



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO Y FARMACEUTICO

Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios aislados de las especies *Gynoxys cf. pulchella* y *Baccharis latifolia*

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Rodriguez Estéfano, Patricia Elizabeth

DIRECTORA: Ordóñez Vivanco, Paola Elizabeth, PhD.

LOJA – ECUADOR

2016

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

PhD.

Paola Elizabeth Ordóñez Vivanco

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: "Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios aislados de las especies *Gynoxys cf. pulchella* y *Baccharis latifolia* " realizado por Rodriguez Estéfano Patricia Elizabeth ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, 20 de septiembre del 2016

f)

Paola Elizabeth Ordóñez Vivanco

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Rodriguez Estéfano Patricia Elizabeth declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios aislados de las especies *Gynoxys cf. pulchella* y *Baccharis latifolia*”, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Paola Elizabeth Ordóñez Vivanco, PhD., directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.

Autor: Rodriguez Estéfano Patricia Elizabeth

Cédula: 092228602

DEDICATORIA

A Dios, por la vida tan maravillosa que me ha dado.

A mis padres, por quienes he podido llegar a donde he llegado, por su amor y apoyo incondicional que me han permitido cumplir con las metas que me he propuesto.

A mis hermanos, por ser ejemplo e inspiración para mejorar cada día.

AGRADECIMIENTO

Primeramente, le agradezco a Dios, por darme vida y salud para poder culminar esta etapa de mi vida, por dame la fuerza necesaria para superar los obstáculos que se presentaron en el camino.

A mis padres, Julio y Yuryee, gracias a su esfuerzo y sacrificio todos estos años he podido concluir esta faceta de mi vida, gracias por su guía y consejos que han sabido llevar por el camino correcto y por su apoyo incondicional en los momentos difíciles, y por todo su amor que es mi gasolina para seguir avanzando.

A mis hermanos, Carolina y Julio, gracias por darme ánimos a lo largo del camino, gracias por inspirarme con sus éxitos e impulsarme a salir adelante.

A la Dra. Paola, gracias por compartirme sus conocimientos y experiencia, por toda la paciencia y comprensión que ha tenido conmigo.

A los miembros del tribunal, ya que sin la guía y apoyo que prestaron en la realización de este proyecto.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, la Titulación de Bioquímica y Farmacia, y al Departamento de Química, por permitirme ser parte de su institución y permitirme desarrollarme en estos años de estudio.

Muchísimas gracias a todos, sin ustedes no hubiera podido lograrlo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE TABLAS.....	x
INDICE DE ANEXOS.....	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1. Familia Asteraceae.....	5
1.1.1. Morfología.....	5
1.1.2. Distribución.....	6
1.1.3. Etnobotánica.....	6
1.1.4. Género <i>Gynoxys</i>	6
1.1.5. Género <i>Baccharis</i>	8
2.1. Metabolitos secundarios.....	9
1.2.1. Terpenoides.....	10
1.2.2. Flavonoides.....	11

1.3. Métodos de aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios	11
1.3.1. Maceración simple o estática.....	11
1.3.2. Punto de fusión.....	12
1.3.3. Cromatografía.....	13
1.3.4. Resonancia magnética nuclear.....	15
1.3.5. Actividad óptica.....	16
1.3.6. Capacidad mínima inhibitoria.....	17
2. METODOLOGÍA	18
2.1. Procedimientos experimentales generales	19
2.2. Material vegetal	19
2.3. Obtención de los extractos	20
2.3. Filtrado de clorofilas	21
2.3.1. Filtrado de clorofilas del extracto de <i>Gynoxys cf. pulchella</i>	21
2.3.2. Filtrado de clorofilas del extracto de <i>Baccharis latifolia</i>	21
2.4. Aislamiento y purificación de compuestos de la especie <i>Gynoxys cf. pulchella</i>	21
2.4.1. Aislamiento de betulin (1).....	21
2.4.2. Purificación de la fracción GX18.....	21
2.5. Aislamiento y purificación de compuestos de la especie <i>Baccharis latifolia</i>	22
2.5.1. Aislamiento del (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (2).....	22
2.5.2. Aislamiento de 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (3).....	22
2.5.3. Purificación de la fracción BL21.....	22
2.6. Evaluación de la actividad antibacteriana	22
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
3.1. Obtención de los extractos	25
3.2. Aislamiento y purificación de compuestos de la especie <i>Gynoxys cf. pulchella</i>	25
3.2.1. Aislamiento de betulin (1).....	26
3.2.2 Purificación de la fracción GX18.....	28
3.3. Aislamiento y purificación de compuestos de la especie <i>Baccharis latifolia</i>	28
3.3.1. Aislamiento del (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (2).....	28

3.3.2. Aislamiento de 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (3).	31
3.3.3. Purificación de la fracción BL21.	32
3.4. Evaluación de actividad biológica antibacteriana.....	33
CONCLUSIONES	34
RECOMENDACIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXOS.....	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Gynoxys cf. pulchella</i> en el sitio de recolección.....	8
Figura 2. <i>Baccharis latifolia</i> en el sitio de recolección.....	9
Figura 3. Equipo Fisher-Johns-Melting Point Apparatus para determinar punto de fusión...	12
Figura 4. Cromatografía en columna.....	13
Figura 5. Placa de CCF.....	14
Figura 6. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas utilizado.....	15
Figura 7. Equipo de resonancia magnética nuclear utilizada.....	16
Figura 8. Equipo de rotación óptica.....	17
Figura 9. Secado del extracto por rotovaporación.	20
Figura 10. Estructura de betulin (1).....	26
Figura 11. Estructura del (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (2).....	28
Figura 12. Estructura de la 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (3).....	31

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los terpenoides.....	10
Tabla 2. Coordenadas de recolección.	19
Tabla 3. Código de herbario para las especies vegetales colectadas.....	19
Tabla 4. Pesos de las plantas post secado.....	20
Tabla 5. Cepas bacterianas utilizados y sus condiciones de cultivo.	23
Tabla 6. Extractos obtenidos de las especies recolectadas.....	25
Tabla 7. Fracciones obtenidas de la columna cromatográfica de la especie <i>Gynoxys cf. pulchella</i> y sus respectivos pesos.....	25
Tabla 8. Datos de NMR de ¹ H (400 MHz) y ¹³ C (100 MHz) para betulin (1).....	27
Tabla 9. Fracciones obtenidas de la columna cromatográfica de la especie <i>Baccharis latifolia</i> y sus respectivos pesos.....	29
Tabla 10. Datos de NMR de ¹ H (400 MHz) y ¹³ C (100 MHz) para (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (2).....	30
Tabla 11. Datos de NMR de ¹ H (400 MHz) y ¹³ C (100 MHz) para 5-hydroxy,4',7'-dimethoxyflavone (3).....	32

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro de masas del betulin (1)	41
Anexo 2. Espectro ¹ H del betulin (1).....	42
Anexo 3. Espectro ¹³ C del betulin (1)	43
Anexo 4. Espectro de masas del (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (2).....	44
Anexo 5. Espectro ¹ H del (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (2)	45
Anexo 6. Espectro ¹³ C del (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (2)	46
Anexo 7. Espectro de masas de la 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (3).....	47
Anexo 8. Espectro ¹ H de la 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (3)	48
Anexo 9. Espectro ¹³ C de la 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (3)	49

ABREVIATURAS

AcOEt: Acetato de etilo

DCM: Diclorometano

MeOH: Metanol

Hex: Hexano

H₂O: Agua

CCF: Cromatografía en capa fina

PF: Punto de fusión

RMN: Resonancia magnética nuclear

CG-EM: Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas

DMSO: Dimetilsulfóxido

CMI: Capacidad mínima inhibitoria

R_f: Factor de retención

RP₁₈: sílica gel fase reversa

Lat.: latitud

Long.: longitud

RESUMEN

La familia Asteraceae se encuentra ampliamente distribuida en la región andina del Ecuador. Pocas de estas especies en esta zona han sido químicamente estudiadas, por ésta razón la información sobre los metabolitos secundarios que las mismas contienen es limitada. En ésta investigación, los extractos en acetato de etilo de las especies *Gynoxys cf. pulchella* y *Baccharis latifolia*, pertenecientes a la familia Asteraceae fueron evaluados fitoquímicamente. El triterpeno betulin (**1**) fue aislado de la especie *G. cf. pulchella*; mientras que el sesquiterpeno (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (**2**) y la flavona 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (**3**) fueron aislados de *B. latifolia*. Las estructuras de todos los compuestos fueron establecidas por métodos espectroscópicos. Adicionalmente, la actividad antibacteriana in vitro de los extractos en acetato de etilo de las especies *G. cf. pulchella* y *B. latifolia*, fueron evaluados contra siete cepas bacterianas utilizando el método de microdilución en caldo, ninguno de los extractos mostró actividad a las concentraciones evaluadas.

PALABRAS CLAVES: *Gynoxys cf. pulchella*, *Baccharis latifolia*, actividad antibacteriana, betulin, (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene, 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone.

ABSTRACT

The Asteraceae family is widely distributed in the Andean region of Ecuador. Few of these species have been chemically studied, for this reason the information about the secondary metabolites they contain is limited. In this research, the ethyl-acetate extracts of *Gynoxys cf. pulchella* and *Baccharis latifolia*, species of the Asteraceae family, were phytochemically evaluated. The triterpene betulin (**1**) was isolated from *G. cf. pulchella*, while the sesquiterpene (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (**2**) and the flavone 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (**3**) were isolated from *B. latifolia*. The structures of all compounds were established by spectroscopic methods.

In addition, the in vitro antibacterial activity of the ethyl acetate extracts of *G. cf. pulchella* y *B. latifolia*, were evaluated against seven bacterial strains using the broth microdilution method, none of the extracts showed activity at the tested concentrations.

KEYWORDS: *Gynoxys cf. pulchella*, *Baccharis latifolia*, betulin. (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene, 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone, antibacterial activity.

INTRODUCCIÓN

Como todos los seres vivos, las plantas requieren de compuestos imprescindibles para su subsistencia, a estos se los conoce como metabolitos primarios, sin embargo, las plantas producen igualmente otros compuestos que a pesar de no ser esenciales para su vida cumplen diferentes funciones tales como defensivas y atrayentes para polinizadores. Estos compuestos tomaron importancia desde el siglo XIX en el que los científicos de la época empezaron a estudiarlos llamándolos “productos naturales”, ya que estos presentaban importancia como venenos, drogas, sabores y materias industriales (Taiz & Zeiger, 2006).

De más de 3.000 especies vegetales pertenecientes al Ecuador, 206 familias son utilizadas como plantas medicinales gracias a sus distintos usos. De estas, las especies de la familia Asteraceae tienen mayor uso en el país para dicho fin (Rosillo, 2015).

Las plantas del género *Baccharis* son ejemplo de este uso tradicional, la especie *Baccharis latifolia*, conocida como chilca larga es utilizada en la medicina tradicional para tratar el reumatismo, dolores hepáticos además de úlceras y heridas (Rosillo, 2015). Las plantas del género *Gynoxys* son otros grandes exponentes de la familia, como se ha demostrado en los estudios realizados por Ordóñez et al., 2011 y Ordóñez et al., 2013, la especie *Gynoxys verrucosa* posee metabolitos secundarios con actividad antineoplásica y antibacteriana.

En la presente investigación se trabajó con los extractos en acetato de etilo de dos especies, *Gynoxys cf. pulchella* y la *Baccharis latifolia*. Dichos extractos fueron analizados y procesados utilizando métodos cromatográficos, obteniendo el aislamiento de metabolitos los cuales fueron caracterizados mediante métodos espectroscópicos.

Con este trabajo se pretende contribuir a la prospección de metabolitos secundarios producidos por especies de la familia Asteraceae específicamente de las especies *Gynoxys cf. pulchella* y la *Baccharis latifolia*.

Este trabajo está constituido por una introducción seguida de tres capítulos, el capítulo uno o marco teórico, en el que se encuentra una recopilación de información sobre las especies utilizadas, sobre el fundamento de los métodos utilizados e información general sobre los tipos de metabolitos obtenidos de ambas especies; en el capítulo dos se detalla la metodología utilizada para el aislamiento de los metabolitos obtenidos, y en el capítulo tres se realiza el análisis de los resultados y la discusión de los mismos.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Familia Asteraceae

El término Asteraceae proviene del latín “*Aster*” que significa estrella, este nombre le ha sido asignado en base a sus inflorescencias de apariencia estrellada. La familia está conformada por plantas herbáceas, arbustos y árboles, además las plantas de esta familia pueden ser ya sea erectas, trepadoras o rastreras (Freire, 2004).

1.1.1. Morfología.

Las especies de la familia Asteraceae pueden presentar hojas simples o compuestas, alternas y espiraladas, ya sean opuestas o verticiladas, aunque hay casos en los que se pueden hallar ausentes como en la *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. Sus flores pueden encontrarse dispuestas en una sola inflorescencia, o en inflorescencias más complejas formando panículas o racimos. Sus capítulos se componen de algunos verticilos de flores unidos al receptáculo común y se encuentran rodeados por verticilos de brácteas que se encuentran conformando el involucre. Ya sean hermafroditas o unisexuales (plantas dioicas o monoicas). Estas son de tamaño muy pequeño y están divididas en dos tipos principales, (1) las radiales o zigomorfas, bilabiadas o linguadas y pistiladas, hermafroditas o neutras; y (2) flores del disco, actinomorfas y hermafroditas que conforman un conducto 3- a 5-lobulado. Tomando en cuenta los grupos, los capítulos se pueden formar únicamente por flores radiales como en el caso de la *Mutisia* L.f., flores tubulosas como es el caso de la chilca (*Baccharis latifolia*) o por capítulos con flores tubulosas en la zona central y flores radiadas en la zona externa como en el frailejón (*Espeletia pycnophylla* Cuatrec.) (Freire, 2004).

