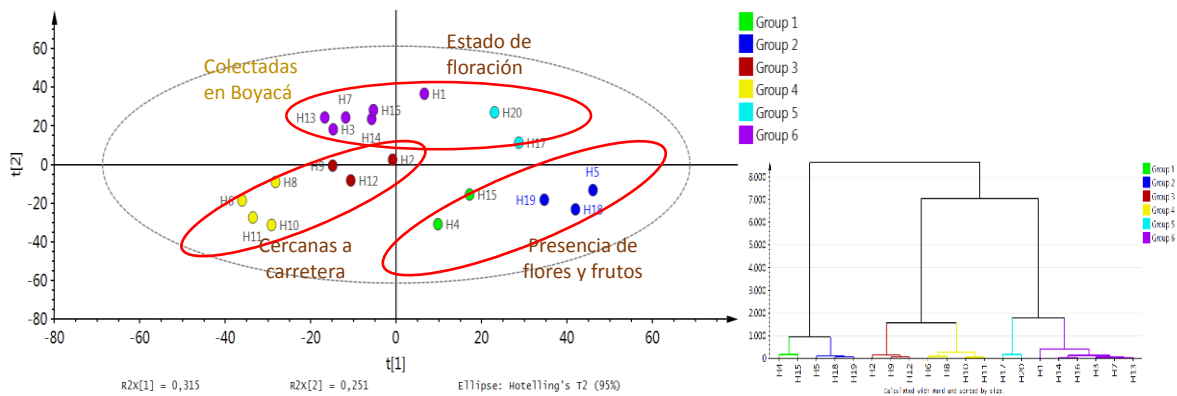


Figura 4.6. Análisis de componentes principales (PCA) con la caracterización química y perfiles cromatográficos. Score scatter plot (izquierda) y dendrograma (derecha) de hojas de *B. latifolia*.

En el PCA de tallos (Fig. 4.10) se excluyeron los extractos **T1**, **T8**, **T11** y **T13** por estar fuera de la elipse que implica el 95% de confianza, además los tres últimos extractos coincidieron con la menor capacidad captadora de radicales DPPH, mientras que **T1** presentó la mayor cantidad de fenoles totales a comparación de los demás extractos. El CP1 explicó hasta un 35.8 % de la varianza total y PC2 explicó el 17.9 %, con un total del 53 % de variabilidad en los datos. El dendrograma sugirió seis grupos donde, el grupo 1 corresponde a extractos con similitudes en el bajo poder reductor según el Test Tukey. El grupo 2 discriminó extractos que se encuentran relativamente cerca geográficamente, con un ambiente similar, las muestras están en estado de floración, además su perfil cromatográfico es similar, la mayoría de los picos presentan gran similitud en la intensidad de los mismos (Capítulo 3 Fig. 3,2-B). Estos dos grupos presentaron extractos con flores. El grupo 3 reunió dos extractos con similitudes en el contenido de flavonoides, pero además compartió con el grupo 4 similitudes en el contenido total de fenoles según el test Tukey. Los grupos 5 y 6 se distinguieron por tener contenidos de fenoles y poder reductor alto y medio, con ambientes relativamente bajos en niveles de contaminación. La elipse azul corresponde a las muestras que presentaban todos los órganos a la hora de la colección.

La contaminación ambiental puede llevar a consecuencias negativas al crecimiento y desarrollo de las plantas o positivas en cuanto a la producción de compuestos con actividad biológica (Konstantin *et al.*, 2014), con el fin de protegerse y resistir a su ambiente

(Kummerova et al., 2008, MacKinnon y Duncan, 2013 y Tang et al., 2011 citados por Konstantin et al., 2014).

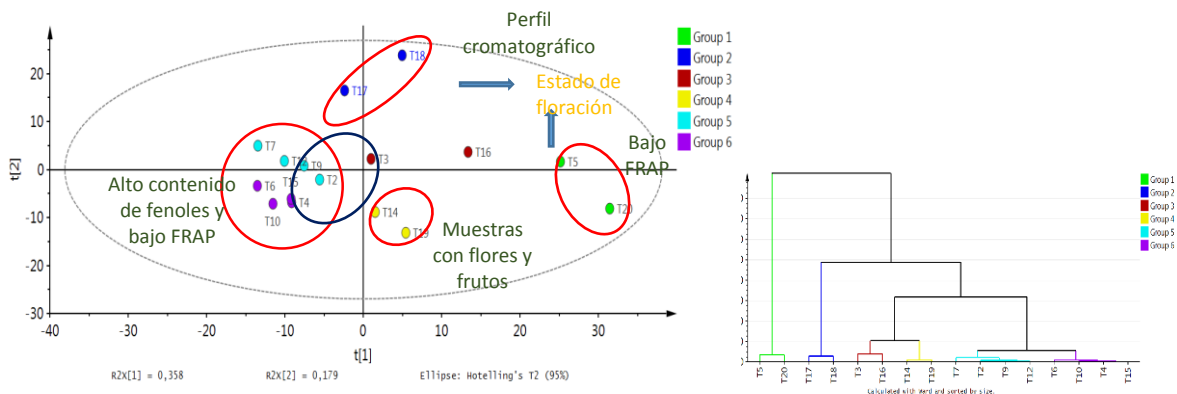


Figura 4.7. Análisis de componentes principales (PCA) con la caracterización química y perfiles cromatográficos. Score scatter plot (izquierda) y dendograma (derecha) de tallos de *B. latifolia*.

En cuanto al PCA de los extractos de frutos (Fig. 4.11) el CP1 explicó el 81 % de la varianza total y el CP2 explica el 16,6 %. De esta manera el gráfico explicó un 97.6 % de la variabilidad de los datos. El dendograma aglomeró los extractos en seis grupos. El grupo 1 fue excluido de los demás grupos por ser un dato atípico tanto en cuantificación de fenoles y flavonoides como capacidad antioxidante (FRAP y DPPH) (Capítulo 2), además en el cromatograma se distinguió el pico 35 que no fue detectado en los demás extractos. El grupo 2 se caracterizó por tener el valor más bajo en fenoles y en poder reductor; en este caso los pocos compuestos fenólicos cuantificados estuvieron relacionados con la capacidad captadora de radicales libres, por lo tanto, presentan la característica de hacer homólisis para generar un radical libre el cual atrapará el radical libre de DPPH (Muñoz y Ramos 2007). Éste también se diferenció por presentar mayor número de picos en el perfil cromatográfico a diferencia de los demás extractos. Los grupos 3 y 4 fueron similares en el contenido de fenoles, siendo el grupo 4 el de mayor contenido. En cuanto al contenido total de flavonoides ambos grupos fueron similares según el test de Tukey, así como en la capacidad antioxidante también fueron valores similares. Hay que resaltar igualmente que los extractos agrupados pertenecieron a las muestras colectadas en Monserrate tanto medio como alto.

Adicionalmente se evaluaron otra serie de factores como la temperatura, lluvia, estado de la planta, zona de la planta en relación a Cundinamarca (sur, norte, oriente, occidente), pero no se encontró relación con estas variables

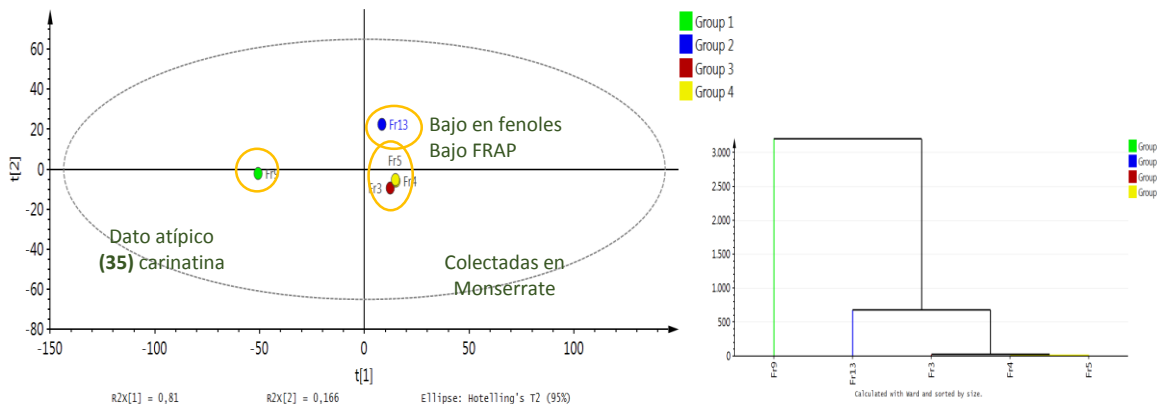


Figura 4.8. Análisis de componentes principales (PCA) con la caracterización química y perfiles metabólicos. Score scatter plot (izquierda) y dendrograma (derecha) de frutos de *B. latifolia*.

