



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Baccharis oblongifolia*

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: González Muñoz, Yadira Alexandra.

DIRECTOR: Romero Benavides, Juan Carlos, Ing.

LOJA – ECUADOR

2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TABAJO DE TITULACIÓN

Ingeniero

Juan Carlos Romero Benavides.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Baccharis oblongifolia*”: Yadira Alexandra González Muñoz, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, agosto de 2015

f).....

Ing. Romero Benavides Juan Carlos

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Yadira Alexandra González Muñoz, declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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 que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....

González Muñoz Yadira Alexandra
C.I. 1104239346

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mis padres: María y Luis por su apoyo incondicional y sacrificio constante, quienes son mi inspiración diaria y mi ejemplo. A mi hermana por su inmenso cariño y amor. A mi abuelito José por ser mi segundo padre, por educarme y enseñarme a ser mejor persona. También a mis amigos y familiares por sus palabras de aliento en momentos difíciles.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradezco a Dios porque gracias a él todo esto ha sido posible, además agradezco a mis padres por su invaluable apoyo, a mi hermana porque desde pequeña luchó conmigo para salir adelante, a ellos que son el motor de mi vida.

Expreso también mi agradecimiento al Ing. Juan Carlos Romero Benavides por haber compartido sus conocimientos para llevar a cabo presente trabajo de investigación. Además por su aporte, orientación y sugerencias

Agradezco al Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja, personal técnico J. Calva y M. Vega. Por todas las facilidades brindadas para desarrollar este trabajo de investigación.

También agradezco a mis compañeros de por su ayuda, apoyo, colaboración y aporte en el desarrollo de este trabajo.

Este trabajo se desarrolló con el financiamiento otorgado por la SENESCY (Código PIC-13-INSPI-005) y por la UTPL Código (PROY_FIN_QUI_0008).

Yadira G.

INDICE DE CONTENIDO

CARATULA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE DE CONTENIDO	vi
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE ANEXOS	viii
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO I FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO.....	5
1.1. Fin, propósito y componentes del proyecto.....	4
1.1.1. Fin del proyecto.....	4
CAPITULO II MARCO TEORICO.....	5
2.1. Antecedentes.	5
2.1.1. Biodiversidad en el Ecuador.	5
2.1.2. Medicina tradicional y empleo de plantas medicinales.	5
2.1.3. Metabolitos secundarios.....	7
2.1.4. Características botánicas y fitoquímicas de la especie a estudiar.	9
2.1.4.1. <i>Familia Asteraceae y especie Baccharis oblongifolia.</i>	9
2.2 Técnicas para el aislamiento y la identificación de metabolitos secundarios.	11
2.2.1. Maceración.....	11
2.2.2. Cromatografía en columna.....	11
2.2.3. Cromatografía en capa fina.	12
2.2.4. Punto de fusión.	12
2.2.5. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas.	12
2.2.6. Resonancia magnética nuclear.....	13
CAPITULO III MATERIALES Y MÈTODOS	15

3.1.	Selección y recolección de la especie <i>Baccharis oblongifolia</i>	16
3.2.	Tratamiento de la materia vegetal y obtención de extractos.....	17
3.3.	Desclorofilación de extractos.....	17
3.4.	Fraccionamiento de extractos.....	17
3.4.1.	Cromatografía en columna abierta.....	17
3.4.2.	Cromatografía en capa fina.....	18
3.5.	Purificación.....	18
3.6.	Caracterización química de metabolitos secundarios.....	18
3.6.1.	Solubilidad.....	18
3.6.2.	Factor de retención.....	18
3.6.3.	Punto de fusión.....	18
3.6.4.	Cromatografía de gases acoplado a Espectroscopia de masas (CG/EM).....	19
3.6.5.	Resonancia magnética nuclear (RMN).....	19
CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN		20
4.1.	Rendimiento de extractos de la especie en estudio.....	21
4.2.	Desclorofilación del extracto de acetato de etilo.....	21
4.3.	Fraccionamiento por cromatografía en columna.....	21
4.3.1.	Extracto de acetato de etilo.....	21
4.3.2.	Extracto metanólico.....	21
4.4.	Identificación y caracterización química de metabolitos secundarios de <i>Baccharis oblongifolia</i>	22
4.4.1.	Extracto Acetato de etilo.....	22
4.4.1.1.	Fracción AcOEtFDC20_19.....	22
4.4.1.2.	Fracción AcOEtFDC20_22.....	24
4.4.1.3.	Fracción AcOEtFDC20_38.....	24
4.4.2.	Extracto metanólico.....	25
4.4.2.1.	Fracción MEOHF30.....	25
4.4.2.2.	Fracción MEOHF29.....	26
CONCLUSIONES		27
RECOMENDACIONES		28
BIBLIOGRAFÍA.....		29
ANEXOS		32