El papus o cáliz de las plantas de esta familia es modificado, puede estar constituido por un par de prolongaciones cual espinos, ubicados sobre el ovario o en conjunto de pelos pequeños y finos, aunque también se puede hallar ausente. La corola está formada por 3 a 5 pétalos basalmente connados y apicalmente connados formando un conducto una especie de lígula. El androceo posee igualmente de 3 a 5 estambres unidos a la base interior de la corola y soldados entre sí en forma de conducto que rodea al estilo. En su superficie, los granos de polen son generalmente lisos como en el caso de la *Mutisia* L.f. o puede mostrar espinas o algunas otras ornamentaciones. El gineceo se presenta bicarpelar conformando un ovario ínfero 1-ocular y 1-ovular, tiene un estilo terminal y un estigma bilobulado o incluso hasta 3-4 lobulado como en la *Acmella* Rich y la *Coreopsis* L. Su fruto se conoce como cipsela, el cual es un aquenio seco indehiscente (Freire, 2004).

1.1.2. Distribución.

Con una distribución cosmopolita, la familia cuenta con aproximadamente 1.535 géneros y 23.000 especies. En el Ecuador, su distribución se observa principalmente en la región andina y los páramos, igualmente hay especies, arbóreas principalmente, que se han encontrado en las tierras bajas del Ecuador. En territorio ecuatoriano se han identificado 217 géneros y 918 especies pertenecientes a la familia Asteraceae, de las cuales 351 especies califican como especies endémicas, y 245 se encuentran categorizada como especies en peligro, aunque lastimosamente, solo el 30% aproximadamente, se halla en el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (Freire, 2004).

1.1.3. Etnobotánica.

El uso de los miembros de la familia Asteraceae radica principalmente en la ornamentación, aun así, hay varias especies que son utilizadas como alimento, tal es el caso de la lechuga, (*Lactuca sativa* L.), y a la alcachofa (*Cynara scolymus* L.). El girasol (*Helianthus annuus* L.), es otra Asteraceae que es ampliamente cultivada en el país. La jícama, (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob.), es una especie nativa andina cuyo tubérculo es utilizado como fruto refrescante y que es objeto de estudio. Entre las especies utilizadas en la medicina pueden incluir a la chuquiragua (*Chuquiraga jussieui* J.F. Gmel.) y a la chilca (*Baccharis Latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.). Los compuestos químicos repelentes presentes en Asteraceae ayudan a que varias especies sean utilizadas como insecticidas, como sucede por ejemplo con el piretro, que es extraído de la especie introducida *Tanacetum cinerariifolium* (Trevis.) Sch. Bip., y con el marco, *Ambrosia arborescens* Mill., que es utilizada por los campesinos andinos para barrer los interiores de las casas y así repeler insectos y pulgas (Freire, 2004).

1.1.4. Género *Gynoxys*.

Las plantas del género *Gynoxys* son arbustos de aproximadamente 1-2 m de alto, poseen una corteza marrón levemente tormentosa, ramas canaliculadas, además de hojas opuestas, carnosas o gruesocoríceas con un peciolo de 1,0 – 2,5 cm de longitud, sus hojas son de lámina ovada con 1,5 – 6,1 cm de long. x 0,8 – 2,8 cm de lat., tienen una base truncada, al igual que un ápice agudo y un haz foliar bullada completamente despejado y libre de tricomas. Su envés se halla cubierto por un denso indumento lanoso deciduo al tacto, posee una nerviación reticulada, nervios secundarios pábulos de 8 - 15 por lado, prominentes en el envés, de margen entera, revoluta. En lo que se refiere a sus inflorescencias, estas son Inflorescencias piramidales, con ramas y pedúnculos gruesos densamente lanosos; sus pedúnculos y pedicelos están cubiertos por abundantes bractéolas triangulares de menos de 2 mm de longitud. Posee capítulos heterógamos, su involucre está formado por 8 filarias,

gruesas caricáceas, ligeramente biseriadas, las externas son elípticas, de 7,5 mm de longitud x 3 mm lat., dorsalmente lanosas y con ápice agudo, mientras que las internas son oblongoovadas, de 7 - 8 mm long. x 3 - 3,5 mm lat., medialmente lanosas en el dorso, con el ápice obtuso y las márgenes escariosas. Sus flores radiadas, femeninas, liguladas, se hallan de a 4 por capitulo, con corola glabra de 8,5 - 9 mm de longitud, un tubo de 3,5 – 4,0 mm longitud, un limbo de 5 mm de longitud 2 - 3 dentado, con ramas estigmáticas 1,8 x 0,3 mm, lisas, glabras. Tienen flósculos hermafroditas, corola infundibuliforme y glabra, de 8,0 – 9,5 mm long., un tubo de 3 - 4 mm long., limbo de 4 - 5,5 mm de long. pentalobulado, con lóbulos de 2 mm de longitud, triangulares; anteras de 3 mm longitud, base caudada, apéndice apical lanceolado, agudo, ramas del estilo lineares, contortas (Díaz-Piedrahita & Correa, 1999).

Aunque como género no se han realizado muchos estudios, bibliográficamente se ha descrito que en su composición química tiene como metabolitos secundarios principales furanoeremofilanos generalmente, en varias especies de *Gynoxys* se ha hallado la presencia de diterpenos de tipo kaurano, siendo los furanoeremofilanos los compuestos más comunes en el género (Ramírez, 2011).

Un representante del género *Gynoxys* es la especie *Gynoxys verrucosa*, de esta se ha aislado dos lactonas sesquiterpénicas correspondientes al grupo de las guainolidas, la leucodina y dehydroleucodina, esta última ha demostrado tener actividad antimicrobiana frente a varias cepas de *Staphylococcus aureus* y *epidermidis*. Además, este compuesto ha mostrado potente actividad citotóxica contra ocho líneas celulares de leucemia; es importante mencionar que este compuesto induce menor toxicidad contra células normales que contra células leucémicas (Ordóñez et al., 2016).

La especie *Gynoxys pulchella* (Figura 1), una de las especies utilizadas en este estudio, es especie endémica del Ecuador que se encuentra distribuida en las zonas de Bolívar, Tungurahua, Cañar y Loja (Grandtner & Chevrette, 2013). El habitat en el que crece es tropical de gran altitud o subtropical, esta especie crece en el páramo, a una altura aproximada de entre 2.000 a 4.000 metros sobre el nivel del mar. Es una especie que se encuentra en el libro rojo de especies amenazadas (Montúfar & Pitman, 2003), y es debido a esto que no hay mucha información disponible sobre la misma.



Figura 1. *Gynoxys cf. pulchella* en el sitio de recolección.
Fuente: (Autora, 2016)

1.1.5. Género *Baccharis*.

Perteneciente a la familia Asteraceae, el género *Baccharis* está conformado por un extenso grupo de plantas de origen estrictamente americano (Florão et al., 2012; Giuliano, 2001), extendiéndose a lo largo del continente desde el sur de los Estados Unidos hasta el territorio de Chile y Argentina (Giuliano, 2001). Este género está compuesto comúnmente por arbustos de una altura promedio de entre 0,5 a 4,0 m. El género goza de un uso medicinal principalmente, siendo consumidas en forma de infusión para el tratamiento de afecciones estomacales, hepáticas, prostáticas, urinarias, anemias, inflamaciones, desintoxicación del cuerpo, etc. Entre los metabolitos secundarios principales que se reportan en especies de esta familia tenemos flavonoides, diterpenos y triterpenos, observándose una alta acumulación de flavonas, flavonoles, diterpenos labdanes y clerodanes (Verdi et al., 2005).

Un representante del género es la *Baccharis obtusifolia*, esta se presenta como un arbusto generalmente distribuido en la región andina a alturas de 1.500 – 3.500 m.s.n.m., especialmente en Loja, Azuay, Napo y Cañar (Rosales, 2012). Al igual que con la especie *Baccharis latifolia* Pers., la decocción de las partes aéreas de la especie *Baccharis obtusifolia* H.B.K. son utilizadas para tratar el reumatismo, problemas hepáticos, úlceras y heridas. En estudios han reportado la presencia de flavonoides, clerodanos y triterpenos, de esta especie se ha aislado el Sakuranetin (5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona) y la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona, compuestos que mostraron una actividad citotóxica de leve y moderada respectivamente (Ortega, 2013).

La especie *Baccharis latifolia*, otra de las especies utilizadas en el presente estudio, se presenta como un arbusto de constitución leñosa que puede alcanzar una altura de 3 metros, sus hojas son alternas con láminas lanceoladas de 9 a 12 centímetros aproximadamente. Su inflorescencia es cimosa y se muestra en capítulos; sus frutos son aquenios con un papus abundante en la zona apical, de color crema (Rosillo, 2015).

Las hojas y los tallos de la especie *Baccharis latifolia* Pers. (Figura 2) son utilizadas en forma de decocción en la medicina tradicional para el tratamiento del reumatismo, afecciones hepáticas, heridas y úlceras. En la bibliografía encontrada se detalla el aislamiento de dos flavonoides extraídos con diclorometano de las partes aéreas de la planta, además, su aceite esencial ha demostrado tener actividad biológica contra *Staphylococcus aureus*. De los extractos orgánicos y acuosos de varias especies del género *Baccharis* incluyendo las especies *B. obtusifolia* y *B. latifolia* se realizaron estudios in vitro para determinar su actividad antiinflamatoria en sistemas celulares; se evaluó su capacidad para inhibir la producción de distintos mediadores de inflamación siendo activos para dichos ensayos. (Abad & Bermejo, 2006). Otros estudios reafirman su actividad antiinflamatoria, teniendo acción moderada los extractos acuosos de ambas especies, debiéndose esto a su actividad inhibitoria sobre ciclooxigenasa, 5- lipoxigenasa; NO y TNF- α (Dávalos et al, 2007).



Figura 2. *Baccharis latifolia* en el sitio de recolección.
Fuente: (Autora, 2016)

2.1. Metabolitos secundarios

Además de los productos necesarios para el crecimiento y desarrollo, las plantas elaboran una gran variedad de compuestos orgánicos a los que se denomina metabolitos secundarios los cuales carecen de funciones directas sobre el metabolismo principal de las plantas. A diferencia de los metabolitos primarios que se hallan en todo el reino vegetal, los metabolitos secundarios tienen una distribución limitada en el reino vegetal, algunos se encuentran únicamente en una determinada especie o en un determinado grupo de especies que guardan alguna relación entre sí. Entre las principales funciones de los metabolitos secundarios podemos decir que protegen a la planta ya sea de la ingesta por parte de animales herbívoros y de infecciones por microorganismos patógenos, y actúan como atrayentes para especies polinizadoras y dispersoras de semillas. Los metabolitos secundarios pueden clasificarse en

tres grupos principales que son: fenoles, terpenos, y compuestos nitrogenados (Taiz & Zeiger, 2006).

1.2.1. Terpenoides.

Los terpenoides constituyen el grupo de metabolitos mayoritario del reino vegetal. Su biosíntesis se lleva a cabo a partir del acetil coenzima A o de intermediarios glicólicos, derivando de la unión de componentes de cinco carbonos que poseen un esqueleto carbonado ramificado del isopentano. Los componentes básicos de los terpenos se denominan unidades de isopreno (Taiz & Zeiger, 2006), es decir que cada grupo de terpenoides son el resultado de una condensación “cabeza-cola” de unidades isoprénicas (Bruneton & Fresno, 2001). El resultado de dicha condensación son cadenas hidrofóbicas con una gran variedad de propiedades, como por ejemplo, algunos terpenos son compuestos aromáticos de ciertas plantas (ej.: el limoneno del limón, el mentol de la menta, etc.); y otros forman parte del grupo de vitaminas liposolubles A, E y K (Peña et al, 1988).

Los terpenoides se clasifican según el número de unidades de isopreno que conforman las moléculas, clasificación que se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los terpenoides.

Isoprenos	Número de carbonos	Nombre
2	10	Monoterpenos
3	15	Sesquiterpenos
4	20	Diterpenos
6	30	Triterpenos
8	40	Tetraterpenos
X	5•X	Politerpenos

Fuente: (Primo, 2007)

Los monoterpenos se presentan generalmente en forma de líquidos volátiles, salvo casos como el mentol o el alcanfor que son sólidos (Claramunt et al, 2013). Se encuentran constituidos por dos unidades isoprénicas con un total de 10 carbonos (C₁₀) en su estructura (Primo, 2007). Estructuralmente pueden clasificarse en tres categorías que son lineales o acíclicos, monocíclicos y bicíclicos, aunque también hay información sobre una pequeña cantidad de monoterpenos tricíclicos (Claramunt et al., 2013).

El precursor principal de los diterpenos (C₂₀) es el pirofosfato de geranilo, obtenido al adicionar una molécula de IPP al pirofosfato de farnesilo, de aquí se da la formación de carbocationes que se producen por heterólisis del enlace C-O de la molécula de pirofosfato; igualmente pueden ser generados al protonar un doble enlace para dar origen a un centro electrófilo, caso

más común debido a la presencia de varios enlaces dobles en las cadenas precursoras (Claramunt et al., 2013).

Los sesquiterpenos están constituidos por tres unidades de isopreno, las cuales se unen formando cadenas hidrocarbonadas alifáticas tanto abiertas como sistemas cíclicos. Los sesquiterpenos pueden ser: acíclicos como los alcoholes sesquiterpénicos *farmesol* y *nerolidol*; monocíclicos como los bisabolenos; bicíclicos como el cadineno y tricíclicos como el α -santaleno (Beyer & Walter, 1987).