El PCA en los extractos de flor (Fig. 4.12) explicó un 51,1 % de la variabilidad de los datos (CP1=29,6%) y (CP2=21,5%). El análisis de agrupamientos jerárquico generó seis grupos. El grupo 1 correspondiente al extracto **F10** fue excluido de los demás ya que este es el que mayor poder reductor, además es el único de los extractos de las flores que presentó el pico **35** en el cromatograma, identificado tentativamente como alcaloide carinatina (Anexos- Tabla 3.7). Además es similar en el contenido total de fenoles con el grupo 2 (**F19**) según el test de Tukey. Ambas plantas se encontraron en zonas relativamente cercanas geográficamente. El grupo 2 presentó dos compuestos mayoritarios **5** y **12** que a diferencia de los demás extractos, son detectables en **F19**. En el grupo 3 se encontró la muestra correspondiente a *B. macrantha* por lo que se le atribuye que sea única en su grupo; los extractos del grupo 4 presentaron frutos y son similares en el poder reductor. El grupo 5 contuvo dos extractos que coinciden con el mayor contenido de fenoles y flavonoides a diferencia de los demás extractos, además presentaron la mejor capacidad captadora de radicales DPPH y un alto poder reductor. Finalmente, el grupo 6 que reunió el mayor número de extractos, los cuales fueron similares en cuanto al contenido medio de fenoles según el test Tukey, al igual que valores cercanos en cuanto al poder reductor. Lo anterior permite deducir que la composición química de los compuestos fenólicos presentes

en los extractos de flor y su estructura contribuyen a la reducción del ión Fe^{3+} a Fe^{2+} (Amzad y Dawood 2011; Asami *et al.*, 2003).

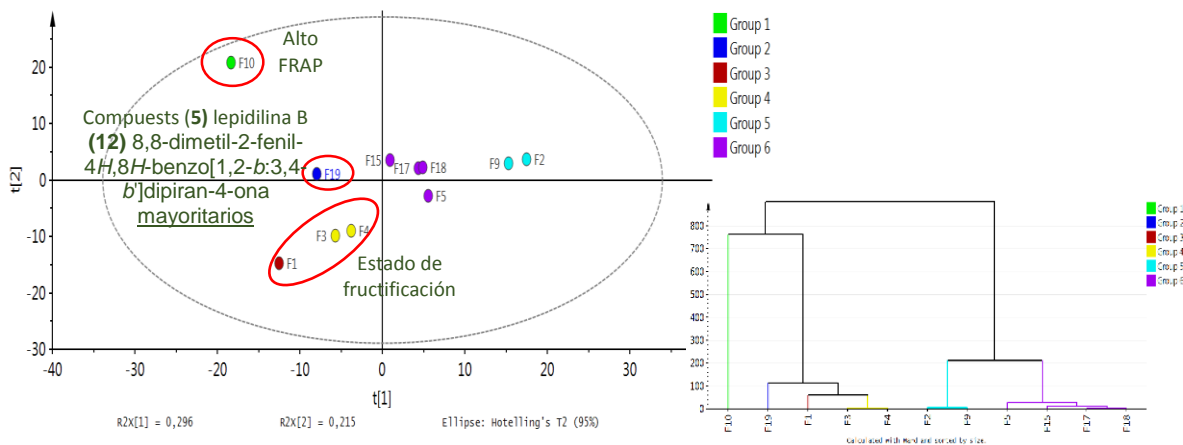


Figura 4.9. Análisis de componentes principales (PCA) con la caracterización química y perfiles metabólicos. Score scatter plot (izquierda) y dendrograma (derecha) de flor de *B. latifolia*.

Las agrupaciones observadas en cada PCA se debieron al análisis de datos cuantitativos (fenoles y flavonoides totales, y capacidad antioxidante DPPH y FRAP). En varios casos, las muestras fueron agrupadas según el análisis estadístico del Test de Tukey. También se agruparon por similitudes en la detección de compuestos según el cromatograma y algunas muestras se agruparon dependiendo de su similitud en la ubicación espacial. Además se encontró que algunas características como la presencia de flores y/o frutos influyó en la detección de algunos picos a diferencia de otros sin la presencia de estos. El resultado obtenido era el esperado, pues un análisis metabólico se considera como el análisis exhaustivo tanto cualitativo y cuantitativo de todos los metabolitos detectables o moléculas de bajo peso molecular (Fiehn 2001), por lo tanto se proporcionó una visión global (es decir, holística) de los metabolitos (Worley y Powers 2013) mediante el análisis químico de la planta y cromatográfico de la misma. Toda esta gran versatilidad de las plantas (y en este caso de *B. latifolia*), se debe a la plasticidad de ellas, es decir la capacidad de un organismo de cambiar o “moldearse” en respuesta a las condiciones genéticas y ambientales que las rodea para poder sobrevivir, por esta razón se podría considerar que no existen dos plantas como organismo idénticos (Campbell y Reece 2005)., lo cual coincide con la variabilidad entre el mismo órgano de la planta pero diferente muestra.

4.3.3 Análisis discriminante

4.3.3.1 OPLS-DA total

Se realizaron varios análisis discriminantes con características como el lugar, la ubicación, el entorno, pero no se encontró mayor relación. Sin embargo, se construyó un análisis discriminante por parte de la planta, OPLS-DA supervisado (Fig 4.2- A) con todos los datos tanto cuantitativos como cromatográficos. El componente principal 1 (CP1) explicó hasta 28 % de la varianza total y CP2 explicó el 0,07 %. Por lo tanto el gráfico explica 28,07 % de la variabilidad en los datos correspondientes, el porcentaje restante es explicado por otras variables. Como era de esperar, se observó una clara separación de las cuatro partes estudiadas (Fig. 4.2). Se observa que las hojas y los tallos se discriminaron, mientras que los frutos y las flores comparten similitudes. En este análisis se observa que cada parte de la planta es independiente a las demás, que aunque se hayan encontrado algunas similitudes entre ellas, como la influencia de la capacidad antioxidante en la gran mayoría de los datos, la alta similitud en los cromatogramas de hojas y tallos, aun así el análisis discriminante muestra una clara distinción y diferenciación. Este resultado coincide con los reportado por Barros *et al.*, 2010, quienes revelaron que las hojas presentan diferentes propiedades respecto a los frutos, tallos y flores.

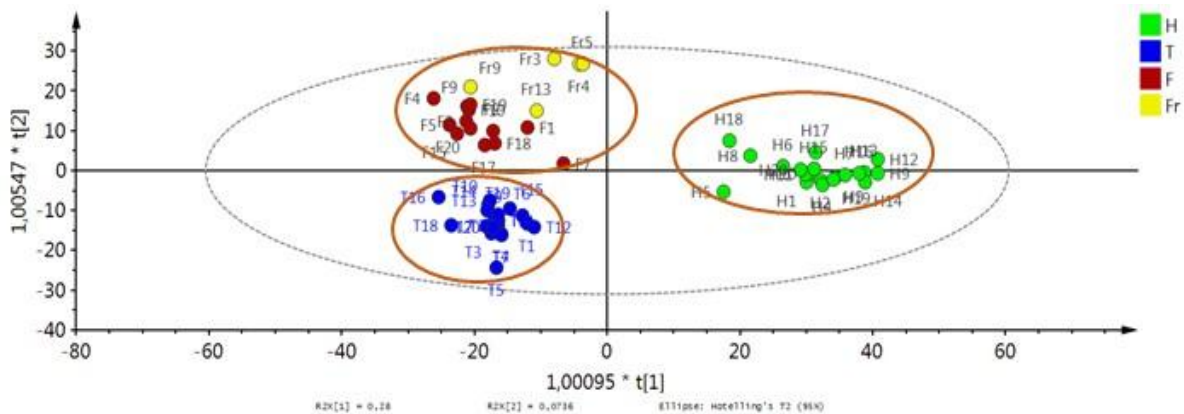


Fig 4.10 Análisis discriminante OPLS-DA por órgano de la planta.