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación botánica de <i>Baccharis oblongifolia</i>	10
Tabla 2: Peso y rendimiento de los diferentes extractos obtenidos de <i>B. oblongifolia</i>	21
Tabla 3: Datos espectroscópicos de ^{13}C RMN (CD_2Cl_2) de 1 y la referencia bibliográfica....	23
Tabla 4: Datos espectroscópicos de ^1H RMN (CDCl_3) de 1 y referencia bibliográfica.....	23
Tabla 5: Datos espectroscópicos de ^{13}C RMN (CDCl_3) de 2.....	25
Tabla 6: Datos espectroscópicos de ^1H RMN (CDCl_3) de 2.....	25

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la metodología empleada para el desarrollo experimental.....	16
Figura 2: Mapa de la parroquia Yangana de la provincia de Loja lugar de recolección de la especie <i>B. oblongifolia</i>	16
Figura 3: Ácido ent- kaurenoico 1	22
Figura 4: Ácido palmítico 2.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 5: 2-tridecilo xirano 3	26
Figura 6: tetradecanal 4	26
Figura 7: Octadecanal 5	26

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Espectro de CG de la fracción AcOEtFDC20_19 de <i>Baccharis oblongifolia</i> . Se observa $t_R = 23,35$ min.	32
Anexo 2: Espectro de RMN ^1H de la fracción AcOEtFDC20_19 de <i>Baccharis oblongifolia</i> ..	33
Anexo 3: Espectro de RMN ^{13}C de la fracción AcOEtFDC20_19 de <i>Baccharis oblongifolia</i> .	34
Anexo 4: Espectro de masas la fracción AcOEtFDC20_19 de <i>Baccharis oblongifolia</i>	35
Anexo 5: Espectro de CG de la fracción AcOEtFDC20_22 (mezcla 1) de <i>Baccharis oblongifolia</i>	36
Anexo 6: Espectro de CG de la fracción AcOEtFDC20_38 de <i>Baccharis oblongifolia</i> . Se observa $t_R = 19,22$ min.	37
Anexo 7: Espectro de RMN ^1H de la fracción AcOEtFDC20_38 de <i>Baccharis oblongifolia</i> .	38
Anexo 8: Espectro de RMN ^{13}C de la fracción AcOEtFDC20_38 de <i>Baccharis oblongifolia</i>	39
Anexo 9: Espectro de masas de la fracción AcOEtFDC20_38 de <i>Baccharis oblongifolia</i> . ..	40
Anexo 10: Espectro de CG de la fracción MeOHF30 (mezcla 2) de <i>Baccharis oblongifolia</i> .	41

Anexo 11: Espectro de masas correspondiente a 3 de la fracción MEOHF30 de <i>Baccharis oblongifolia</i> ..	42
Anexo 12: Espectro de masas correspondiente a 4 de la fracción MEOHF30 de <i>Baccharis oblongifolia</i> ..	43
Anexo 13: Espectro de masas correspondiente a 5 de la fracción MEOHF30 de <i>Baccharis oblongifolia</i> ..	44

ABREVIATURAS

Hex	Hexano
CD ₂ Cl ₂	Diclorometano deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
AcOEt	Acetato de Etilo
MEOH	Metanol
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas
CG	Cromatografía de gases
t _R	Tiempo de retención
R _F	Factor de retención
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
AcOEtF	Fracción de acetato de etilo
MEOHF	Fracción metanólica