1.2.2. Flavonoides.

Generalmente liposolubles, los flavonoides son los pigmentos vegetales que dan la coloración a las flores y frutos. Existen casos en los que la zona de absorción de la molécula se halla cerca del ultravioleta, pudiendo ser observados únicamente por insectos los que se sienten atraídos hacia el néctar, lo que ayuda al transporte del polen y la preservación de la especie. El origen biosintético de los flavonoides es común teniendo un mismo elemento estructural básico, el 2-fenilcromano. Estos se pueden reagrupar en distintas clases según el grado de oxidación de su núcleo pirámico central, el cual puede estar abierto y ciclado nuevamente en una estructura furánica (Bruneton & Fresno, 2001). Las flavonas en la naturaleza se encuentran generalmente en forma de hidroxiflavonas y en su mayoría están en forma de glicósidos (Primo, 2007).

En el caso de las flavonas y flavonoles, el ciclo ha sido sustituido por dos grupos hidroxilos fenólicos en C-5 y C-7; dichos hidroxilos pueden estar esterificados o libres, uno de los cuales puede formar parte de un enlace heterósídico. Se pueden dar otras sustituciones, las más frecuentes son las variables entre hidroxilos libres e hidroxilos esterificados en C-6 y/o en C-8, implicación del C-6 y/o del C-8 en un enlace entre carbonos con un azúcar, y metilación o isoprenilación en C-6 o en C-8. Su distribución es universal, pero ciertas sustituciones pueden estar restringidas a familias o grupos de familias (Bruneton & Fresno, 2001).

1.3. Métodos de aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios

1.3.1. Maceración simple o estática.

El método de maceración consiste en poner en contacto el material vegetal con un solvente por un periodo de varios días, para obtener como resultado el equilibrio entre la concentración de la planta con el solvente. La extracción de los metabolitos depende de distintos factores de los mismos tales como su naturaleza, la cantidad de humedad de la planta, el tamaño de la partícula a extraer y la cantidad existente de la misma; igualmente depende de factores del solvente como como la selectividad y cantidad del mismo. El rendimiento obtenido del extracto

se ve afectado por la relación droga/solvente, siendo el caso de su disminución cuando esta relación se ve aumentada. El hinchamiento del material vegetal utilizado es de gran importancia ya que con este se ve aumentada tanto la permeabilidad de la pared celular como la difusión del solvente. La velocidad con la que se da la extracción depende igualmente del hinchamiento de las células de la planta al igual que del tamaño de los fragmentos de la misma utilizados en la extracción al igual que por la viscosidad y polaridad del solvente utilizado. Durante el proceso de maceración se puede ya sea mantener el macerado en movimiento constante, lo que es conocido como maceración dinámica, o simplemente dejarla en contacto con el solvente con agitación ocasional, este se conoce como maceración simple o estática (Sharapin et al., 2000).

1.3.2. Punto de fusión.

Por definición, el punto de fusión de un compuesto puro es la temperatura en la cual, la fase líquida y la fase sólida se encuentran en equilibrio. La mayoría de los compuestos en estado puro presentan una transición clara entre la fase sólida a la líquida, transición comúnmente más violenta que la de líquido a sólido, es decir, esta ocurre en un intervalo de temperatura menor al que se da el paso del compuesto de líquido a sólido. El punto de fusión de un compuesto es directamente proporcional a la fuerza con la que se hallen enlazadas las moléculas del compuesto. Cuando las fuerzas intermoleculares son muy fuertes el punto de fusión es mayor, mientras que, si las fuerzas son débiles, el punto de fusión será más bajo (Dupont & Gokel, 2007). Para la medición se suelen utilizar equipos con controles de temperatura (Figura 3).



Figura 3. Equipo Fisher-Johns-Melting Point Apparatus para determinar punto de fusión.

Fuente: (Autora, 2016)

1.3.3. Cromatografía.

La técnica cromatográfica es un método mediante el cual una fase móvil, pasa por de una fase estacionaria en la que se ha colocado una cantidad conocida de la muestra a separar, el resultado de este proceso es que los distintos componentes de la muestra sembrada, en base a la afinidad que tengan tanto con la fase estacionaria como con la fase móvil, se mueven a velocidades distintas y por ende eluyen en tiempos diferentes. Los componentes que presenten mayor afinidad a la fase estacionaria serán retenidos durante un mayor tiempo en la misma, aumentando su tiempo de elución en relación con los compuestos que presentan menor afinidad a la fase estacionaria los cuales tendrán un menor tiempo de elución, esto tiene como consecuencia que los componentes de la muestra se separen en bandas de acuerdo a su afinidad con la base estacionaria (Sierra et al., 2010).

1.3.3.1. Cromatografía en columna.

De acuerdo al principio cromatográfico, en la cromatografía en columna se hace que un líquido pase por gravedad a través de un sólido soporte o activo con determinado tamaño de partícula el cual se halla contenido en una columna recta de vidrio (Figura 4), el eluido procedente de la columna se va recogiendo en fracciones (Valcárcel & Gómez, 1994) de volumen determinado, las cuales posteriormente son analizadas por el investigador.

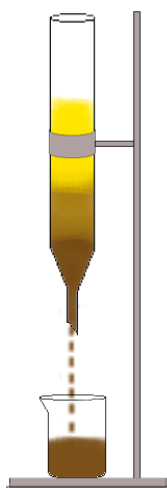


Figura 4. Cromatografía en columna.
Fuente: (Autora, 2016)

1.3.3.2. Cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina sigue el mismo principio que la cromatografía en columna salvo que a diferencia de esta, la fase móvil se encuentra extendida en una placa ya sea de vidrio o aluminio. La muestra a analizar se coloca cerca del borde de la placa y se la deja secar,

posteriormente se sumerge la placa en el disolvente (fase móvil) sin que este toque la muestra se lo deja ascender por la placa por capilaridad mientras arrastra consigo la muestra (Figura 5). La placa se retira del solvente un poco antes de que este tope el borde superior de la placa y se marca claramente el punto hasta donde llega el disolvente y el punto en el que se sembró el sustrato. Generalmente la muestra no se desplaza a la misma velocidad que el solvente debido a que se ha ido quedando retenida en la sílica provocando que se vaya retrasando (Walton & Reyes, 2005). Estos retrasos permiten que la muestra se vaya separando a lo largo de la placa de acuerdo a la afinidad de la misma con la placa y el disolvente, esta separación permite visualizar los diferentes componentes de la muestra los cuales se usan como referencia para identificar compuestos.

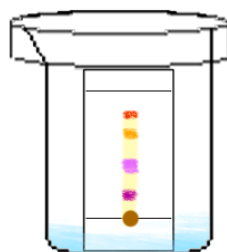


Figura 5. Placa de CCF.
Fuente: (Autora, 2016)

1.3.3.3. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas.

La cromatografía de gases tiene como base la distribución de los analitos entre la fase estacionaria situada en la columna cromatográfica, y la fase móvil que en este caso es un gas portador. En esta técnica se utilizan detectores los cuales suelen ser el detector de captura (ECD), que proporciona una respuesta selectiva hacia las moléculas poseedoras de átomos electronegativos y el detector de emisión atómica (AED) que permite detectar la radiación proveniente de los diferentes elementos que se encuentran presentes en los analitos separados en la columna cromatográfica. El plasma alimentado por helio e inducido por microondas produce la excitación de los átomos produciendo un espectro de emisión el cual será detectado por una red de diodos. La combinación de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas (Figura 6) permite tener registros tridimensionales ya que por cada tiempo de retención nos ofrece un espectro de masas de las especies que brotan de la columna cromatográfica. El analizador de masas suele tratarse de una trampa de iones. Un impacto eléctrico provocado por un filamento de wolframio que emite electrones acelerados por un potención aplicado entre el ánodo y el filamento, lo que produce una fuerte ionización en el eluyente cromatográfico, esto se da debido a que el chorro de iones producidos impacta de forma perpendicular con las moléculas neutras provenientes de la columna cromatográfica

lo que lleva a su ionización; las especies ionizadas pasan al analizador de masas el cual para evitar la colisión y la reconstrucción de los fragmentos cargados se encuentra a alto vacío. Aquí las especies ionizadas son sometidas a una corriente de radiofrecuencias del electrodo anular el cual estabiliza la trayectoria del fragmento cargado con una masa/carga (m/z) determinada en una órbita circular, mientras que los fragmentos restantes colisionan con los electrodos colectores que se hallan conectados a tierra. Cuando se produce la variación del potencial, los fragmentos se desestabilizan en su órbita pasando al detector (multiplicador de electrones), en el cual se intensifica la señal a casusa de la cascada de electrones producida en cada colisión. Por cada barrido se registra el espectro de masas completo del eluyente cromatográfico (Canosa, 2009).



Figura 6. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas utilizado.

Fuente: (Autora,2016)

1.3.4. Resonancia magnética nuclear.

La resonancia magnética nuclear es la absorción resonante de la radiación por parte de los núcleos o electrones no apareados en un campo magnético. (Atkins & De Paula, 2006). Por medio de la resonancia magnética nuclear podemos obtener detalles sutiles de la estructura molecular de los compuestos, tales como los ángulos de enlace o las densidades electrónicas. Los equipos de resonancia magnética nuclear (Figura 7) constan de un imán estable, encargado de producir el campo magnético, un transmisor de radiofrecuencias, un detector con el que mide la absorción de energía de radiofrecuencia y el ordenador que recibe y registra los datos obtenidos. Gracias a que el estudio se puede utilizar a bajas temperaturas, permite analizar moléculas inestables o de alta reactividad a temperatura ambiente. Utilizando esta técnica podemos examinar el equilibrio conformacional de la molécula, incluso si se trata de una molécula compleja. Este tipo de espectroscopía produce un cambio energético en los núcleos atómicos por lo que es necesario un campo magnético para que estas variaciones energéticas puedan ser observadas. Los núcleos que se estudian generalmente son los del carbono y el hidrógeno debido a que son los más frecuentes en los compuestos orgánicos,

aunque los más estudiados suelen ser el hidrógeno (^1H) y el isótopo minoritario del carbono (^{13}C) (Weininger & Stermitz, 1988).



Figura 7. Equipo de resonancia magnética nuclear utilizada.
Fuente: (Autora, 2016)

1.3.5. Actividad óptica.

La característica principal de la luz polarizada es que esta vibra en un solo plano, sin embargo, hay compuestos que pueden producir que este plano se gire. La actividad óptica o rotación óptica es una característica de ciertas moléculas orgánicas las cuales pueden producir una rotación en un plano de luz polarizada. La determinación de la actividad óptica de un compuesto es muy útil para distinguir enantiómeros, los cuales, a pesar de tener propiedades físicas iguales, tienen un efecto diferente sobre la luz polarizada. Cuando el enantiómero produce que el plano de luz polarizada gire en sentido de las agujas del reloj se denomina dextrógiro (+), mientras que, cuando produce que el plano de luz gire en sentido contrario se denomina levógiro (-). Este fenómeno suele presentarse en compuestos quirales, las cuales son sustancias no superponibles con sus imágenes especulares (Voet & Voet, 2004). La actividad óptica se mide utilizando un polarímetro, en este la luz de una lámpara pasa por un polarizador (prisma de Nicol) el que produce que salga oscilando en un plano único. Esta luz polarizada pasa a través de la celda con la muestra disuelta en un disolvente adecuado, la rotación de la luz y su magnitud son detectadas por un segundo prisma de Nicol móvil el que girará en un ángulo con respecto al primero para permitir el paso de la luz, este ángulo se mide dando la rotación observada del compuesto probado (Figura 8). La rotación observada depende de la concentración de la muestra diluida, de la longitud que debe recorrer la luz y de la fuerza de la actividad óptica de la sustancia (Pickering, 1980).



Figura 8. Equipo de rotación óptica.
Fuente: (Autora, 2016)

1.3.6. Capacidad mínima inhibitoria.

La capacidad mínima inhibitoria (CMI) se refiere a la menor concentración que tiene la capacidad de destruir o eliminar 10^5 bacterias presentes en 1 mL de caldo de cultivo tras un periodo de entre 18 y 24 horas de incubación (Torres, 2001). Dicho de otra forma, la capacidad mínima inhibitoria es la mínima capacidad de un agente antimicrobiano que es capaz de detener el crecimiento y reproducción de una bacteria determinada (Gutiérrez et al, 2009). Para la determinación de la CMI se utiliza el método de diluciones seriadas en el cual se realizan diluciones sucesivas de una muestra, por ejemplo, 1 mL de muestra en 9 mL de diluyente, esta es una dilución 1:10, de esta dilución se toma 1 mL y se lo inocula en 9 mL produciendo una dilución 1:100, de esta dilución se toma 1 mL y se lo inocula en 9 mL de diluyente produciendo una nueva dilución que sería una dilución 1:1000, etc. (Romero, 2007).

2. METODOLOGÍA

2.1. Procedimientos experimentales generales

Los puntos de fusión fueron determinados en un equipo Fisher-Johns-Melting Point Apparatus, serial 40-22 de 50-60Hz, los valores obtenidos no fueron corregidos. En el caso de las cromatografías de gases y espectros de masas, los análisis fueron realizados en el equipo Agilent Technologies 6890N–Network GC System, serial US10347010 adaptado a un espectrómetro de masas MICROMASS, Quattro Ultima, serial VB226 de 50/60 Hz, operando bajo condiciones de impacto de electrones (E1) a 70eV.