4.3.4 Análisis supervisado

4.3.4.1 Score plot y S-line supervisado con FRAP

El score plot (Fig. 4.3-A bajo la supervisión de FRAP, se observa que el CP1 explicó un 11% y el componente ortogonal el 35.2% del modelo. A lo largo del CP1, se ubicaron las muestras de tallos y hojas en la zona negativa, pues son las muestras menos activas (menor capacidad antioxidante relativa al poder reductor), mientras que las muestras de flores y frutos (estos dos órganos con valores altos similares) se posicionaron en la parte positiva

de la regresión. **Fr9** se muestra como un dato atípico pues es el extracto con un alto valor tanto en cuantificación como actividad antioxidante a diferencia de lo demás extractos.

En el S-line (Fig. 4.3-b) se observó que tres picos mayoritarios que están aportando e influenciando el comportamiento de las muestras bajo la supervisión con FRAP. Estos picos pertenecen a los compuestos identificados tentativamente como rupestrina A con un $tR=8,92$; maitolina ($tR=9,54$) y tricalisiamida B ($tR=9,96$) (Cap. 3). Dada la supervisión, es posible indicar que estos tres compuestos serían los principalmente responsables de la capacidad reductora, ya que se encuentran presentes en los extractos más activos. Esto permite recomendar que, en un estudio futuro, se aislen estos compuestos con el fin de validar este hallazgo mediante estadística multivariada.

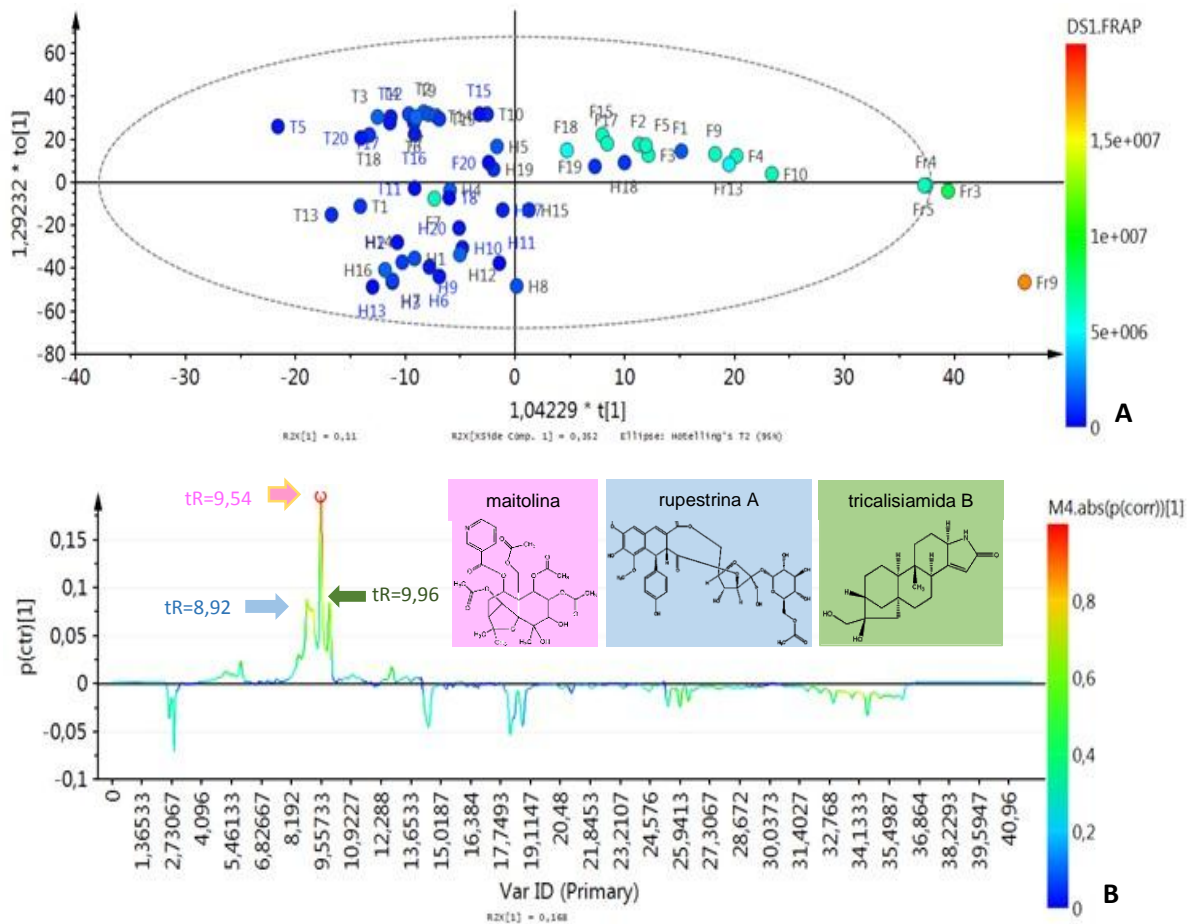


Fig 4.11 Score plot (A) y S-line (B) supervisado por FRAP

4.3.4.2 Score plot y S-line supervisado con DPPH

De la misma manera se construyó el score plot (Fig 4.4-A) y S-line (Fig 4.4-B) pero ahora bajo la supervisión con DPPH. En este se observó una dispersión más amplia, pues no se hizo distinción entre las partes de la planta, dada la baja correlación encontrada con la

capacidad captadora. En el óvalo se observa un grupo de extractos mezclado de todos los órganos, y los demás cercanos, esto se debe a que la mayoría de muestras son activas, indicando que necesitan una baja concentración para inhibir los radicales libres. El componente ortogonal explicó el 35.2% de la varianza total, el cual permitió discriminar las muestras con baja capacidad de inhibir radicales libres. La regresión inició con el extracto **H6**, el cual se sale de la tendencia porque es el que mayor valor de IC_{50} tiene, por lo tanto es el menos activo, tanto que se considera dato atípico. Caso contrario sucede con **H20** que se encuentra fuera de la tendencia de los extractos más activos, y al otro extremo de la regresión, dado que este extracto presentó la mayor capacidad de capturar radicales DPPH.