RESUMEN

La especie *Baccharis oblongifolia* se recolectó en el sector cerro Toledo, parroquia Yangana, provincia de Loja, al sur del Ecuador. A partir de *Baccharis oblongifolia* se obtuvieron extractos en polaridad creciente Hex, AcOEt y MeOH respectivamente. El extracto en MeOH presentó mayor rendimiento con 4.92%. Todos los extractos obtenidos se analizaron por cromatografía en columna. Del extracto en acetato de etilo se obtuvo dos compuestos y una mezcla: fracción AcOEtFDC20_19: ácido entkaurenoico (**1**) fracción AcOEtFDC20_38: ácido palmítico (**2**), fracción AcOEtFDC20_22 mezcla de seis compuestos que no se logró identificar. Del extracto metanólico: fracción MeOHF29 se obtuvo un compuesto que presentó problemas de solubilidad y está en proceso de identificación: Fracción MeOHF30 fue una mezcla de ocho compuestos de los cuales 3 probablemente sean: 2-trideciloirano (**3**), Tetradecanal (**4**), octadecanal (**5**). Para la caracterización de metabolitos secundarios se usaron técnicas como: punto de fusión, RMN ^1H , ^{13}C ; y CG/EM.

Palabras clave: *Baccharis oblongifolia*, metabolitos secundarios, ácido entkaurenoico, ácido palmítico, 2-trideciloirano, Tetradecanal, octadecanal.

ABSTRACT

Baccharis Oblongifolia species were collected from the field hill of Toledo, Yangana parish, province of Loja, in southern Ecuador. From *B. oblongifolia* extracts were obtained in increasing polarity Hex, AcOEt and MeOH respectively. The MeOH extract showed higher performance with 4.92%. All extracts were analyzed by column chromatography. Two compounds and a mixture were obtained from the ethyl acetate extract: the AcOEtFDC20_19 fraction, consisting of kaurenoic ent- acid (1) the AcOEtFDC20_38 fraction consisting of palmitic acid (2), and the AcOEtFDC20_22 mixture of six unidentified compounds. From the methanol extract: the MeOHF29 fraction contained a compound that showed solubility problems and is in the process of being identified. The MeOHF30 fraction consists of eight compounds, likely including 2-tridecylxirane (3), tetradecanal (4) and octadecanal (5). melting point, ¹H NMR, ¹³C; and GC / MS analyses were used for the characterization of secondary metabolites.

Keywords: *Baccharis oblongifolia*, secondary metabolites, kaurenoic ent- acid, palmitic acid, 2-tridecylxirane, Tetradecanal, octadecanal.

INTRODUCCIÓN

El Ecuador es el país con mayor biodiversidad por unidad de superficie en el mundo; la diversidad biológica existente en este país posee un alto valor debido a factores como la riqueza de especies, el alto grado de endemidad, la particularidad de los procesos ecológicos y por su estado de conservación (Paredes *et al*, 2012).

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde hace miles de años. Durante mucho tiempo los remedios naturales, sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso terapéutico disponible. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y se ampliara la experiencia en el empleo de los productos que se extraen a partir de ellas (Suley *et al*, 2004).

En la medicina moderna, la cuarta parte de las sustancias son de origen vegetal, para un total de 4500 sustancias naturales. Si bien es cierto que durante el progreso de la industria sintética, se dejó de utilizar una parte considerable de las sustancias vegetales, en la actualidad, debido a los efectos adversos de una elevada cantidad de fármacos sintéticos, así como por la gran demanda de fármacos menos nocivos y más naturales, existe un crecimiento notable de remedios farmacológicos elaborados, en su mayor parte, con sustancias de origen vegetal. (Suley *et al*, 2004).

El género *Baccharis* es exclusivo de América y predomina principalmente en zonas tropicales. Las especies que presenta el género pueden ser arbustos o hierbas perennes, a veces presentan xilopodio, raíces gomíferas o rizomas. Varias especies de éste género han sido ampliamente estudiadas (*B. retusa*, *B. dracunculifolia*) debido a su reconocida utilización en la medicina tradicional de América Latina, presentando una concentración significativa de compuestos que presentaron una acción farmacológica (Calle *et al*, 2012).