Para la obtención de los espectros RMN se utilizó un equipo Varian N° serie 21953, usando CDCl_3 o DMSO a 25°C, el mismo que operó a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C , Los espectros 1D y 2D fueron obtenidos y procesados con el software del equipo o MestReNova versión 10.0.1-14719.

Las cromatografías en columna fueron realizadas utilizando sílica gel 60 (0,063 - 0,200 mm) y sílica gel 60 (0,015 – 0,040 mm), además de sílica gel fase reversa LiChroprep RP-18 (40-63 μm), productos de la compañía Merck. La cromatografía en capa fina se llevó a cabo en placas de aluminio cubiertas de sílica gel de 60 F254 (0,2 mm de espesor, Merck).

2.2. Material vegetal

Las plantas utilizadas en este estudio fueron recolectadas en sector El Villonaco, cerro ubicado en la ciudad de Loja al sur del Ecuador, la recolección se realizó el día 28 de octubre del 2015. Para el estudio se seleccionó una cantidad considerable de cada una de las especies perteneciente a la familia Asteraceae de un cuadrante seleccionado al azar en el área del Villonaco, las coordenadas del área de recolección se encuentran expresadas en la tabla 2.

Tabla 2. Coordenadas de recolección.

Especie	Coordenadas
<i>Gynoxys cf. pulchella</i>	3°59'38" S 79°16'9" O
<i>Baccharis latifolia</i>	3°59'38" S 79°16'9" O

Fuente: (Autora, 2016)

La recolección de las plantas se realizó durante el periodo de floración. Se recolectaron tanto ramas, hojas y flores de las mismas.

Los especímenes de herbario de las plantas descansan en el herbario del departamento de química de la Universidad Técnica Particular de Loja bajo los códigos indicados en la tabla 3.

Tabla 3. Código de herbario para las especies vegetales colectadas.

Especie	Código de herbario
<i>Gynoxys cf. pulchella</i>	PPN-as-059
<i>Baccharis latifolia</i>	PPN-as-007-1

Fuente: (Autora, 2016)

El material recolectado fue colocado posteriormente en una cámara de secado, durante aproximadamente 5 días a una temperatura de 32 °C y una humedad del 40%, para asegurar el completo secado del material vegetal. En la tabla 4 se indica el peso obtenido de cada planta después del secado.

Tabla 4. Pesos de las plantas post secado.

Especie	Peso planta seca (g)
<i>Gynoxys cf. pulchella</i>	630
<i>Baccharis latifolia</i>	729

Fuente: (La Autora, 2016)

2.3. Obtención de los extractos

Los extractos de las dos especies se obtuvieron por maceración simple o estática. El material seco y en fragmentos pequeños fue sumergido en acetato de etilo, durante un periodo mínimo de 24 horas manteniéndolo a temperatura ambiente y lejos de los rayos solares, realizando agitaciones ocasionales. El proceso incluyó tuvo tres maceraciones sucesivas en cada una de las especies para asegurar la extracción de la mayor cantidad de metabolitos posible.

Al final de cada una de las repeticiones, el macerado fue filtrado al vacío separando el material vegetal del solvente para realizar la siguiente maceración. El líquido obtenido de la maceración fue concentrado por rotoevaporación separando así el solvente (Figura 9). Por último, el extracto libre de solvente fue liofilizado para asegurar que se haya eliminado totalmente cualquier remanente de agua.



Figura 9. Secado del extracto por rotoevaporación.

Fuente: (La Autora, 2016)

2.3. Filtrado de clorofilas

2.3.1. Filtrado de clorofilas del extracto de *Gynoxys cf. pulchella*.

El filtrado se llevó a cabo utilizando sílica gel fase reversa (RP18) como fase estacionaria, y una mezcla de MeOH:H₂O en proporción 9:1 como fase móvil. Con ayuda de vacío se hizo pasar 11 gramos de extracto seco por la sílica gel RP18 (200 g, proporción 1:10 extracto/sílica gel) en la cual, por su polaridad, quedaron retenidas las clorofilas, las mismas que fueron posteriormente separadas de la sílica mediante el uso de DCM.

2.3.2. Filtrado de clorofilas del extracto de *Baccharis latifolia*.

El proceso de desclorofilado utilizado fue el mismo que se utilizó con el extracto de *Gynoxys cf. pulchella* utilizando como disolvente una mezcla de MeOH:H₂O, 9:1. La cantidad de extracto a filtrar fue de 20 gramos, utilizando 200 g de sílica gel RP18 por cada 10 gramos de extracto (proporción 1:10 extracto/sílica gel).

2.4. Aislamiento y purificación de compuestos de la especie *Gynoxys cf. pulchella*

El extracto desclorofilado se colocó en una columna empaquetada con sílica gel fase directa (600 g) en proporción 1:100 extracto/sílica gel, utilizando como eluyente inicial Hex:AcOEt en proporción 9:1 e incrementando la polaridad del disolvente llegando hasta llegar a AcOEt, lavando la sílica gel al final con una mezcla de AcOEt:MeOH, 9:1 y DCM.

2.4.1. Aislamiento de betulin (1).

La fracción GX17 (481,8 mg) se cromatografió en columna abierta utilizando sílica gel fase directa (50 g), con un gradiente de Hex:AcOEt, 7:3. De las fracciones resultantes de esta columna se reunieron las fracciones 212 - 213 (8,9 mg) y se las purificó mediante una segunda columna cromatográfica, utilizando sílica gel fase reversa (RP18) (10 g), y MeOH:H₂O, 95:5.

2.4.2. Purificación de la fracción GX18.

Se tomó la fracción GX18 (359,1 mg) y se realizó una columna cromatográfica utilizando sílica gel fase directa (50 g), con un gradiente de Hex:AcOEt en proporción 7:3 respectivamente, de las fracciones resultantes se reunieron las fracciones 2 - 10; estas a su vez fueron unidas con las fracciones 211 y 214 - 216 obtenidas de la columna realizada con la fracción GX17, el producto de la unión de estas fracciones (F400, 362,5 mg) fue purificado mediante otra columna cromatográfica utilizando sílica gel fase directa (40 g) con un gradiente de diclorometano: metanol en proporción 97:3.

2.5. Aislamiento y purificación de compuestos de la especie *Baccharis latifolia*

El extracto desclorofilado se fraccionó mediante cromatografía en columna utilizando sílica gel fase directa (600 g) en una proporción aproximada de 1 en 100. El disolvente de inicio utilizado fue Hex:AcOEt 8:2 incrementando la polaridad del disolvente llegando hasta AcOEt, lavando la sílica gel al final con una mezcla de AcOEt: MeOH 9:1, DCM: MeOH 9:1 y DCM.

2.5.1. Aislamiento del (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (2).

De las fracciones reunidas, la fracción BL21 (173,5 mg) se purificó mediante una columna cromatográfica empaquetada con sílica gel fase reversa (RP18) (20 g), utilizando como fase móvil una mezcla de MeOH:H₂O 9:1.

2.5.2. Aislamiento de 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (3).

La fracción BL28 (567,3 mg) se purificó mediante una columna cromatográfica, utilizando sílica gel fase reversa (RP18) con un gradiente de MeOH:H₂O en proporción 9:1.

2.5.3. Purificación de la fracción BL21.

La fracción BL21 (sílica gel fase reversa, MeOH:H₂O, 9:1) (50 g) fue recristalizado con DCM obteniendo cristales en forma de aguja de color amarillento, los cuales fueron purificados mediante CCF prepativa (8,2 mg) utilizando placas de sílica fase directa y DCM como fase móvil.

2.6. Evaluación de la actividad antibacteriana

Los extractos totales en acetato de etilo de las especies *Gynoxys cf. pulchella* y *Baccharis latifolia* fueron evaluados contra seis cepas de bacterias gramnegativas y una cepa de bacteria grampositiva. En la tabla 5 se detallan las cepas utilizadas, el medio y condiciones de cultivo para cada una de ellas.

El ensayo fue realizado utilizando el método de microdilución en caldo, en el cual se utilizó como concentración final 5×10^5 ufc/mL. Las muestras fueron inoculadas en placas de 96 pocillos siguiendo el método de dilución doble seriada utilizando Tetraciclina (5mg/mL) como control positivo y DMSO como control negativo (CLSI. M7-A7; CLSI. M100-S21).

Tabla 5. Cepas bacterianas utilizados y sus condiciones de cultivo.

Cepa bacteriana	Condiciones de incubación	Medio de cultivo
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	37 °C por 14 – 16 horas	Caldo triptisoya
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 9997)	37 °C por 14 – 16 horas	Caldo triptisoya
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 8427)	37 °C por 14 – 16 horas	Caldo Muller Hinton
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	37 °C por 14 – 16 horas	Caldo triptisoya
<i>Salmonella typhimurium</i> (LT2)	37 °C por 14 – 16 horas	Caldo nutritivo oxid
<i>Salmonella entérica</i> (ATCC 14028)	37 °C por 14 – 16 horas	Caldo nutritivo oxid
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	37 °C por 14 – 16 horas	Caldo triptisoya

Fuente: (ATCC, 2016)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención de los extractos

Del proceso de maceración y secado de los extractos se obtuvieron los resultados expresados en la tabla 6.

Tabla 6. Extractos obtenidos de las especies recolectadas

Especie	Extracto en acetato de etilo (g)
<i>Gynoxys cf. pulchella</i>	34,40
<i>Baccharis latifolia</i>	53,91

Fuente: (Autora, 2016)

3.2. Aislamiento y purificación de compuestos de la especie *Gynoxys cf. pulchella*

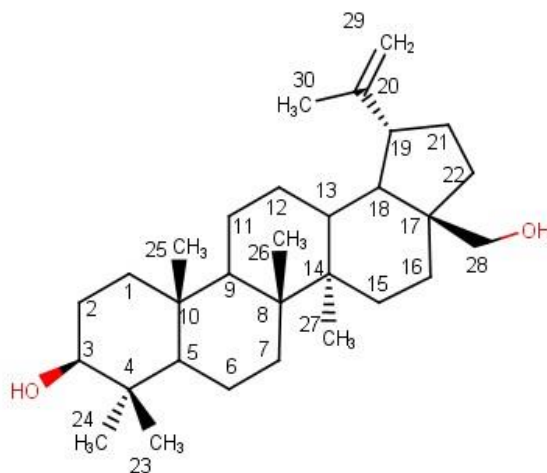
Luego de remover las clorofilas se obtuvieron 5,29 g de extracto los cuales luego de fraccionarlos en cromatografía en columna. Se recolectaron 166 fracciones de aproximadamente 200 mL cada una las cuales fueron comparadas mediante cromatografía en capa fina. Las fracciones que mostraron un perfil cromatográfico similar en CCF se reunieron para obtener un total de 28 fracciones cuyos pesos están expresados en la tabla 7.

Tabla 7. Fracciones obtenidas de la columna cromatográfica de la especie *Gynoxys cf. pulchella* y sus respectivos pesos.

Fracción	Nombre	Peso (mg)	Fracción	Nombre	Peso (mg)
1 – 2	GX01	69,2	51 – 54	GX15	106,3
3 – 5	GX02	49,7	55 – 57	GX16	102,2
6 – 8	GX03	178,5	59 – 70	GX17	481,8
9 – 13	GX04	323,4	71 – 80	GX18	359,1
14 – 16	GX05	76,0	81 -87	GX19	86,3
17 – 20	GX06	66,8	88 – 107	GX20	389,8
21 – 23	GX07	41,7	108 – 120	GX21	156,3
24 – 25	GX08	78,9	121 – 130	GX22	124,8
26 – 29	GX09	226,4	131 – 140	GX23	76,5
30 – 31	GX10	51,8	141 – 150	GX24	52,6
32 – 39	GX11	290,5	151 – 152	GX25	7,5
40 – 41	GX12	101,6	153 – 155	GX26	39,1
42 – 47	GX13	189,2	156 – 158	GX27	507,4
48 – 50	GX14	43,5	159 – 166	GX28	383,0

Fuente: (Autora, 2016)

3.2.1. Aislamiento de betulin (1).



(1)

Figura 10. Estructura de betulin (1)

Fuente: (Uddin et al., 2011)

El betulin (1) o 3 β , 28-dihydroxylup-20(29)-eno es un terpeno pentacíclico con un esqueleto lupánico. También conocido como betulinol (Hayek et al., 1989), su fórmula molecular es C₃₀H₅₀O₂ (Cîntă-Pînzaru et al., 2012) (Figura 10). El compuesto fue aislado en MeOH:H₂O 95:5, su aspecto físico es sólido blanquecino, se aisló un total de 8,7 mg. El *R_f* en fase directa 0,62 (DCM:MeOH, 9:1).

Su espectro de masas (Anexo 1) presentó los siguientes fragmentos: El MS *m/z* (%) 442 (19), 427 (9), 411 (51), 393 (9), 385 (12), 355 (6), 288 (8), 283 (6), 234 (27), 207 (100), 189 (82), 175 (30), 161 (21), 147 (29), 147 (29), 107 (44), 95 (58), 81 (54), 69 (45), los que concuerdan con la bibliografía revisada (Cîntă-Pînzaru et al., 2012).

La tabla 8 muestra los desplazamientos químicos de ¹H y ¹³C para este compuesto y los espectros se encuentran en el Anexo 2 y 3. Los desplazamientos químicos coinciden con los previamente reportados (Patra et al., 1988; Uddin et al., 2011).