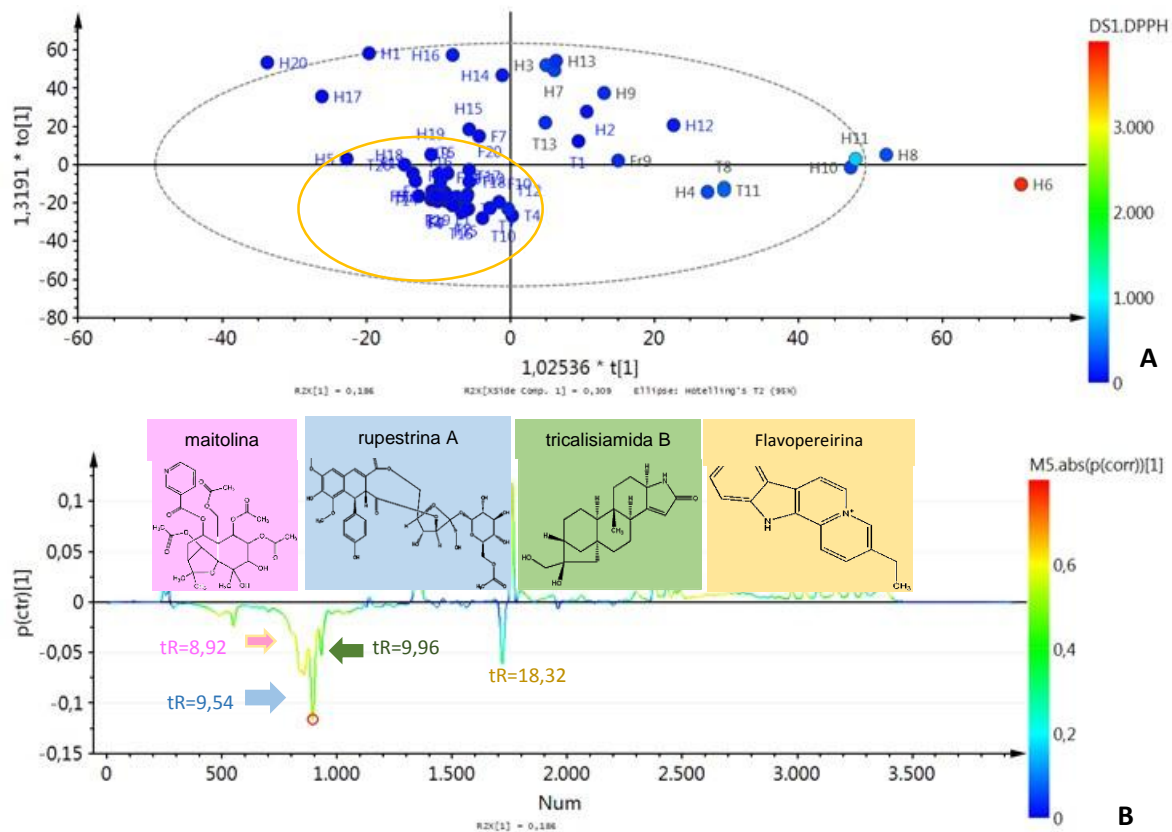


Fig 4.12 Score plot (A) y S-line (B) supervisado por DPPH

El S-line nos indica también que hay tres picos o compuestos mayoritarios que están influenciando el comportamiento de las muestras. Los compuestos identificados tentativamente son: rupestrina A con un $tR=8,92$; maitolina ($tR=9,54$) y tricalisiamida B ($Tr=9,96$), los cuales coinciden con aquellos compuestos que influyen en FRAP. Esto quiere decir que estos compuestos muestran correlaciones tanto con FRAP como DPPH, es decir,

tienen capacidad de inhibir de los radicales libres y también capacidad antioxidante relativa al poder reductor.

4.4 Conclusiones

B. latifolia es una planta con un perfil metabólico bastante amplio, perfecto para encontrar moléculas biológicamente activas. La importancia de un estudio holístico como el que se llevó a cabo en este capítulo, donde se relacionaron y se discriminaron las diferencias y similitudes tanto de la caracterización química como de los perfiles cromatográficos, permitió una visión amplia de lo que afecta a los metabolitos secundarios de las plantas. El perfil metabólico es el conjunto de características que afecta las plantas. Por esta razón, el análisis químico, el estado fenológico, las condiciones de la planta, ubicación y los perfiles cromatográficos fueron evaluados para establecer el perfil metabólico de *B. latifolia*.

En el OPLS-DA se observó que cada órgano se comporta de manera distinta, principalmente las hojas y los tallos, mientras que existen similitudes entre flores y frutos. Además observamos la correlación de las muestras, hacia la capacidad reductora de hierro y la captura de radicales libres.

También se observó que algunos compuestos fueron detectados en todos los órganos pero no en todas las muestras, por lo tanto los compuestos dependen de la variabilidad de las plantas al momento de su colecta. Otra característica que puede afectar los metabolitos secundarios son los estados fenológicos, en este caso la fase de floración y fructificación provocaron un cambio en la caracterización química de los extractos, esto se atribuye a que se requiere de un gasto de energía, además de la especialización celular que se necesita para la formación de tales órganos. Por lo tanto los metabolitos secundarios cambian según la fase fenológica de la planta, lo cual complementa lo que dice Itokawa, 2000 citado por Civjan (2012).

Además, los metabolitos secundarios proveen beneficios a la planta productora, como sucedió con **H2O**, este extracto presentó el mayor contenido de flavonoides a comparación de los demás extractos, debido a que fueron hojas expuestas a un alto grado de contaminación, pues estaban ubicadas en una zona urbana con bastante influencia de transporte pesado. Entonces se concluiría que dependiendo de los requerimientos y estrategias para sobrevivir, las plantas generan o aumentan la producción de ciertos

compuestos químicos que le ayuden a enfrentar diferentes amenazas, tal como los flavonoides.

Este estudio aportará las bases para nuevas investigaciones, donde se podría tener en cuenta otra serie de variables las cuales son influenciadas por el ambiente, como la exposición a la luz, la flora y fauna que los rodea y que posiblemente puede generar estrés y cambios en su perfil metabólico. Para esto se recomienda el uso de plantas bajo ambientes controlados y estandarizados con diferentes variables que promuevan posibles cambios en la expresión metabólica.

4.5 Referencias

- ✚ Agrawal, S. 2009 *Advances in Medicinal Plants*. Oxford Book Co, pp 1- 15.
- ✚ Álvarez, B., Priego, F., Luque, MD. 2010. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29, 2, pp. 111-119.
- ✚ Amzad, M., Dawood, M. 2011. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of Chemistry*, 8, 1, pp 66-71.
- ✚ Asami, D., Jeong, Y., Barrett, D., Mitchell, A. 2003. Comparison of the Total Phenolic and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Grown Using Conventional, Organic, and Sustainable Agricultural Practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 1237-1241.
- ✚ Barros, L., Carvalho, A., Ferreira, I. 2010 Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: A comparative study of the nutraceutical potential and composition. *Food and Chemical Toxicology*, 48, pp. 1466-1472.
- ✚ Campbell, N., Reece, J. 2005. *Byology*. 7°ed. Pearson Education, Inc, pp. 710-717.
- ✚ Carrasco, A., Gómez, M. 2012. Técnicas separativas acopladas a espectrometría de masas (GC-MS, LC-MS Y CE-MS) en el ámbito de la Metabolómica. *Boletín Graseqa* N° 2.
- ✚ Cardoso, A., Villarreal, L. 2007. Estudio metabolómico-farmacológico *in silico* de poblaciones de la Planta ansiolítica y sedante *galphimia glauca*. Centro de investigación en biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

- ✚ Ciberdem. 2013. Centro de investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas. Recuperada en la página de internet <http://www.ciberdem.org/metabolómica.php> el 10 de agosto del 2013.
- ✚ Civjan, N. 2012. *Natural Products in Chemical Biology*. John Wiley & Sons
- ✚ Cheng, H., Chen, J., Chen S., Wu, D., Liu, D. 2015. Characterization of aroma-active volatiles in three Chinese bayberry (*Myrica rubra*) cultivars using GC–MS–olfactometry and an electronic nose combined with principal component analysis. *Food Research International*, 72, pp. 8-15.
- ✚ Daur, I. 2015. Chemical composition of selected Saudi medicinal plants. *Arabian Journal of Chemistry*, 8, 3, pp. 329- 332.
- ✚ Fiehn, O. 2001. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics*, 2, pp. 155-168.
- ✚ Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W., Harrigan, G., Kell, D. 2004. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data, 22, pp. 254-252.
- ✚ Hall, V., Rocha, M., Rodríguez, E. 2002. *Plantas medicinales, II*. Centro Nacional de Información de Medicamentos.
- ✚ Harrigan, G., Goodacre, R. *Metabolomic 2003. Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis*, pp 16- 23.
- ✚ Kell, D. 2004. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Current Opinion in Microbiology*, 7, pp. 296-307.
- ✚ Konstantin, P., Sharonova, N., Breus, I. 2014. The use of cluster analysis for plant grouping by their tolerance to soil contamination with hydrocarbons at the germination stage. *Science of the Total Environment*, 485 -486, pp. 71-82.
- ✚ Muller, V., Larkes, C., Albert, A., Barbro, W., Zimmermann, B., Noga, G., Hunsche, M. 2015. Concentration of hinokinin, phenolic acids and flavonols in leaves and stems of *Hydrocotyle leucocephala* is differently influenced by PAR and ecologically relevant UV-B level. *Journal of Plant Physiology*, 173, pp. 105-115.
- ✚ Muñoz A., Ramos F. 2007. Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Revista Horizonte Médico*, 7, 1, pp. 23- 31.
- ✚ Nielsen, N., Carstensen, J., Smedgaard, J. 1998. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. *Journal of Chromatography A*, 805, pp. 17-35.