En base a información bibliográfica y reportes de literatura de ciertas especies vegetales para el presente proyecto de investigación se consideró analizar *Baccharis oblongifolia* ya que hay reportes fitoquímicos anteriores de aislamientos de metabolitos secundarios es este género, principalmente con actividad anti-inflamatoria, antioxidante, anti-microbiana, anti-fúngica, antileishmanial y enfermedades digestivas (Molares *et al*, 2009).

Este proyecto de fin de carrera es parte del *Programa Nacional para el Abordaje Multidisciplinario de las Parasitosis Desatendidas en el Ecuador (PROPAD)*, Proyecto 5: *Resistencia antiparasitaria y perspectivas del uso de extractos de plantas nativas en ensayos preclínicos*, perteneciente al Instituto Nacional de Investigación en salud Pública (INSPI), que cuenta con el financiamiento de la SENESCYT y está siendo desarrollado en colaboración entre el INSPI, la Universidad Central del Ecuador (UCE) y la UTPL, pretendemos la obtención, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de: *Baccharis oblongifolia* con posible actividad antiparasitaria. En la UCE se evaluará la actividad antiparasitaria de los metabolitos aislados y posteriormente en una segunda fase se realizarán modificaciones químicas y demás tratamientos para potencializar su actividad.

CAPITULO I FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO.

1.1. Fin, propósito y componentes del proyecto.

1.1.1. Fin del proyecto.

Contribuir al conocimiento de la existencia de metabolitos secundarios presentes en extractos obtenidos de *Baccharis oblongifolia*.

1.1.2. Propósito del proyecto.

Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Baccharis oblongifolia*.

1.1.3. Componentes del proyecto.

- Selección y recolección de la especie vegetal.
- Obtención de extractos: en Hexano, Acetato de etilo y Metanol
- Fraccionamiento de extractos mediante cromatografía en columna abierta.
- Purificación y Caracterización de metabolitos secundarios.

CAPITULO II MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes.

2.1.1. Biodiversidad en el Ecuador.

La diversidad florística del Ecuador está representada en gran medida por la variedad de ecosistemas que posee, lo cual constituye la razón principal para que el Ecuador sea considerado entre los países con mayor diversidad del mundo (Cuvi y Caranqui, 2011).

Ecuador, a pesar de su pequeño tamaño (sólo 250.000 km² o 1,5% de América del Sur), es uno de los más diversos países del mundo, tanto en el número absoluto de especies como en el número de especies por unidad de área. Por unidad de área sólo Colombia y Costa Rica tienen más especies de plantas vasculares con respecto a Ecuador. Esta diversidad está relacionada con varios factores, pero principalmente a la confluencia de varias regiones biogeográficas (o ecorregiones): Choco, Tumbes, en el norte y el sur de los Andes centrales, en el norte y sur de la Amazonía occidental, y la variabilidad ambiental dentro de cada uno de estos. Por ejemplo, los Andes centrales del norte y del sur, disponen de varias sub-regiones que se caracterizan por sus diferentes historias evolutivas (por ejemplo, las cordilleras occidental y oriental) y los regímenes climáticos (por ejemplo, muy secas a húmedas), diversos estudios han evaluado la diversidad ecológica del Ecuador, en su mayoría sobre la base de los planes de vegetación. El más reciente intento de consolidar y desarrollar un sistema de clasificación de la vegetación jerárquico integral para el país se llevó a cabo por Ceron y Valencia, para la Costa, los Andes y la Amazonía de Ecuador, respectivamente, en conjunto, estos autores identificaron 72 tipos diferentes de vegetación en el país, cada uno con una composición florística y distribución geográfica característica (Sierra, R., Campos, F y Chamberlin, F, 2002).

Ecuador cuenta con una de las floras más ricas del mundo (cerca de 230 familias y 18.000 especies de plantas vasculares) (Katinas, 2004), existen 17.748 especies nativas documentadas, de las cuales 1.422 pteridofitas, 18 gimnospermas y 16.308 angiospermas (Neill, 2012).