En el espectro de ¹H NMR mostró la posición del grupo CH₂OH a δ_H 3.80. Adicionalmente la presencia de cinco señales de metilos y un singulete correspondiente a un metilo posición alílica (δ_H 4.68). En el espectro de ¹³C NMR mostró treinta señales de carbono; seis metilos, doce metilenos, seis metinos y seis carbonos cuaternarios.

Estudios han demostrado que la molécula tiene actividad citotóxica contra líneas celulares cancerígenas principalmente en casos de neuroblastoma (Oh et al, 2006) y en la línea celular HeLA, en líneas de cáncer cervicouterino en la que se ha demostrado que induce apoptosis (Li et al., 2010). Se ha observado también efectos hepatoprotectores contra la citotoxicidad

inducida por cadmio mostrando un mayor efecto protector en las células HepG2 que en las células Hep 3B (Oh et al., 2006).

Tabla 8. Datos de NMR de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) para betulin (1)

Posición	δ_H	δ_C
1	-	38.86
2	-	20.99
3	3.79	79.15
4	-	38.53
5	-	56.43
6	-	18.46
7	-	34.13
8	-	40.85
9	-	55.44
10	-	37.31
11	-	20.99
12	-	25.36
13	-	37.46
14	-	42.87
15	-	27.20
16	-	28.14
17	-	47.04
18	-	50.55
19	2.38	49.42
20	-	150.62
21	-	29.32
22	-	34.38
23	0.93	27.54
24	0.82	16.14
25	0.75	15.52
26	0.97	16.27
27	1.02	14.93
28	-	60.68
29	4.68	109.84
30	1.68	19.24

Fuente: (Autora, 2016)

Estudios en ratones han demostrado su influencia en la vía metabólica específicamente en la biosíntesis de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos. El betulin (1) inhibe el factor de transcripción SREBP responsable de la síntesis de ácidos grasos disminuyendo su producción, observándose una disminución no solamente en la acumulación de ácidos grasos en los adipocitos e hígado si no que disminuyendo igualmente sus niveles sanguíneos y la formación de placas ateroscleróticas. En este estudio también se observó la disminución de la resistencia a la insulina lo que se cree está relacionado igualmente con la inhibición del factor SREBP (Tang et al., 2011).

Los derivados del betulin (1) han mostrado un mayor número de beneficios, especialmente el ácido betulínico el cual posee actividad antimalárica, antiinflamatoria, antifúngica, anti-VIH y anticancerígeno para un amplio espectro de líneas neoplásicas (Alakurtti et al., 2006).

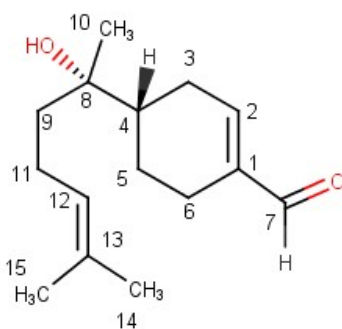
3.2.2 Purificación de la fracción GX18.

De la fracción GX18 fueron aislados 6,8 mg de un sólido blanquecino (DCM:MeOH, 97:3), cuyo R_f en fase directa fue de 0.72 (DCM:MeOH, 9:1). A pesar de mostrar una sola marca en las placas de CCF a diferentes gradientes, tras realizar las pruebas espectroscópicas, los resultados arrojaron que la fracción contenía dos compuestos además de otras impurezas que interfieren con la identificación de la misma.

3.3. Aislamiento y purificación de compuestos de la especie *Baccharis latifolia*

Se desclorofilaron 21 g del extracto total de los cuales se obtuvieron 5,24 g de extracto. Se recolectaron 181 fracciones de aproximadamente 100 ml cada una. Las fracciones que mostraron un perfil cromatográfico similar en CCF se reunieron para obtener un total de 59 fracciones cuyos pesos están expresados en la tabla 9.

3.3.1. Aislamiento del (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (2).



(2)

Figura 11. Estructura del (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (2)

Fuente: (Hashidoko et al., 1992)

Tabla 9. Fracciones obtenidas de la columna cromatográfica de la especie *Baccharis latifolia* y sus respectivos pesos

Fracción	Nombre	Peso (mg)	Fracción	Nombre	Peso (mg)
1	BL01	1,0	64 – 66	BL31	115,8
2	BL02	5,3	67 – 70	BL32	148,7
3	BL03	1,9	71 – 80	BL33	303,1
4	BL04	15,3	81 – 86	BL34	115,6
5	BL05	84,9	87	BL35	48,2
6	BL06	95,6	88	BL36	42,4
7	BL07	63,7	89 – 90	BL37	87,6
8	BL08	41,1	91 – 92	BL38	89,1
9	BL09	129,2	93 – 94	BL39	63,8
10	BL10	64,5	95 – 100	BL40	139,5
11 – 13	BL11	93,5	101	BL41	15,2
14	BL12	17,7	102 – 108	BL42	138,2
15 – 18	BL13	42,9	109 – 110	BL43	27,8
19 – 20	BL14	22,2	111 – 118	BL44	64,5
21	BL15	21,5	119 – 120	BL45	30,2
22 – 23	BL16	5,6	121 – 127	BL46	169,0
24 – 25	BL17	55,7	128 – 130	BL47	60,2
26	BL18	26,4	131 – 133	BL48	57,0
27 – 28	BL19	34,9	134 – 140	BL49	93,7
29 – 30	BL20	38,0	141 – 150	BL50	94,6
31 – 40	BL21	173,5	151 – 160	BL51	92,7
41 – 44	BL22	77,0	161 – 168	BL52	53,1
45	BL23	20,0	169 – 170	BL53	10,8
46 – 47	BL24	44,0	171	BL54	5,0
48 – 49	BL25	346,0	172 – 181	BL55	36,9
50	BL26	26,4	INICIO	BL56	18,9
51	BL27	256,8	AcEt/MeOH1 0%	BL57	563,5
52 – 60	BL28	567,3	DCM/MeOH 10%	BL58	158,9
61 – 70	BL29	84,4	DCM	BL59	90,9
63	BL30	41,5	-	-	-

Fuente: (Autora, 2016)

El compuesto (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (**2**), es un sesquiterpeno de la clase de los bisaboleno (Hashidoko et al., 1992), con fórmula molecular C₁₅H₂₄O₂ (LookChem, 2008) (Figura 11). El compuesto fue aislado en MeOH:H₂O en proporción 9:1, su aspecto físico es un aceite amarillento y se aisló un total de 85,4 mg. El *R_f* en fase directa de 0,64 (Hex:AcOEt, 1:1), y un $[\alpha]_D^{21} = -72.26^\circ$ (c 0,479; CH₂Cl₂).

Su espectro de masas (Anexo 4) presentó los siguientes fragmentos: El MS *m/z* (%) 236 (4), 219 (2), 218 (12), 203 (2), 175 (5), 148 (4), 135 (5), 121 (4), 109 (100), 105 (5), 93 (11), 91 (5), 81 (13), 77 (5), 69 (31), 67 (15), 55 (9), los mismos que concuerdan con la bibliografía revisada (Hashidoko et al., 1992).

La tabla 10 muestra los desplazamientos químicos de ¹H y ¹³C para este compuesto y sus espectros se encuentran en el Anexo 5 y 6. Los desplazamientos químicos coinciden con los previamente reportados (Hashidoko et al., 1992).

Tabla 10. Datos de NMR de ¹H (400 MHz) y ¹³C (100 MHz) para (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (**2**)

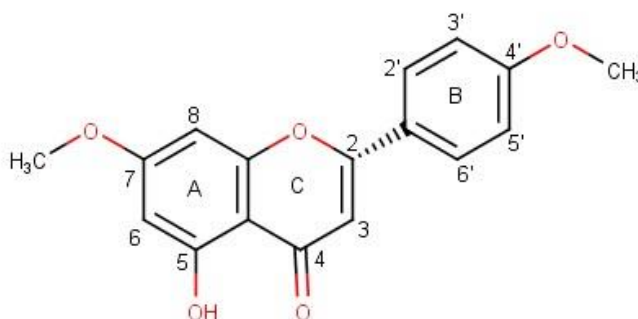
Posición	δ_H	δ_C
1	-	141.52
2	6.81	150.92
3a	2.52	21.95
3b	2.03	-
4	1.69	43.02
5a	1.98	-
5b	1.24	-
6a	2.54	28.08
6b	2.21	-
7	9.43	193.84
8	-	73.90
9	1.54	39.79
10	1.17	23.56
11	2.06	22.14
12	5.13	124.09
13	-	132.10
14	1.69	25.68
15	1.62	17.67

Fuente: (Autora, 2016)

En el espectro de ^1H NMR mostró un protón correspondiente al aldehído a δ_{H} 9.43 junto con dos protones olefínicos (δ_{H} 6.81, m y 5.13, t, respectivamente). Adicionalmente la presencia de dos señales de metilos alílicos (δ_{H} 1.69 y 1.62) y un singulete correspondiente a un metilo en δ_{H} 1.17. El espectro de ^{13}C NMR mostró la presencia de un alcohol terciario a δ_{C} 73.9 y un metino alifático a δ_{C} 43.1.

El compuesto **2** ha sido previamente aislado de algunas especies de la familia asteracea como incluyendo *Verbesina luetzelburgii* (Bohlmann et al., 1980) y *Baccharis latifolia* (Zdero et al., 1989).

3.3.2. Aislamiento de 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (3).



(3)

Figura 12. Estructura de la 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (3)
Fuente: (Ortega, 2013)

El compuesto 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (**3**), es una flavona de fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$ (Ortega, 2013) (Figura 12). El compuesto fue aislado en compuesto fue aislado en MeOH:H₂O 9:1, su aspecto físico es sólido amarillento, se aisló un total de 85,4 mg. El R_f en fase directa de 0,56 (Hex:AcOEt, 1:1).

Su espectro de masas (Anexo 7) presentó los siguientes fragmentos: El MS m/z (%) 298 (100), 269 (24), 240 (2), 212 (3), 166 (6), 135 (11), 95 (6), 69 (3), los mismos que concuerdan con lo previamente reportado (Maciejewicz, 2001; Ortega, 2013).

La tabla 11 muestra los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C para este compuesto y los espectros se encuentran en el Anexo 8 y 9. Los desplazamientos químicos coinciden con los previamente reportados (Maciejewicz, 2001; Ortega, 2013).

En el espectro de ^1H NMR mostró dos señales a δ_{H} 3.86 y 3.82 correspondientes a los dos grupos metoxilo en las posiciones 7 y 4'. También se observan el acoplamiento de protones en los anillos aromáticos, las señales δ_{H} 6.49 y 6.38 en el anillo A y, δ_{H} 7.29 y 7.30 para el

anillo B. El espectro de ^{13}C NMR mostró la presencia de dos señales a δ_{C} 55.54 y 56.9 correspondientes a los grupos metoxilo confirmando lo observado en el protón.

Tabla 11. Datos de NMR de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) para 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (**3**)

Posición	δ_{H}	δ_{C}
2	-	164.24
3	-	103.84
3 β	6.54	-
4	-	183.00
5	-	164.43
6	6.49	99.36
7	-	164.30
8	6.38	94.33
9	-	162.73
10	-	103.44
1'	-	123.52
2'	7.77	128.16
3'	7.29	114.55
4'	-	156.76
5'	7.30	114.61
6'	7.80	128.19
OCH ₃ -7	3.86	55.54
OCH ₃ -4'	3.82	56.39

Fuente: (Autora, 2016)

La bibliografía reporta que el compuesto **3** ha sido aislado previamente de la especie *Baccharis obtusifolia*, *Baccharis trinervis* y *Baccharis salicifolia* (Ortega, 2013) lo que nos lleva a deducir que este es un metabolito secundario propio de las especies del género *Baccharis*.

La molécula 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (**3**) ha mostrado tener actividad citotóxica moderada contra la línea D384, línea celular de astrocitoma cerebral y baja actividad con la línea celular RKO, línea celular del cáncer de colon (Ortega, 2013).

3.3.3. Purificación de la fracción BL21.

De la fracción 218-223 CCF1 se aislaron 2,40 mg de sólido amarillento (MeOH:H₂O, 9:1). R_f en fase directa de 0,59 (Hex:AcOEt, 1:1). A pesar de mostrar una sola marca en las placas de

CCF a diferentes gradientes, tras realizar las pruebas espectroscópicas, se observaron un alto número de impurezas que interfieren con la identificación del compuesto.

3.4. Evaluación de actividad biológica antibacteriana

Los extractos se evaluaron a una concentración máxima de 1.000 µg/mL y una concentración mínima de 7,81 µg/mL, para lo cual se partió de una concentración inicial de 20 mg/mL de extracto en DMSO. Ninguno de los extractos evaluados mostró actividad inhibitoria a las dosis ensayadas, aunque no se descarta su actividad frente a otros sistemas bacterianos o empleando otros sistemas de evaluación de actividad in vitro. La bibliografía revisada indica que el aceite esencial de *B. latifolia* mostró actividad contra *Staphylococcus aureus* (Abad & Bermejo, 2006). Otras especies de *Baccharis* también han demostrado actividad antibacteriana tal es el caso de la *B. dracunculifolia* que posee actividad contra *Streptococcus mutans* y *Salmonella typhimurium* (Abad & Bermejo, 2006). La especie *Gynoxys verrucosa* ha mostrado actividad en contra de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* (Ordóñez et al., 2011).

CONCLUSIONES

- Del extracto en acetato de etilo de la especie *Gynoxys cf. pulchella* se aisló un triterpeno identificado como betulin.
- Del extracto en acetato de etilo de la especie *Baccharis latifolia* se aislaron el sesquiterpeno (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene y la flavona 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone.
- Los extractos en acetato de etilo de las especies *Gynoxys cf. pulchella* y *Baccharis latifolia* no mostraron actividad antibacteriana contra las cepas *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella entérica* y *Staphylococcus aureus*.