- ✚ Nirbhay, S., Ulrich, H., Ayyalusamy, R. 2015. Bioanalytical methods for metabolomic profiling: Detection of head and neck cancer, including oral cancer. *Rev. Chinese Chemical Letters*, 06.
- ✚ Ruiz, C. 2008. Estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia orifanoides* H.B.K., en tres estados fenológicos. Trabajo de grado, título Químico, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga-Colombia.
- ✚ Skow, T., Berg, F., Tomas, G., Bro, R. 2006. Automated alignment of chromatographic data. *Journal of Chemometrics*, 20, pp. 484-497.
- ✚ Summer, L., Mendes, P., Dixon, R. 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, 62, pp. 817-836.
- ✚ Villa, R., Pacheco, H., Lara, Z., Franco, M. Cardeña B. Galván V. Ruiz G. 2011. Biotecnología de plantas medicinales generando fármacos de un futuro tornado presente. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 15 43, pp 13 – 20.
- ✚ Worley, B., Powers, R. 2013. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*, 1, pp. 92-107.
- ✚ Yi, Tao., Zhu, L., Peng, W., Cheng, X., Chen, H., Li, J., Tao, Z., Zhen, Z., Biao, H. 2015. Comparison of ten major constituents in seven types of processed tea using HPLC-DAD-MS followed by principal component and hierarchical cluster analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 62, pp. 194-201.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El presente trabajo de investigación es pionero en cuanto al estudio metabolómico de la especie *B. latifolia* (Asteraceae). Una planta que demostró tener un metaboloma bastante versátil, pues tiene características como su fácil adaptación, cambios provocados por los estado fenológicos, variabilidad en la composición química y datos cromatográficos dependiendo tanto de las plantas como de los órganos.

Se estudiaron en total 20 plantas, colectadas en diferentes lugares de Cundinamarca-Colombia, con características y requerimientos distintos. Se analizaron cuatro órganos de la planta (hojas, tallos, flores y frutos) y se generó un perfil químico (cuantificación de fenoles y flavonoides totales y su capacidad reductora e inhibitoria), donde se encontró que el contenido fenólico es mayormente influenciado por la capacidad relativa al poder reductor.

La ubicación (puntos cardinales) no presentó una distinción y agrupamiento claro, según lo percibido en el análisis multivariado, pero si su entorno generalizado, estado de la planta, contaminación, y estado fenológico (flores y/ frutos) afectaron el metaboloma de la planta.

Encontrar un metaboloma tan variable como el de *B. latifolia* abre la puerta para continuar la búsqueda de moléculas que permitan generar y fomentar el desarrollo de compuestos activos como alternativa terapéutica para el control de enfermedades, no solo contra enfermedades antiparasitarias, sino también antifúngicas, entre muchas otras.

Ahora, lo que queda es continuar la investigación con mayor rigurosidad, pues no conocemos con exactitud el o los responsables de dicha versatilidad, ni tampoco qué condiciones debe tener la planta para que se generen cierto tipo de compuestos con importancia biológica. Por esta razón es necesario hacer nuevamente estudios tanto cualitativos como cuantitativos, pero esta vez con plantas sembradas bajo condiciones y variables conocidas y controladas, por ejemplo, generando a las plantas un ambiente distinto entre ellas, con diferente iluminación, cambios de temperatura, condiciones de estrés, distintos sustratos entre otros ensayos interesantes de realizar. Cada uno de estos ensayos con los diferentes estados fenológicos de la planta. De esta manera se llevaría a la posible generación de un metaboloma más específico y reproducible, con mayor probabilidad de acercarse a aquellas moléculas que puedan producirse bajo condiciones controladas y así poder unificar las características influyentes para la obtención/aislamiento de este tipo de metabolitos en el laboratorio con el fin de ser evaluadas como producto

aislado en el escenario facilitado por la ResNet NPND en la búsqueda de activos antiparasitarios de Asteraceae.

Por último, gracias a la supervisión de la propiedad química asociada a la capacidad antioxidante, se recomienda aislar los compuestos identificados como responsables de tal capacidad para ser evaluados y de esta manera validar la información guiada estadísticamente.

Abreviaturas

AlCl ₃	tricloruro de aluminio
BL	<i>Baccharis latifolia</i>
BM	<i>Baccharis macrantha</i>
ccP	coeficiente de correlación de Pearson
DPPH	captura de radical libre
EAG	ácido gálico
ES	extracto seco
FeCl ₃	cloruro de hierro (III)
FRAP	poder antioxidante reductor del hierro
GC	cromatografía de gases
HCA	análisis de agrupación jerárquica
HPLC	cromatografía Líquida
HPLC-MS	cromatografía Líquida de alta eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas
IPBP	Instituto de Biología Farmacéutica y Fitoquímica
LC-DAD	cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos
QE	equivalentes de quercetina
nm	nanómetro
PC	componente principal
PCA	análisis de componentes principales
PLS	mínimos cuadrados parciales
PTFE	politetrafluoroetileno
ResNet NPND	Red de Investigación en productos naturales contra enfermedades desatendidas
R _f	Factor de retención
TFA	ácido trifluoracético
TLC	cromatografía de capa fina
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
t _R	Tiempo de retención
μL	microlitro

ANEXOS

CAPITULO 2: Cuantificación total de fenoles y flavonoides y actividad antioxidante de accesiones de (*B.latifolia*) asteraceaeTabla 2.1. Contenido de Fenoles y flavonoides IC₅₀ y FRAP

Plantas	Partes usadas	Fenoles Mg GAE/g de extracto seco	Flavonoides Mg EQ/g de ES	IC ₅₀ (mg mL ⁻¹)	FRAP uMTrolox/ g muestra
BM 1	Hojas	513,09 ± 14,10	99,02 ± 4,26	20,74	1,5x10 ⁶ ± 28197,9
	Tallos	332,29 ± 14,07	11,04 ± 0,45	29,90	1,1x10 ⁶ ± 10950,22
	Flor	275,97±122,97	10,20 ± 0,68	29,34	1.7x10 ⁶ ± 13640,67
BL 2	Hojas	81,32 ± 3,55	30,36 ± 1,80	81,96	3.3x10 ⁵ ± 25995,97
	Tallos	237,96 ± 5,75	11,82 ± 0,78	50,06	2.0x10 ⁶ ± 4403,60
	Flor	468,05 ± 16,45	49,16 ± 2,05	0,90	6.1x10 ⁶ ± 50015,27
BL3	Hojas	172,78 ± 8,92	59,21 ± 1,97	282,90	2.7x10 ⁵ ± 6606,40
	Tallos	177,94 ± 8,26	11,82 ± 0,78	61,57	2.0x10 ⁶ ± 61176,75
	Flor	201,32 ± 13,80	12,68 ± 1,80	38,59	6.2x10 ⁶ ± 20179,83
	Fruto	135,93 ± 4,81	6,6 ± 0,71	32,10	8.4x10 ⁶ ± 70794,83
BL4	Hojas	283,41 ± 22,46	48,06 ± 1,72	282,90	1.8x10 ⁶ ± 14098,97
	Tallos	171,67 ± 15,64	7,83 ± 0,50	52,20	1.4x10 ⁶ ± 32981,53
	Flor	482,72 ± 47,74	24,74 ± 0,62	0,98	6.1x10 ⁶ ± 95264,41
	Fruto	92,30 ± 12,36	6,7 ± 0,41	1,45	6.2x10 ⁶ ± 242237,72
BL5	Hojas	247,92 ± 15,32	23,93 ± 2,34	34,45	1.8x10 ⁶ ± 13346,02
	Tallos	171,80 ± 1,04	12,80 ± 0,81	59,92	4.7x10 ⁵ ± 13346,02
	Flor	271,40 ± 9,16	24,97 ± 0,53	11,38	6.2x10 ⁶ ± 40522,39
	Fruto	148,19 ± 23,54	6,7 ± 0,48	16,47	6.2x10 ⁶ ± 60317,19
BL6	Hojas	121,09 ± 4,92	35,20 ± 2,94	383,20	4.5x10 ⁵ ± 2010,57
	Tallos	232,43 ± 17,32	12,13 ± 0,52	49,63	8.4x10 ⁵ ± 45886,69
BL7	Hojas	144,32 ± 11,32	36,16 ± 1,90	251,20	1.3x10 ⁶ ± 31501
	Tallos	174,23 ± 5,19	10,90 ± 0,65	65,84	2.0x10 ⁶ ± 10993,44
	Flor	134,24 ± 11,90	11,82 ± 1,07	53,95	6.2x10 ⁶ ± 69625,35
BL8	Hojas	172,73 ± 13,31	50,94 ± 2,65	306,60	1.6x10 ⁶ ± 27974,14
	Tallos	59,98 ± 3,60	11,00 ± 0,42	580,80	2.3x10 ⁵ ± 10993,44