2.1.2. Medicina tradicional y empleo de plantas medicinales.

La medicina tradicional es una realidad presente en todo el mundo. Como su nombre indica, forma parte del patrimonio cultural de cada país y emplea prácticas

que se han transmitido de una generación a otra desde centenares de años antes del desarrollo de nuestra medicina actual (Rodríguez y Méndez 1997).

La medicina tradicional según la organización mundial de la salud (OMS) es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (OMS, 2015).

La medicina tradicional abarca una amplia variedad de terapias y prácticas que varían entre países y entre regiones. En algunos países se denomina medicina alternativa o complementaria, se viene utilizando desde hace miles de años, y sus practicantes han contribuido enormemente a la salud humana, en particular como proveedores de atención primaria de salud al nivel de la comunidad, ha mantenido su popularidad en todo el mundo. A partir del decenio de 1990 se ha constatado un resurgimiento de su utilización en muchos países desarrollados y en desarrollo (OMS, 2015).

Las plantas medicinales y aromáticas juegan un importante papel en el cuidado de la salud de las personas. Hasta el advenimiento de la medicina moderna, el hombre dependió de ellas para el tratamiento de sus enfermedades. La sociedad humana en todas las épocas, ha acumulado un vasto arsenal de conocimientos tradicionales sobre el uso de las plantas medicinales. Aproximadamente el 80 % de la población de la mayor parte de los países en desarrollo todavía usan la medicina tradicional derivada de plantas para satisfacer las necesidades primarias de salud. Países como China, Cuba, Sri-Lanka, Tailandia y otros han inscrito oficialmente en sus programas de salud el uso de la medicina tradicional herbolaria. Aunque los productos de origen natural, particularmente las drogas secas y los extractos, pasaron de ocupar un lugar preponderante a un segundo plano, en las últimas décadas han vuelto a alcanzar una presencia cada vez mayor en la medicina. Este retorno ha sido propiciado por el regreso a lo natural, pero también debido al descubrimiento de efectos dañinos adversos en fármacos sintéticos, al mejor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las drogas vegetales, al desarrollo de métodos analíticos que facilitan el control de calidad y al desarrollo de nuevas formas de preparación y administración de los medicamentos fitoterapéuticos (Castro, 2006).

El regreso del interés científico sobre las plantas medicinales, investigando su riqueza y variabilidad química, ha impulsado una revalorización de su empleo en muchas partes del mundo, representando una forma complementaria de curar, en que el empirismo de la terapia queda atrás en función de la evidencia científica, armonizando la medicina tradicional con las terapias oficiales de cada país (Avello y Cisternas, 2010).

2.1.3. Metabolitos secundarios.

El metabolismo secundario se puede definir como la biosíntesis, la transformación y la degradación de los compuestos endógenos mediante proteínas de especialización, las cuales se han formado como resultado de los procesos de diferenciación y se clasifican según su significación biológica y función en la célula productora (Valdés y Balbín, 2000).

Los metabolitos secundarios pueden ser considerados como productos para la adaptación de un organismo a sobrevivir en un ecosistema particular (Ravelo y Braun, 2009).

Una de las principales diferencias que presentan los metabolitos secundarios con relación a los primarios es su distribución limitada en el reino vegetal; mientras que los compuestos primarios se encuentran en todo el reino y las diferencias entre especies solo son de índole cuantitativa. Estos compuestos químicos se presentan típicamente en sólo una especie o un grupo de plantas taxonómicamente relacionadas por lo que muchos de ellos se consideran marcadores taxonómicos de familias y géneros (García, 2004).

Los metabolitos secundarios se encuentran principalmente en las plantas, pero cada estructura básica varía considerablemente acorde con el Phylum (García, 2004).

Estos compuestos fitoquímicos comprenden una amplia variedad de estructuras químicas entre las cuales pueden mencionarse a los terpenoides, los alcaloides, los esteroides entre otros (Mareggiani, G. 2001).

Las plantas son una fuente importante de estos productos biológicamente activos, muchos de los cuales además constituyen modelos para la síntesis de un gran número de fármacos. Estos compuestos de la naturaleza revelan ser de una gran

diversidad en términos de estructura química y de propiedades físico químicas además de sus propiedades biológicas (Lock, O. 2007).