RECOMENDACIONES

- Examinar extractos de la especie *Gynoxys cf. pulchella* en diferentes solventes orgánicos para determinar si existe otra polaridad en la que se pueda aislar una cantidad mayor del betulin.
- Estudiar otras especies del género *Gynoxys* para identificar especies que puedan contener betulin.
- Realizar estudios antineoplásicos, antivirales y antifúngicos a los extractos en acetato de etilo de las especies *Gynoxys cf. pulchella* y *Baccharis latifolia*.
- Realizar estudios de actividad biológica al (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene para determinar sus posibles usos en la medicina.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, M. J., & Bermejo, P. (2006). Baccharis (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 2007(7), 76–96.
- Alakurtti, S., Mäkelä, T., Koskimies, S., & Yli-Kauhaluoma, J. (2006). Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(1), 1–13.
- ATCC. (2016). American Type Culture Collection. Retrieved June 20, 2007, from https://www.atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Bacteria/Alphanumeric_Genus_Species.aspx
- Atkins, P., & De Paula, J. (2006). *Atkins. Química física*. España: Editorial Médica Panamericana.
- Beyer, H., & Walter, W. (1987). *Manual de química orgánica*. España: Editorial Reverté.
- Bohlmann, F., Grenz, M., Gupta, R. K., Dhar, A. K., Ahmed, M., King, R. M., & Robinson, H. (1980). Eudesmane derivatives from *Ilex* species. *Phytochemistry*, 19, 2391–2397.
- Bruneton, J., & Fresno, Á. V. (2001). *Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales*. Saragoza: Acribia.
- Canosa, M. del P. (2009). *Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenes. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Cîntă-Pînzaru, S., Dehelean, C. A., Soica, C., Culea, M., & Borcan, F. (2012). Evaluation and differentiation of the Betulaceae birch bark species and their bioactive triterpene content using analytical FT-vibrational spectroscopy and GC-MS. *Chemistry Central Journal*, 6(1), 67.
- Claramunt, R., Farrán, M. de los Á., López, C., Pérez, M., & Santa María, D. (2013). *Química bioorgánica y productos naturales*. Madrid: Editorial UNED.
- Dávalos, E. G., Jiménez, T. V., & Almanza, R. L. (2007). Evaluación de la actividad antiinflamatoria de ocho especies del género Baccharis: *B. articulata*, *B. dracunculifolia*, *B. salicifolia*, *B. ulicina*, *B. latifolia*, *B. pentlandii*, *B. obtusifolia*, *B. subalata*. *Revista Boliviana de Química*, 24(1), 41–44.
- Díaz-Piedrahita, S., & Correa, A. (1999). Algunas novedades en Senecionae (Asteriaceae) de Colombia. Colombia: Rev. Acad. Colomb. Cienc.

- Dupont, H., & Gokel, G. (2007). *Química orgánica experimental*. España: Editorial Reverté.
- Florão, A., Budel, J. M., Duarte, M. D. R., Marcondes, A., Rodrigues, R. A. F., Rodrigues, M. V. N., Santos, C., Weffort-Santos, A. M. (2012). Essential oils from Baccharis species (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells. *Journal of Essential Oil Research*, 24(6), 561–570.
- Freire, A. (2004). *Botánica sistemática ecuatoriana*. St. Louis, Missouri: Missouri Botanical Garden, FUNDACYT, QCNE, RLB y FUNBOTANICA.
- Giuliano, D. A. (2001). Clasificación infragenérica de las especies Argentinas de Baccharis (Asteraceae, Astereae). *Darwiniana*, 39(1–2), 131–154.
- Gonzaga, L., Costa, I., & Pizzolatti, M. G. (2005). Género Baccharis (Asteraceae): aspectos químicos, económicos e biológicos. *Química Nova*, 28(1), 85–94.
- Grandtner, M. M., & Chevrette, J. (2013). *Dictionary of Trees, Volume 2: South America: Nomenclature, Taxonomy and Ecology*. Quebec: Academic Press.
- Gutiérrez, E., Guillamas, C., Méndez, M., Sánchez-Cascado, G., & Tordesillas, L. (2009). *Higiene del medio hospitalario y limpieza de material*. Madrid: Editex.
- Hashidoko, Y., Tahara, S., & Mizutani, J. (1992). Bisabolane sesquiterpenes and a 2-phenoxychromone from Rosa-Woodsii leaves. *Phytochemistry*, 31(6), 2148–2149.
- Hayek, E. W. H., Jordis, U., Moche, W., & Sauter, F. (1989). A bicentennial of betulin. *Phytochemistry*, 28(9), 2229–2242.
- Li, Y., He, K., Huang, Y., Zheng, D., Gao, C., Cui, L., & Jin, Y. H. (2010). Betulin induces mitochondrial cytochrome c release associated apoptosis in human cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, 49(7), 630–640.
- LookChem. (2008). LookChem. Retrieved August 1, 2016, from http://www.lookchem.com/cas/13596-95-7_135972-42-8.html
- Maciejewicz, W. (2001). Isolation of flavonoid aglycones from Propolis by a column chromatography method and their identification by GC-MS and TLC methods. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24(8), 1171–1179.
- Montúfar, R., & Pitman, N. (2003). The IUCN red list of threatened species. Retrieved August 1, 2016, from <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2003.RLTS.T43437A10804432.en>
- Oh, S. H., Choi, J. E., & Lim, S. C. (2006). Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells. *Toxicology*, 220(1), 1–12.

- Ordóñez, P. E., Sharma, K. K., Bystrom, L. M., Alas, M. A., Enriquez, R. G., Malagón, O., Jones, D. E., Guzman, M. L., Compadre, C. M. (2016). Dehydroleucodine, a sesquiterpene lactone from *Gynoxys verrucosa*, demonstrates cytotoxic activity against human leukemia cells. *Journal of Natural Products*.
- Ordóñez, P. E., Sharma, K., Martin, A. B., Reynolds, W. F., Enriquez, R., Malagón, O., Jones, D. E., Guzman, M. L., Compadre, C. M. (2013). The sesquiterpene lactone dehydroleucodine shows potent anti-leukemic activity. *Planta Medica*, 79(10).
- Ordóñez, P., Quave, C., Reynolds, W., Varughese, K., Berry, B., Breen, P., Malagón, O., Smeltzer, M., Compadre, C. (2011). Sesquiterpene lactones from *Gynoxys verrucosa* and their anti-MRSA activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(2), 1055–1059.
- Ortega, G. (2013). *Caracterización de metabolitos secundarios aislados de Baccharis obtusifolia kunt.* Universidad Técnica Particular de Loja.
- Patra, A., Chaudhuri, S., & Panda, S. (1988). Betulin-3-caffeate from *Quercus suber*. ¹³C-NMR Spectra of some lupenes. *Journal of Natural Products*, 51(2), 217–220.
- Peña, A., Arroyo, Á., Gómez, A., & Tapia, R. (1988). *Bioquímica*. Mexico D.F.: Editorial Limusa.
- Pickering, W. F. (1980). *Química analítica moderna*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Primo, E. (2007). *Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria*. España: Editorial Reverté.
- Ramírez, E. J. (2011). *Variabilidad química de extractos y fracciones obtenidas de tres especies de la tribu Senecioneae: Gynoxys hirsuta, Pentacalia ledifolia, Senecio pampae*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Rosales, J. (2012). *Determinación de la composición química, propiedades físicas y actividad biológica del aceite esencial de Baccharis obtusifolia Kunth (Asteraceae) de la provincia de Loja*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Rosillo, M. (2015). *Determinación fisicoquímica y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de Baccharis Latifolia (Asteraceae) de la Provincia de Loja*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Sharapin, N., L., M., Souza, E., Rocha de Albuquerque, E. M., Valverde, E., & López de Almeida, J. M. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*.

Santafé de Bogotá D.C.: Convenio Andrés Bello (CAB) y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

Sierra, I., Pérez, D., Gómez, S., & Morante, S. (2010). *Análisis instrumental: algunas herramientas de enseñanza-aprendizaje adaptadas al espacio europeo de educación superior*. España: Editorial Netbiblo.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. Los Angeles: Universitat Jaume I.

Tang, J. J., Li, J. G., Qi, W., Qiu, W. W., Li, P. S., Li, B. L., & Song, B. L. (2011). Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metabolism*, 13(1), 44–56.

Torres, L. (2001). *Tratado de cuidados críticos y emergencias*. Madrid: Arán Ediciones.

Uddin, G., Waliullah, Siddiqui, B. S., Alam, M., Sadat, A., Ahmad, A., & Uddin, A. (2011). Chemical constituents and phytotoxicity of solvent extracted fractions of stem bark of *Grewia optiva* Drummond ex Burret. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 8(1), 85–91.

Valcárcel, M., & Gómez, A. (1994). *Técnicas analíticas de separación*. Barcelona: Editorial Reverté.

Voet, D., & Voet, J. G. (2004). *Bioquímica*. Montevideo: Editorial Médica Panamericana.

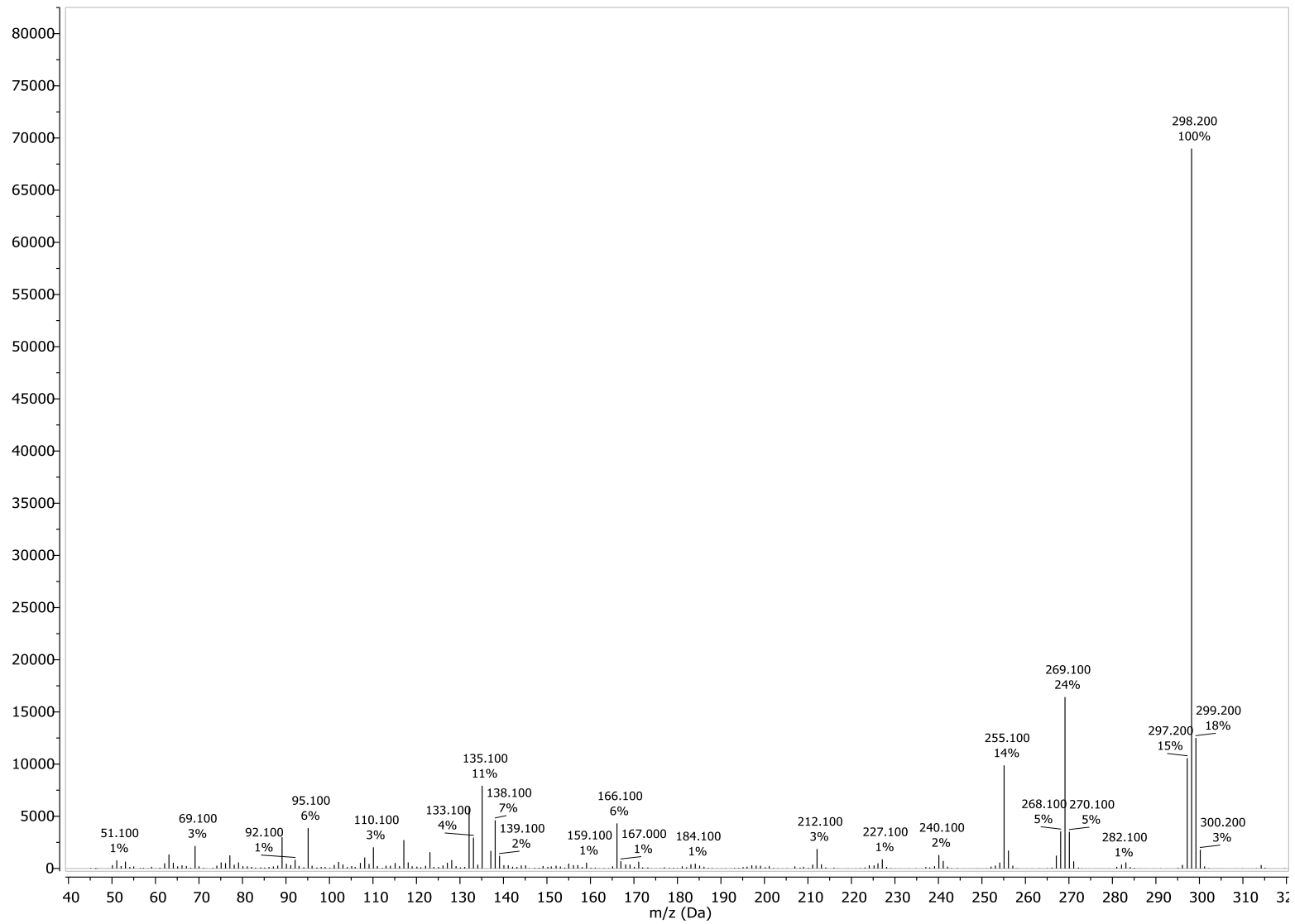
Walton, H. F., & Reyes, J. (2005). *Análisis químico e instrumental Mmoderno*. Barcelona: Editorial Reverté.

Weininger, S. J., & Stermitz, F. R. (1988). *Química orgánica*. España: Editorial Reverté.