BL9	Hojas	209,69 ± 10,45	67,30 ± 2,53	182,70	4.5x10 ⁵ ± 8459,38
	Tallos	194,47 ± 15,87	15,36 ± 0,38	46,09	1.6x10 ⁶ ± 30561,65
	Flor	443,06 ± 28,13	43,97 ± 0,87	0,56	6.2x10 ⁶ ± 33246,44
	Fruto	6140,4 ± 416,84	40,4±4,28	168,00	1,7x10 ⁷ ± 4569484,19
BL10	Hojas	127,96 ± 14,48	42,54 ± 3,50	261,40	5,5 x10 ⁵ ± 39957,25
	Tallos	309,63 ± 11,30	12,08 ± 0,83	35,17	8,1 x10 ⁵ ± 19698,70
	Flor	103,13 ± 5,16	8,96 ± 1,01	60,11	6,4 x10 ⁶ ± 29902,25
BL11	Hojas	176,65 ± 9,43	54,88 ± 1,23	811,20	1,8 x10 ⁵ ± 4003,81
	Tallos	116,09 ± 6,19	20,39 ± 0,94	388,80	2,7 x10 ⁵ ± 9130,15
BL12	Hojas	181,55 ± 2,36	52,06 ± 2,10	108,30	2,0 x10 ⁶ ± 11604,22
	Tallos	90,56 ± 4,63	8,67 ± 0,62	140,70	6,2 x10 ⁵ ± 13346,02
BL13	Hojas	171,13 ± 6,49	37,83 ± 0,00	181,10	2,7 x10 ⁵ ± 8726,09
	Tallos	124,96 ± 3,77	17,62 ± 0,85	175,90	9,7x10 ⁵ ± 39241,07
	Fruto	78,15 ± 10,35	6,5 ± 0,57	70,81	5,1x10 ⁶ ± 60559,43
BL14	Hojas	178,85 ± 6,97	42,34 ± 1,61	91,82	1,2x10 ⁶ ± 74604,72
	Tallos	246,38 ± 28,09	15,71 ± 0,79	37,09	1,8x10 ⁶ ± 9166,82
BL15	Hojas	155,58 ± 7,22	28,87 ± 2,28	61,65	1,0x10 ⁶ ± 27390,46
	Tallos	267,84 ± 3,43	14,53 ± 0,37	33,34	3,4x10 ⁵ ± 20810,59
	Flor	215,94 ± 18,13	14,63 ± 1,98	25,14	6,2x10 ⁶ ± 64906,64
BL16	Hojas	161,80 ± 2,76	34,43 ± 1,64	110,80	2.0 x10 ⁶ ± 18260,31
	Tallos	186,09 ± 6,51	11,64 ± 0,66	61,62	5,4x10 ⁵ ± 55410,74
BL17	Hojas	192,37 ± 10,06	24,22 ± 0,65	43,03	6,9x10 ⁵ ± 46416,90
	Tallos	162,78 ± 7,73	12,19 ± 0,20	51,18	4,5x10 ⁶ ± 16538,91
	Flor	195,44 ± 16,33	8,78 ± 0,89	24,39	6,1x10 ⁶ ± 34536,38
BL18	Hojas	276,24 ± 17,80	25,64 ± 1,00	20,09	1,1x10 ⁶ ± 49815,21
	Tallos	199,14 ± 7,61	18,88 ± 0,76	61,59	1,1x10 ⁶ ± 107821,50
	Flor	169,14 ± 5,95	12,47 ± 1,39	36,85	5,1x10 ⁶ ± 46209,21
BL19	Hojas	208,31 ± 13,88	21,81 ± 0,97	37,52	9.7x10 ⁵ ± 20644,77
	Tallos	214,61 ± 19,70	9,57 ± 0,71	39,62	1,1x10 ⁶ ± 20179,83
	Flor	102,46 ± 6,80	11,95 ± 0,47	48,07	9,7x10 ⁵ ± 37832,13
BL20	Hojas	185,21 ± 3,85	192,43 ± 17,8	71,65	4,7x10 ⁵ ± 30561,65
	Tallos	143,41 ± 11,48	11,40 ± 0,52	57,04	5,1 x10 ⁵ ± 53357,80
	Flor	65,52 ± 4,79	16,86 ± 0,86	63,27	2,7x10 ⁵ ± 11037,82

CAPÍTULO 3

3.4.1 Cromatografía de capa fina

Tabla 3.1 Compuestos detectados por cromatografía en placa fina con Rf.

COMPUESTO	Rf	Extractos <i>B. latifolia</i>
A	0,35	H1, T1, T11, T13, T16, T17, T18, T19, T20
B	0,10	H1, T1, T3, T5
C	0,14	H1, H2, H3, H6, H9, H10, T1, T11, T13, T16, T17, T18, T19, F2, F3, F7
D	0,20	H1, H3, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7
E	0,30	H1, H2, H3, H6, H7, T2, T3, F2, F3, F7, Fr3, Fr4, Fr6, Fr13
F	0,94	H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, H18, H19, H20, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T20, F1, F2, F3, F4, F5, F7, F9, F10, F15, F17, F18, F19, F20, Fr3, Fr4, Fr5, Fr13.
G	0,37	H2, H3, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H13, H14, H15, H16
H	0,80	H2, H3, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, T1, T11, T13, T16, T18, T19, T20
I	0,08	H3, H4, H6, H7
J	0,40	H3, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, T2, T3, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T13
K	0,44	H3, H4, H6, H7, H8, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, F2, F3, F4, F7, F10, F15
L	0,53	H3, H6, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, F2, F3, F4, F5, F7, F9, F10, F15, F17, F18, F19, F20
M	0,73	H3, H6, H7, H8, H9, H10, F2, F4, F6, F9
N	0,76	H2, H3, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, T12, T13
O	0,28	H6, H7, H9, H10, T11, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T20
P	0,83	H10, F10, F15, F17, F18, F19, F20, Fr3, Fr13
Q	0,64	H11, H12, H13, H14, H15, H16, F7, F9, F10
R	0,25	H11, H13, H14, H15, H16, H17, H18, H19, H20, F2, F4, F7, F10, F15, F18, F19, F20
S	0,17	H11, H12, H13, H15, H16, H17
T	0,57	T2, T3, T5
V	0,35	F3, F4, F7, F9, F10, F15, F18, F19, F20, Fr5, F13
W	0,87	T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T20

3.4.2 Cromatografía líquida

Tabla 3.2. Presencia / ausencia. ✓: presencia; ___: Ausencia de posibles compuestos en cada accesión de la planta.