El término secundario implicaba, al principio de las investigaciones, que estas sustancias tenían una menor importancia y muchas veces se les atribuyó la propiedad de productos de desecho del metabolismo primario. Esta idea ha sido gradualmente cambiada, ya que los compuestos secundarios desempeñan un papel protagónico en la fisiología de la planta, la regulación del crecimiento, su desarrollo y la interacción con otros organismo (García, 2004), por lo que a partir de 1960 se han realizado investigaciones que han hecho evidente la importante función ecológica de muchos de ellos (Valdés y Balbín, 2000).

Cada tipo de compuesto secundario está estrechamente relacionado con una o varias funciones específicas en la planta que lo contiene. Son innumerables los reportes que describen el papel que desempeñan estos compuestos en el reino vegetal, aunque hasta la fecha, en la mayoría de ellos, no se conoce con exactitud cada función particular (García, 2004).

En algunos casos intervienen en las relaciones de competencia con otras plantas, actuando como agentes alelopáticos y contra invasiones de hongos, bacterias y virus; en relaciones de mutualismo en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas; en funciones defensivas causando toxicidad, como protección contra la radiación ultravioleta y la desecación (García, 2004).

Atendiendo a las vías biosintéticas que les dan origen, los compuestos secundarios se dividen en tres grandes grupos: los terpenos, las sustancias fenólicas y los compuestos que contienen nitrógeno en su estructura (Valdés y Balbín, 2000)

El metabolismo primario proporciona un gran número de moléculas simples, como el ácido shiquímico, el acetato y los aminoácidos, los cuales constituyen los materiales de partida para las rutas biosintéticas del metabolismo secundario. El ácido shiquímico, por la ruta metabólica que lleva su nombre, da origen a muchos compuestos aromáticos, entre ellos los aminoácidos, los ácidos cinámicos y algunas estructuras polifenólicas. El acetato es el precursor de los ácidos grasos y de los policétidos en la ruta del acetato-malonato y los terpenos o isoprenoides son

sintetizados en la ruta del acetato-mevalonato. Los aminoácidos son precursores de los alcaloides y de los antibióticos peptídicos (García, 2004).

Es importante destacar que los productos naturales tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc (Avalos y Pérez-Urria, 2011).

En la actualidad, la explotación de la flora continúa, pues hay alrededor del 98 % sin explorar, lo que constituye un recurso excepcionalmente vasto en productos biológicamente activos, que pueden ser útiles, por sí o bien, pueden servir como fuente natural de prototipos químicos para el desarrollo de derivados modificados (con actividades incrementadas y/o toxicidad reducida) (Soler y Porto, 1997).

Medicamentos hechos en base a plantas presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados (Hua *et al.*, 2002).

La incorporación de fitofármacos en el arsenal terapéutico de los laboratorios tradicionales, es otra señal que estimula el empleo de estos principios activos en el tratamiento de diversas patologías, tanto con fines preventivos como curativos (Ordóñez, 2007).

2.1.4. Características botánicas y fitoquímicas de la especie a estudiar.

2.1.4.1. Familia Asteraceae y especie *Baccharis oblongifolia*.

Los crisantemos, margaritas, dalias, girasoles, cardos, la achicoria y la lechuga son algunos de los representantes de la familia Asteraceae, Compositae, o asteráceas o compuestas en un lenguaje coloquial. Las asteráceas comprenden más de 1700 géneros y unas 24.000-30.000 especies distribuidas por todo el mundo, excepto en la Antártida, que incluyen desde pequeñas hierbas de 1 cm de altura hasta árboles de más de 30 m. Las asteráceas se reconocen por su estructura reproductiva, el capítulo donde las flores se disponen en forma sésil sobre un receptáculo ensanchado (Katinas *et al.*, 2007).

El género *Baccharis* comprende alrededor de 400 especies y es uno de los géneros más importantes de la familia Asteraceae, es generalizado en toda América Central y del Sur (Nesom, 2000). Algunas de estas especies se han usado en la medicina popular para el tratamiento de enfermedades del estómago y del hígado, para reducir los procesos inflamatorios y para curar úlceras y heridas de la piel (Sawadogo *et al*, 2012) En estudios químicos anteriores sobre las especies de *Baccharis* se han encontrado varios compuestos tales como terpenoides, y flavonoides (Grecco *et al*, 2010a) .