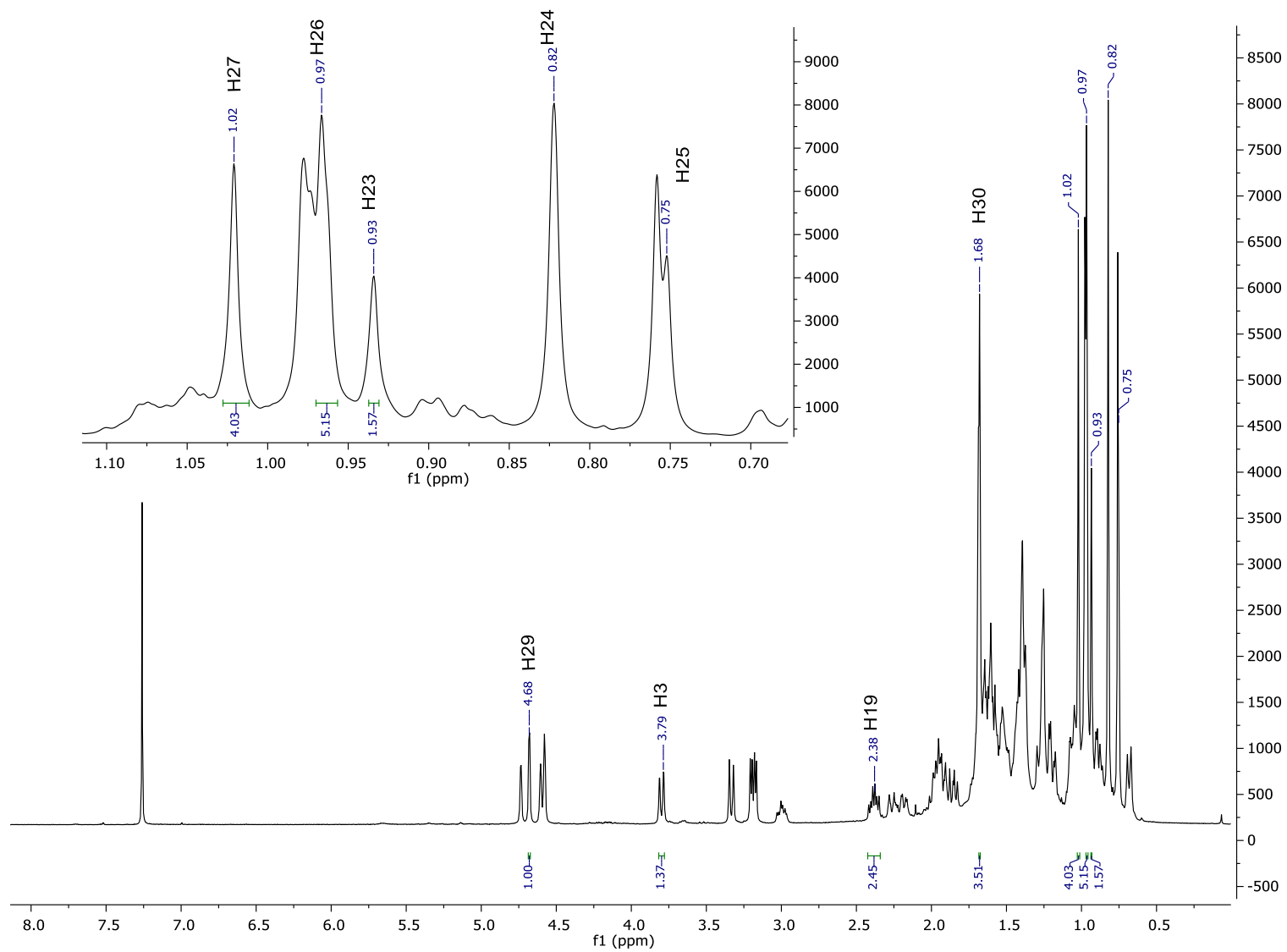
Zdero, C., Bohlmann, F., Kings, R. M., & Robinson, H. (1989). Ent-clerodanes and other constituents, 28(2), 531–542.

ANEXOS

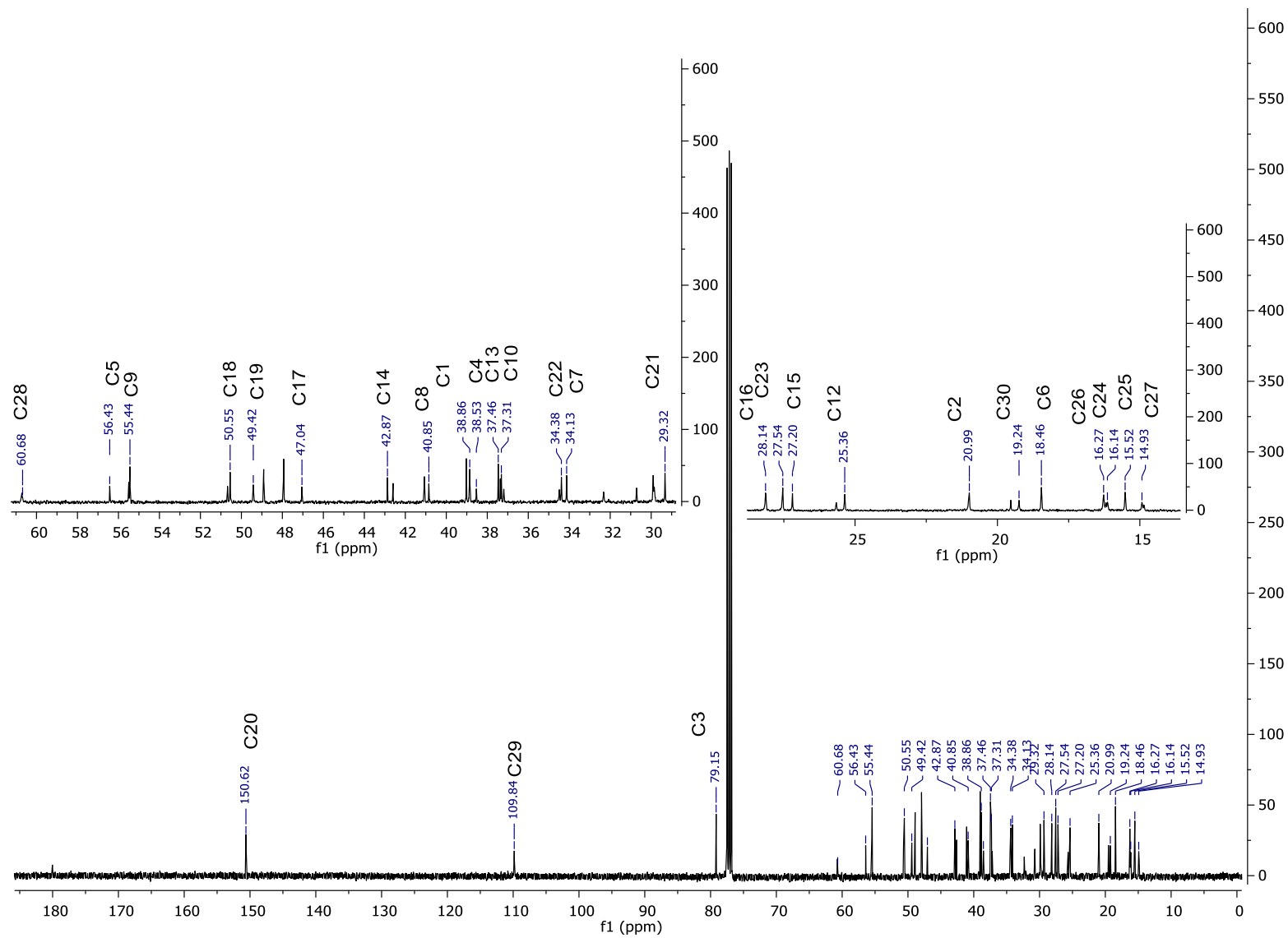
Anexo 1. Espectro de masas del betulin (1)



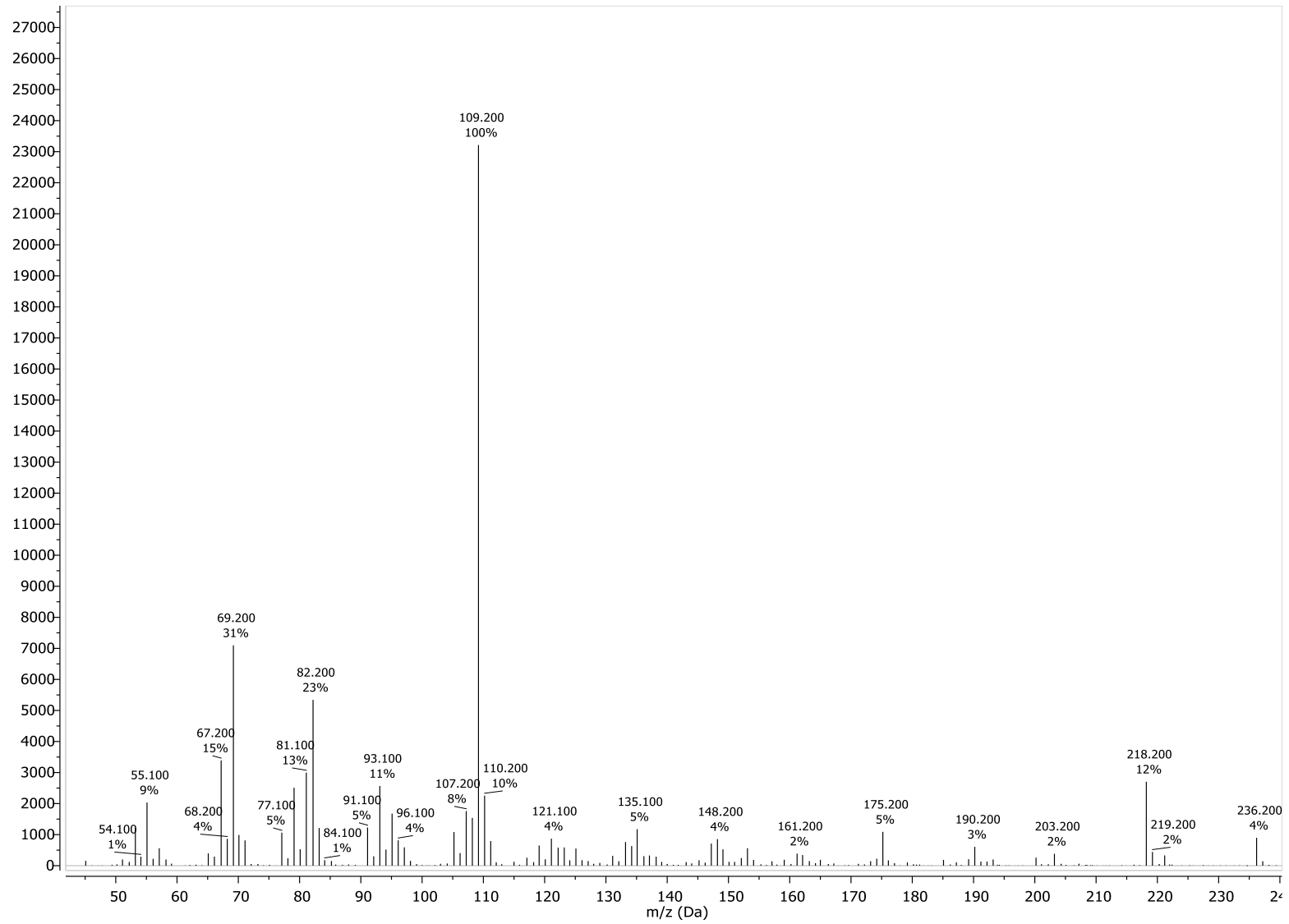
Anexo 2. Espectro ^1H del betulin (1)



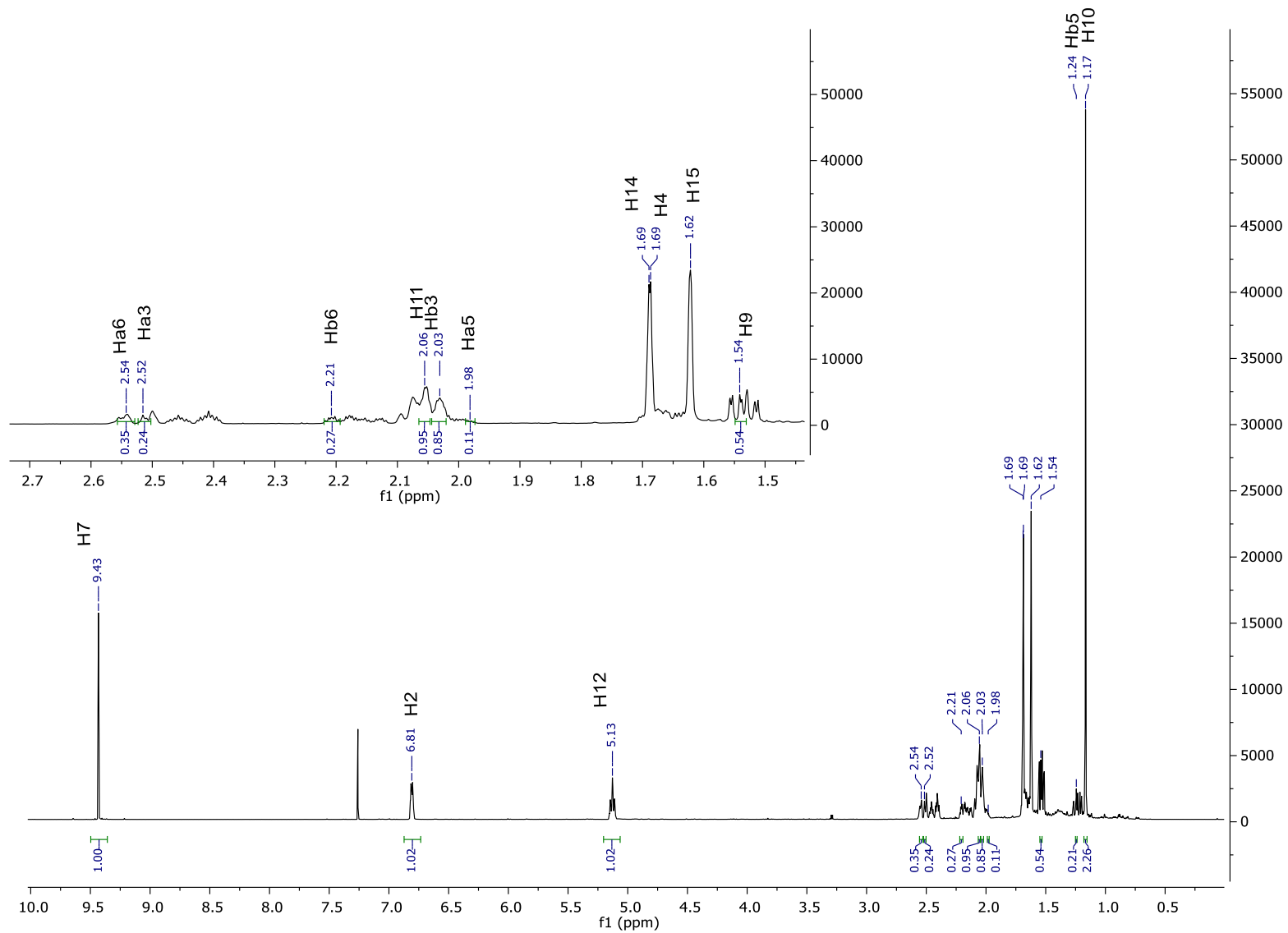
Anexo 3. Espectro ^{13}C del betulin (1)