PICOS	t	H	T	F	Fr	Extractos <i>B. latifolia</i>
1	2,83	✓	✓	✓	✓	H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, H18, H19, H20, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T20, F1, F2, F3, F4, F5, F7, F9, F10, F15, F17, F18, F19, F20, Fr3, Fr4, Fr5, Fr9, Fr13.
2	8,97	✓	✓	✓	✓	H1, H2, H4, H5, H7, H9, H12, H14, H15, H16, H17, H18, H19, H20, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T9, T10, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T20, F1, F2, F3, F4, F5, F7, F9, F10, F15, F17, F18, F19, F20, Fr3, Fr4, Fr5, Fr13.
3	9,61	✓	✓	✓	✓	H1, H2, H4, H5, H6, H9, H10, H12, H14, H15, H16, H17, H18, H19, H20, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T20, F1, F2, F3, F4, F5, F7, F9, F10, F15, F17, F18, F19, F20, Fr3, Fr4, Fr5, Fr9, Fr13.
4	14,57	✓	✓	✓	✓	H1, H2, H4, H6, H10, H11, H12, H13, H14, H16, H17, H18, H19, H20, T6, T11, T13, T14, T16, F10, F15, F19, F20, Fr13.
5	15,32	✓	✓	___	___	H2, H3, H7, H12, H13, H14, H16, H17, H19, H20, T13
6	18,37	✓	✓	✓	✓	H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, H18, H19, H20, T1, T2, T3, T5, T7, T9, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T20, F1, F2, F3, F5, F7, F17, F18, F19, F20, Fr9, Fr13
7	23,53	✓	✓	___	___	H3, H5, H9, H13, H15, H16, H17, H20, T13, T16, T20
8	25,40	✓	✓	✓	✓	H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, H18, H19, H20, T2, T3, T5, T13, T20, F2, F3, F4, F5, F7, F9, F10, F15, F17, F18, F19, F20, Fr9.
9	26,61	✓	✓	___	___	H2, H3, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H15, H17, H20, T8, T11, T12, T13, T18, Fr13
10	32,95	✓	✓	___	___	H2, H3, H4, H6, H7, H8, H9, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H19, H20, T13, T20
11	5,95	✓	✓	✓	✓	H2, H4, H5, H9, H12, H15, H17, H18, H19, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T9, T10, T12, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T20, F1, F2, F3, F4, F5, F7, F9, F10, F15, F17, F18, F19, Fr3, Fr4, Fr5, Fr13.]
12	15,62	✓	✓	___	___	H2, H3, H7, H12, H13, H14, H15, H16, H17, H19, T13
13	19,16	✓	✓	✓	✓	H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, H18, H19, H20, T1, T2, T3, T4, T6, T9, T10, T12, T13, T16, T17, T18, F1, F2, F3, F7, F17, F18, F19, Fr13.
14	20,85	✓	✓	✓	✓	H2, H3, H7, H9, H13, H15, H16, H18, H19, T2, T3, T9, T13, T15, T16, T17, T18, F2, F3, F15, F1, F18, Fr3, Fr9.
15	30,90	✓	✓	✓	✓	H2, H3, H4, H6, H9, H10, H11, H12, H16, H17, H19, T8, T15, T18, F20, Fr13.

16	8,63	✓	__	✓	__	H2, H4, H5, H6, H7, H9, H12, H15, H16, H17, H18, H19, H20, F2, F9, F15, F19, F20
17	16,75	✓	✓	__	__	H1, H2, H3, H9, H12, H13, H14, H15, H16, H17, H18, H19, H20, T1, T3, T16, T17
18	12,17	✓	✓	__	__	H2, H5, H6, H10, H11, H12, H14, H19, T2, T3, T4, T5, T7, T15, T17
19	34,49	✓	✓	__	__	H2, H3, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H16, H17, H18, H19, T11, T13
20	24,54	✓	✓	__	__	H2, H3, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H13, H14, H15, H16, H17, H18, T11, T12, T13
21	35,15	✓	✓	✓	__	H5, H9, H10, H11, H12, H16, T4, T6, T7, F3
22	32,38	✓	__	__	__	H2, H3, H4, H6, H8, H9, H10, H11, H12
23	12,88	✓	__	✓	✓	H1, H2, H3, H4, H9, H10, H12, H13, H14, H16, F2, F3, F4, F5, F7, F9, F15, F19, F20, Fr13.
24	31,79	✓	__	__	__	H2, H3, H4, H6, H8, H9, H10, H11, H12
25	36,14	✓	✓	__	__	H4, H6, H7, H9, H10, H11, T5, T13, T17, T18, T20
26	19,31	✓	__	__	__	H3, H4, H6, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H15, H16, H17
27	20,51	✓	__	✓	__	H4, H9, H11, H13, F7
28	16,43	✓	✓	__	__	H1, T1
29	33,61	__	✓	__	__	T12
30	9,99	✓	✓	✓	✓	H1, H2, H4, H5, H9, H12, H14, H15, H17, H18, H19, T1, T2, T3, T4, T6, T7, T9, T10, T12, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T20, F2, F3, F4, F5, F7, F9, F10, F15, F17, F18, F19, F20, Fr3, Fr4, Fr5, Fr9, Fr13.]
31	25,96	✓	✓	__	__	H1, H2, H3, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, T8, T11, T12, T13, T16, T17, T18
32	9,26	✓	__	__	__	H1, H2, H4, H5, H9, H12, H17, H19, H20
3	7,55	✓	✓	__	__	H2, H4, H5, H18, H19, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T12, T14, T17
34	21,92	✓	✓	✓	__	H7, H9, H10, H12, H13, H14, H15, H16, H17, T13, T15, F7
35	30,09	__	__	✓	✓	F10, Fr9
36	13,71	__	__	✓	__	F19, F20

Tabla 3.3 Presencia / ausencia. ✓: presencia; __: Ausencia de picos en cada extracto de las hojas evaluadas

PICO	t	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	
1	2,83	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	8,97	✓	✓	__	✓	✓	__	✓	__	✓	__	__	✓	__	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3	9,61	✓	✓	__	✓	✓	✓	__	__	✓	✓	__	✓	__	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

4	14,57	✓	✓	—	✓	—	✓	—	—	—	✓	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓
5	15,32	—	✓	✓	—	—	—	✓	—	—	—	—	✓	✓	✓	—	✓	✓	—	✓	✓
6	18,37	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7	23,53	—	—	✓	—	✓	—	—	—	✓	—	—	—	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓
8	25,40	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
9	26,61	—	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	✓	—	✓	—	—	✓
10	32,95	—	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	—	✓	✓
11	5,95	—	✓	—	✓	✓	—	—	—	✓	—	—	✓	—	—	✓	—	✓	✓	✓	—
12	15,62		✓	✓	—	—	—	✓	—	—	—	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	✓	—
13	19,16	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
14	20,85	—	✓	✓	—	—	—	✓	—	✓	—	—	—	✓	—	✓	✓	—	✓	✓	—
15	30,90	—	✓	✓	✓		✓	—	—	✓	✓	✓	✓	—	—	—	✓	✓	—	✓	—
16	8,63	—	✓		✓	✓	✓	✓	—	✓	—	—	✓	—	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓
17	16,75	✓	✓	✓	—	—	—	—	—	—	—	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
18	12,17	—	✓	—	—	✓	✓	—	—	—	✓	✓	✓	—	✓	—	—	—	—	✓	—
19	34,49	—	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓	✓	✓	✓	—
20	24,54	—	✓	✓	—	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—
21	35,15	—	—	—	—	✓	—	—	—	✓	✓	✓	✓	—	—	—	✓	—	—	—	—
22	32,38	—	✓	✓	✓	—	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	—	—	—	—	—	—	—	—
23	12,88	✓	✓	✓	✓	—	—	—	—	✓	✓	—	✓	✓	✓	—	✓	—	—	—	—
24	31,79	—	✓	✓	✓	—	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	—	—	—	—	—	—	—	—
25	36,14	—	—	—	✓	—	✓	✓		✓	✓	✓	—	—	—	—	—	—	—	—	—
26	19,31	—	—	✓	✓	—	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	—	—	—
27	20,51	—	—	—	✓	—	—	—	—	✓	—	✓	—	✓	—	—	—	—	—	—	—
28	16,43	✓	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
29	33,61	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
30	9,99	✓	✓	—	✓	✓	—	—	—	✓	—	—	✓	—	✓	✓	—	✓	✓	✓	—
31	25,96	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	—	—	—	—	—	—
32	9,26	✓	✓	—	✓	✓	—	—	—	✓	—	—	✓	—	—	—	—	✓	—	✓	✓

33	7,55	—	✓	—	✓	✓	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	✓	✓	—
34	21,92	—	—	—	—	—	—	✓	—	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	—	—	—
35	30,09	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
36	13,71	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabla 3.4 Presencia / ausencia. ✓: presencia; —: Ausencia de picos en cada extracto de los tallos evaluados