Además, varios trabajos han demostrado que algunas de las especies de este género han sido fuentes de compuestos antileishmania, principalmente compuestos fenólicos y triterpenoides (da Silva Filho *et al*, 2009 y Passero *et al*, 2011). Trabajos previos han descrito que del extracto EtOH de *Baccharis uncinella*, así como sus principales componentes (ácidos ursólico, oleanólico, pectolinarigenin, ácido cafeico y ácido ferúlico) mostraron actividad contra promastigotes y amastigotes *Leishmania* (L.) *amazonensis* y *Leishmania* (V.) *braziliensis* (Passero *et al*, 2011) . También se informó que la 5,6,7 - trihidroxi - 4 ' metoxiflavanona , un compuesto aislado del extracto de MEOH de *Baccharis retusa* , mostró actividad contra especies de *Leishmania* cutáneas (Grecco *et al*, 2010b)

En la tabla 1 se muestra la clasificación botánica de *B. oblongifolia*.

Tabla 1. Clasificación botánica de *Baccharis oblongifolia*

Nombre científico: <i>Baccharis oblongifolia</i> Reino: Plantae Filo: Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Asterales Familia: Asteraceae Género: <i>Baccharis</i> Especie: <i>Oblongifolia</i>	
---	--

Fuente: (Unep WCMC, 2003)

Baccharis oblongifolia es un arbusto de tamaño mediano o alto que se puede distinguir de otras especies de *Baccharis* por ser grandes arbustos tomentosos o lanuginosos. Hojas penni- o retinervias, leve o marcadamente discoloras (haz verde

oscuro y envés pálido). Capítulos pedunculados, dispuestos en cimas corimbiformes ordenadas en racimos axilares y terminales, formando en conjunto una amplia panícula foliosa. Involucros acampanados. Receptáculos de los capítulos carpelados generalmente provistos de páleas. Flores 10-30. Estilo de las flores estaminadas con ramas breves, adheridas o algo separadas. Corolas de las flores carpeladas con ápice denticulado. Papus de las flores carpeladas uni- o biseriado. Aquenios seríceos, 5-costados (Giuliano, 2001).

De esta especie no existen reportes fitoquímicos anteriores en cuanto al aislamientos de metabolitos secundarios, ya que se realizó la búsqueda bibliográfica respectiva incluyendo sinónimos (*Baccharis berberifolia*, *Baccharis brachylaenoides*, *Molina oblongifolia*, *Baccharis venulosa*, *Baccharis oblanceolata*) de la especie en estudio y no se encontró ningún reporte.

2.2 Técnicas para el aislamiento y la identificación de metabolitos secundarios.

2.2.1. Maceración.

El proceso clásico de maceración consiste en dejar en contacto el material vegetal con el disolvente varios días, con agitación ocasional, este proceso es conocido como maceración estática. Consiste en poner en contacto el material vegetal y el disolvente, se trata de un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración entre el material vegetal y el disolvente, depende de factores que están unidos al material vegetal, como su naturaleza, el tamaño de la partícula, su contenido de humedad y cantidad y factores que están relacionados con el disolvente, como la selectividad y la cantidad. El hinchamiento del material vegetal es factor importante, porque aumenta la permeabilidad de la pared celular y la difusión del disolvente (Sharapin, 2000).

2.2.2. Cromatografía en columna (CC).

Se emplea para la separación de mezclas o purificación de sustancias a escala preparativa. Como fase estacionaria se usa, generalmente, gel de sílice o alúmina dentro de una columna. A través de la columna se hará pasar una cantidad de un disolvente o mezcla de disolventes denominada eluyente y/o fase móvil. La elección del disolvente es crucial para una buena separación. Dicho disolvente pasa a través de la columna por efecto de la gravedad o bien por aplicación de presión. Los compuestos constituyentes de la mezcla son arrastrados por el eluyente a su paso, haciéndoles avanzar a lo largo de la columna. Sin embargo, no

todos los compuestos avanzan a la misma velocidad, y esta es precisamente la clave de la cromatografía. Algunos compuestos se ven más fuertemente retenidos por el adsorbente (fase estacionaria) y por lo tanto avanzarán más despacio. Por el contrario, otros apenas son retenidos y avanzarán a mayor velocidad. En general se dice que la separación en la cromatografía se basa en la afinidad diferencial de los distintos compuestos por la fase móvil o la fase estacionaria (Rocha, 2000).