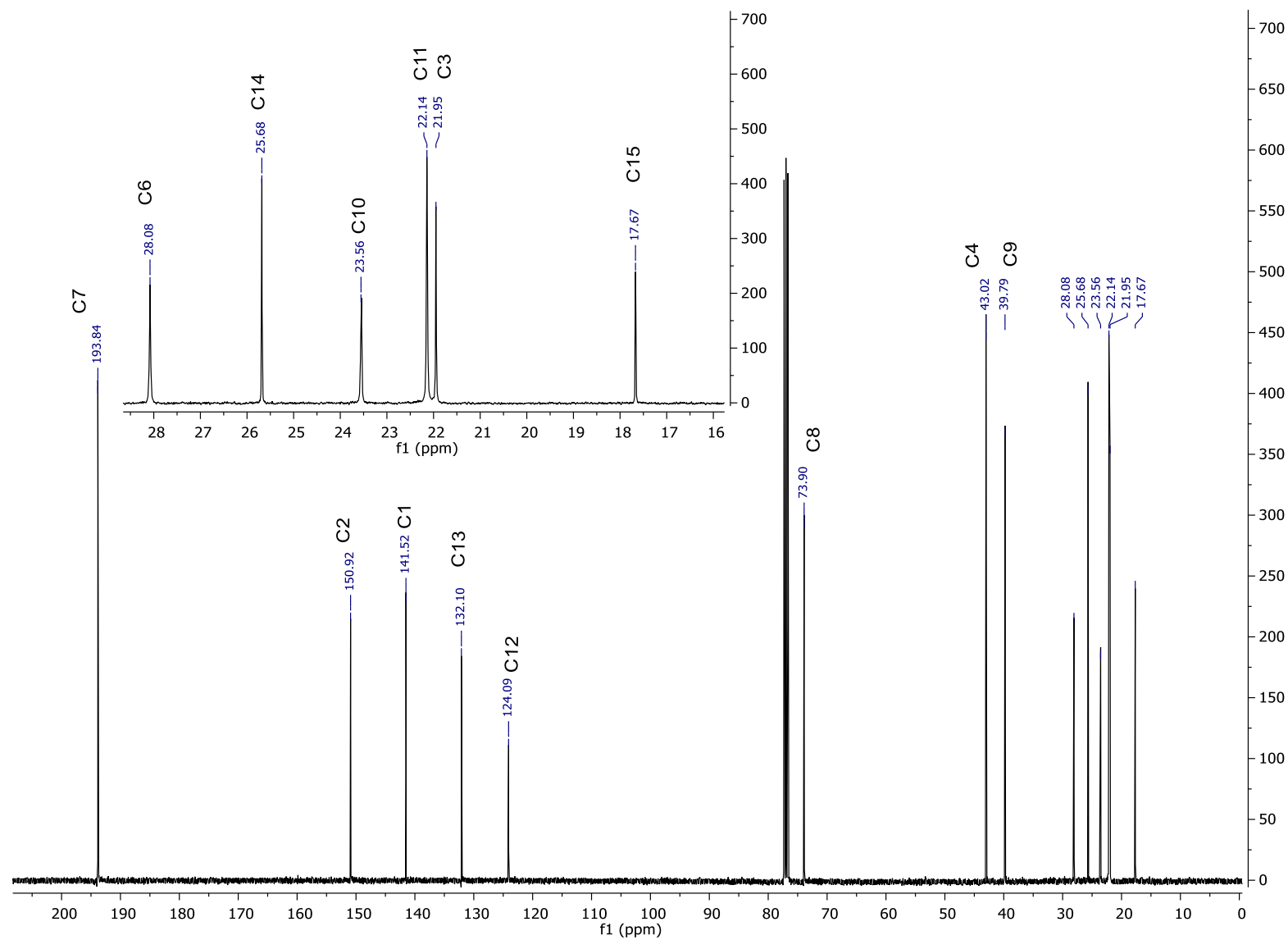
Anexo 4. Espectro de masas del (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (2)



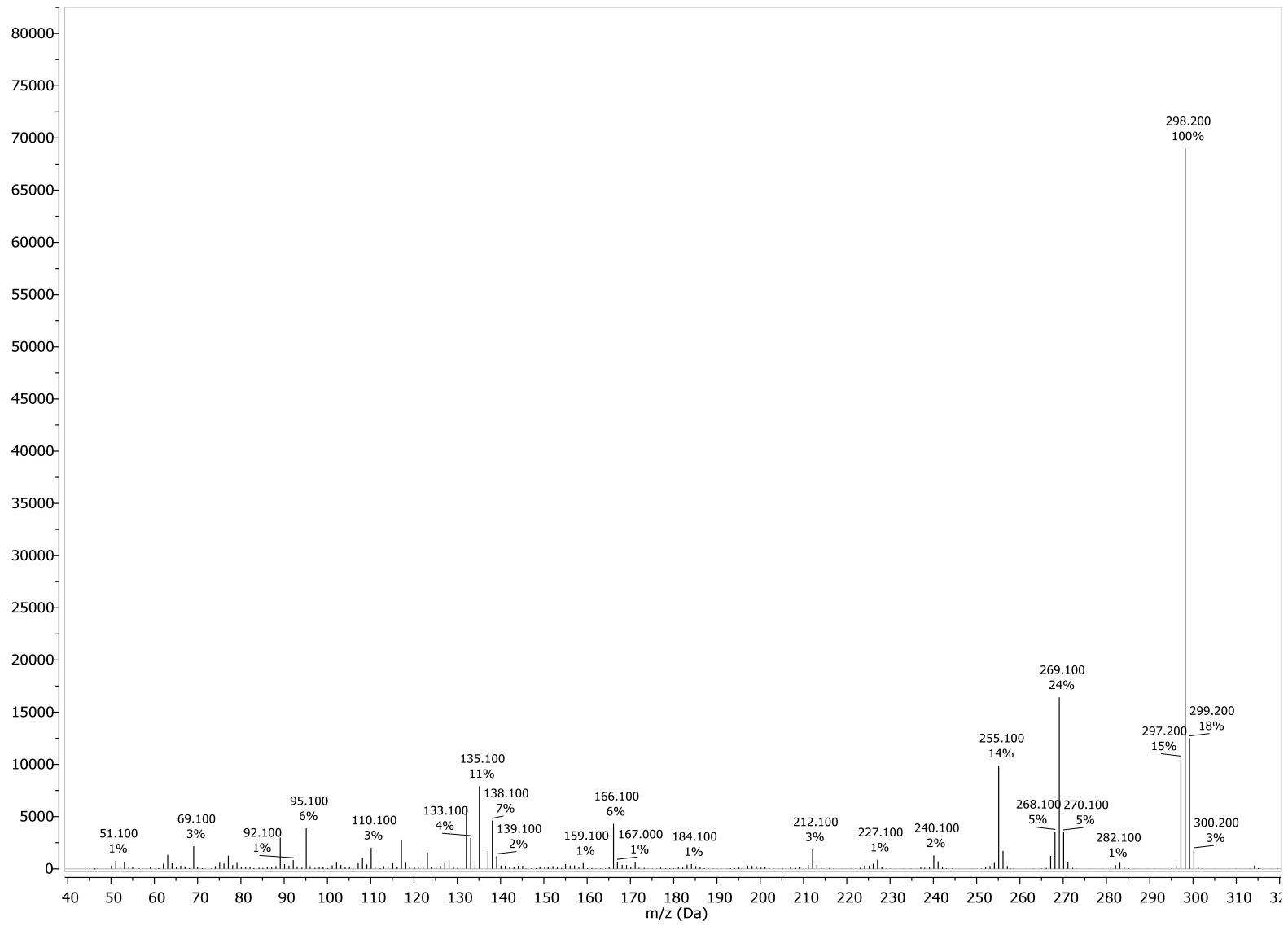
Anexo 5. Espectro ^1H del (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (**2**)



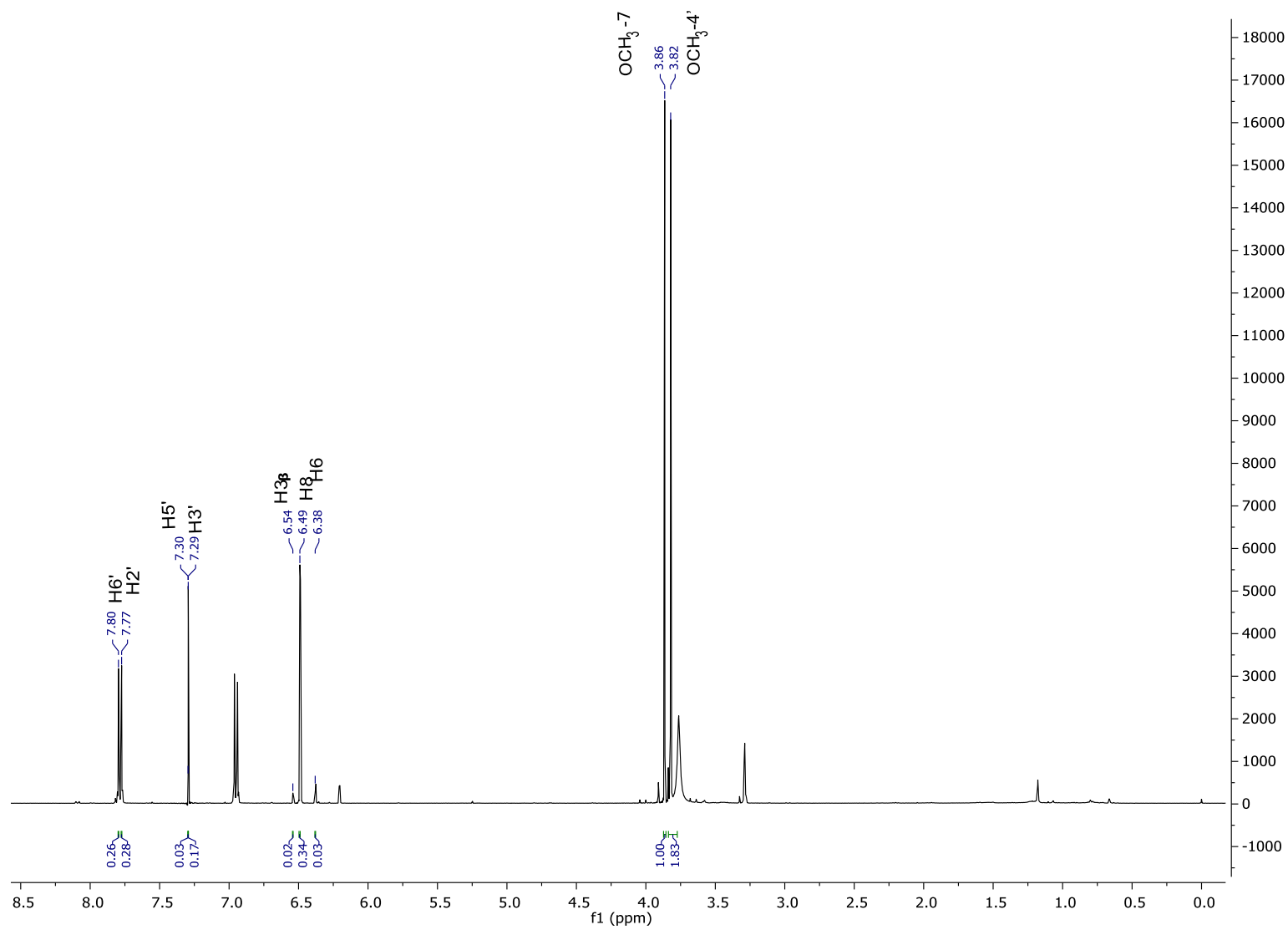
Anexo 6. Espectro ^{13}C del (4S)-7-oxo-8-hydroxybisabola-1(2),12(13)-diene (2)



Anexo 7. Espectro de masas de la 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (3)



Anexo 8. Espectro ^1H de la 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (3)



Anexo 9. Espectro ^{13}C de la 5-hydroxy,4',7-dimethoxyflavone (**3**)