PICO	t	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T20	
1	2,83	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	8,97	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3	9,61	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4	14,57	—	—	—	—	—	✓	—	—	—	—	✓	—	✓	✓	—	✓	—	—	—	—	—
5	15,32	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	✓	—	—	—	—	—	—	—	—
6	18,37	✓	✓	✓	—	✓	—	✓	—	✓	—	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7	23,53	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	✓	—	—	✓	—	—	—	—	✓
8	25,40	—	✓	✓	—	✓	—	—	—	—	—	—	—	✓	—	—	—	—	✓	—	—	✓
9	26,61	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	✓	✓	✓	—	—	—	—	✓	—	—	—
10	32,95	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	✓	—	—	—	—	—	—	—	—
11	5,95	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	—	—	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
12	15,62	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	✓	—	—	—	—	—	—	—	—
13	19,16	✓	✓	✓	✓	—	✓	—	—	✓	✓	—	✓	✓	—	—	✓	✓	✓	✓	—	—
14	20,85	—	✓	✓	—	—	—	—	—	✓	—	—	—	—	—	✓	✓	✓	✓	✓	—	—
15	30,90	—	—	—	—	—	—	—	✓	—	—	—	—	—	—	✓	—	—	✓	—	—	—
16	8,63	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17	16,75	✓	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	✓	—	—	✓	✓	—	—	—	—
18	12,17	—	✓	✓	✓	✓	—	✓	—	—	—	—	—	—	—	✓	—	✓	—	—	—	—
19	34,49	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	✓	—	✓	—	—	—	—	—	—	—	—
20	24,54	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	✓	✓	✓	—	—	—	—	—	—	—	—
21	35,15	—	—	—	✓	—	✓	✓	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

22	32,38	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__
23	12,88	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__
24	31,79	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__
25	36,14	__	__	__	__	✓	__	__	__	__	__	__	✓	__	__	__	✓	✓	__	✓	__
26	19,31	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__
27	20,51	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__
28	16,43	✓	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__
29	33,61	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	✓	__	__	__	__	__	__	__	__	__
30	9,99	✓	✓	✓	✓	__	✓	✓	__	✓	✓	__	✓	__	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
31	25,96	__	__	__	__	__	__	✓	__	__	✓	✓	✓	__	__	✓	✓	✓	__	__	__
32	9,26	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__
33	7,55	__	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	__	__	✓	__	✓	__	__	✓	__	__	__	__
34	21,92	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	✓	__	✓	__	__	__	__	__
35	30,09	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__
36	13,71	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__

Tabla 3.5. Presencia / ausencia. ✓: presencia; __: Ausencia de picos en cada extracto de flor evaluadas

PICO	t	F1	F2	F3	F4	F5	F7	F9	F10	F15	F17	F18	F19	F20
1	2,83	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	8,97	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3	9,61	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4	14,57	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__
6	18,37	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__
8	25,40	__	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
11	5,95	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
13	19,16	✓	✓	✓	__	__	✓	__	__	__	✓	✓	✓	__
14	20,85	__	✓	✓	__	__	__	__	__	✓	✓	✓	__	__
15	30,90	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	__	✓
16	8,63	__	✓	__	__	__	__	✓	__	✓	__	__	✓	✓

21	35,15	—	—	✓	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23	12,88	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	✓	—	—	✓	✓
27	20,51	—	—	—	—	—	✓	—	—	—	—	—	—	—
30	9,99	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
34	21,92	—	—	—	—	—	✓	—	—	—	—	—	—	—
35	30,09	—	—	—	—	—	—	—	✓	—	—	—	—	—
36	13,71	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	✓	✓

Tabla 3.6. Presencia / ausencia. ✓: presencia; —: Ausencia de picos en cada extracto de frutos evaluados

PICO	t	Fr3	Fr4	Fr5	Fr9	Fr13
1	2,83	✓	✓	✓	✓	✓
2	8,97	✓	✓	✓	—	✓
3	9,61	✓	✓	✓	✓	✓
4	14,57	—	—	—	—	✓
6	18,37	—	—	—	✓	✓
8	25,40	—	—	—	✓	—
9	26,61	—	—	—	—	✓
11	5,95	✓	✓	✓	—	✓
13	19,16	—	—	—	—	✓
14	20,85	✓	—	—	✓	—
15	30,90	—	—	—	—	✓
23	12,88	—	—	—	—	✓
30	9,99	✓	✓	✓	✓	✓
35	30,09	—	—	—	✓	—

Tabla. 3.7. Compuestos detectados e identificados tentativamente

N°	tR	Nombre	Tipo de compuesto	Formula Molecular	m/z [M+H]
1	2,852	poligonafolina	Alcaloide	C ₃₄ H ₂₉ NO ₇	563.1
2	8,959	rupestrina A	lignano	C ₃₄ H ₃₈ O ₁₈	734.2
3	9,556	maitolina	Alcaloide	C ₂₉ H ₃₇ NO ₁₃	607.2
4	14,593	malouetamida	Alcaloide	C ₂₂ H ₃₁ NO ₂	341.2
5	15,222	lepidilina B	Alcaloide	C ₂₀ H ₂₃ N ₂	291.1
6	18,370	flavopereirina	Alcaloide	C ₁₇ H ₁₅ N ₂	247.1
7	23,407	5,7,3'-trimetoxi-catequina	Fenol	C ₁₈ H ₂₀ O ₆	332.1
8	25,370	axinohidantoina	Alcaloide	C ₁₁ H ₉ BrN ₄ O ₃	323.9
9	26,481	cratenacina	Flavonoide	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₅	620.1
10	32,815	5,7-dihidroxi-6,8-di-C-metil-3-metoxiflavona 7-galactosil-(1->2)-ramnósido	Flavonoide	C ₃₀ H ₃₆ O ₁₄	620.2
11	5,926	accedinisina	Alcaloide	C ₄₁ H ₄₈ N ₄ O ₃	644.3
12	15,741	8,8-dimetil-2-fenil-4 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-4-ona	Flavonoide	C ₂₀ H ₁₆ O ₃	304.1
13	19,444	5,7,2',5'-tetrahidroxiflavanona	Flavonoide	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288.0
14	21,132	fasciculiferina	Flavonoide	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	314
15	30,593	oblonganósido A	Triterpenoide	C ₃₈ H ₅₈ O ₁₀	674.4
16	8,599	askendosido C	Triterpenoide	C ₄₀ H ₆₈ O ₁₃	756,4
17	16,926	dillenetina	Flavonoide	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330
18	12,222	eupalitina	Flavonoide	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330

19	34,926	5'-tetrametoxi-6,7-metilenedioxiflavona	Flavonoide	C ₂₀ H ₁₀ O ₁₀	418
20	24,402	kanzakiflavona 1	Flavonoide	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328
21	35,357	sinocrassósido A	Flavonoide	C ₃₁ H ₃₆ O ₁₆	664.2
22	32,111	melinervina	Flavonoide	C ₁₈ H ₁₄ O ₉	374
23	12,854	isolonchocarpina	Flavonoide	C ₂₀ H ₁₈ O ₃	306.1
24	31,751	dihidroquercetina	Flavonoide	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304
25	36,359	5,7,3', 4', 5'-pentahidroxi flavanona	Flavonoide	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	304
26	19,817	exiguaflavanona K	Flavonoide	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	370.1
27	20,482	acacetina	Flavonoide	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284
28	16,440	kaempferida	Flavonoide	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300
29	33,131	galangin-8-sulfonato	Flavonoide	C ₁₅ H ₁₀ O ₈ S	350
30	9,963	tricalisiamida B	Alcaloide	C ₂₀ H ₂₉ NO ₃	331.2
31	25,444	5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavano	Flavonoide	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	272.1
32	9,193	vincanina A	Alcaloide	C ₃₃ H ₄₁ O ₂₀	757.2
33	7,506	6-hidroxikaempferol 7- (6'' - (E) -cafeilglucósido)	Flavonoide	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₅	626.1
34	22,256	apigenin 7-(3''-acetil-6''-E-p-coumaroilglucósido)	Flavonoide	C ₃₂ H ₂₈ O ₁₃	620.1
35	30,200	carinatina	Alcaloide	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303.1
36	14,228	beesiosida D	Triterpenoide	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₁	680.4