2.2.3. Cromatografía en capa fina (CCF).

Implica el uso de partículas adsorbentes propagadas en una hoja de vidrio inerte, plástico o metal como una fase estacionaria. Se deja viajar la fase móvil hasta la placa que lleva la muestra que se descubrió inicialmente en el adsorbente justo por encima del disolvente. Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria, la separación puede ser cualquiera de las particiones o cromatografía de adsorción. La ventaja de CCF es que las muestras no tienen que someterse a las extensas medidas de limpieza, y la capacidad para detectar una amplia gama de compuestos, utilizando reactivos de pulverización reactivos. Detección no destructiva (indicadores fluorescentes en las placas, el examen bajo una lámpara UV) también hace que sea posible para muestras purificadas que se rasparon de la placa y ser analizados por otras técnicas (Tesso, 2005).

2.2.4. Punto de fusión.

El punto de fusión normal de un sólido es la temperatura a la que éste pasa de estado sólido a estado líquido, a la presión de 1 atm. Este cambio de estado se produce debido a que el aumento de energía que tiene lugar al elevarse la temperatura hace que las moléculas del sólido rompan las fuerzas intermoleculares que las mantienen unidas, aumentando la movilidad de las mismas, pasando finalmente a estado líquido. El punto de fusión es una constante física característica de cada compuesto, por lo que su determinación es un dato importante en la caracterización de una sustancia, aunque hay que tener en cuenta que compuestos diferentes pueden tener el mismo punto de fusión (Brown *et al.*, 2004)

2.2.5. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas CG/EM.

Es la principal técnica analítica para la separación de compuestos volátiles, por su rápido análisis, resolución, fácil operación y excelentes resultados cuantitativos. Los tiempos de retención son característicos de cada compuesto pero no son

únicos. El espectro de masa es simplemente un plano de la abundancia de los iones en función de masa-carga (m/z), bajo condiciones controladas, las razones de abundancia y peso específico que presentan las especies son únicos para cada compuesto. Estos pueden ser utilizados para determinar el peso molecular y la estructura química de cada compuesto. CG-EM combina las ventajas de ambas técnicas: el alto poder de resolución y la velocidad de análisis de CG, mientras la EM es una técnica capaz de proporcionar información acerca de: la composición elemental de las muestras; la estructura de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas; de la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas y de las relaciones isotópicas de átomos en las muestras (López, 2008).

En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma. En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado (Jhonson y Pasto, 1977).

2.2.6. Resonancia magnética nuclear RMN.

Es el método espectroscópico más poderoso y utilizado para la determinación de la estructura molecular en disolución en líquidos puros y en gases. En muchos casos da información sobre la forma y simetría con un grado de precisión mayor que lo que es posible con otras técnicas espectroscópicas, da también información sobre la velocidad y naturaleza de los cambios de ligandos en las moléculas. La RMN se puede observar únicamente en compuestos que contengan elementos con núcleos magnéticos. La sensibilidad depende de varios parámetros entre ellos la abundancia y la magnitud de su momento magnético nuclear (Shriver *et al*, 2004). Se basa en irradiar mediante radiofrecuencias una muestra sometida a un campo magnético estático y registrar la respuesta de la muestra, la cual es sometida a transiciones inducidas por la radiación entre niveles energéticos que corresponden a distintas orientaciones de los momentos magnéticos de espín de los núcleos respecto del campo estático (McMurry, 2012).

CAPITULO III MATERIALES Y MÈTODOS

3.1. Esquema de trabajo

En la figura 1 se presenta la metodología esquematizada que se empleó en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

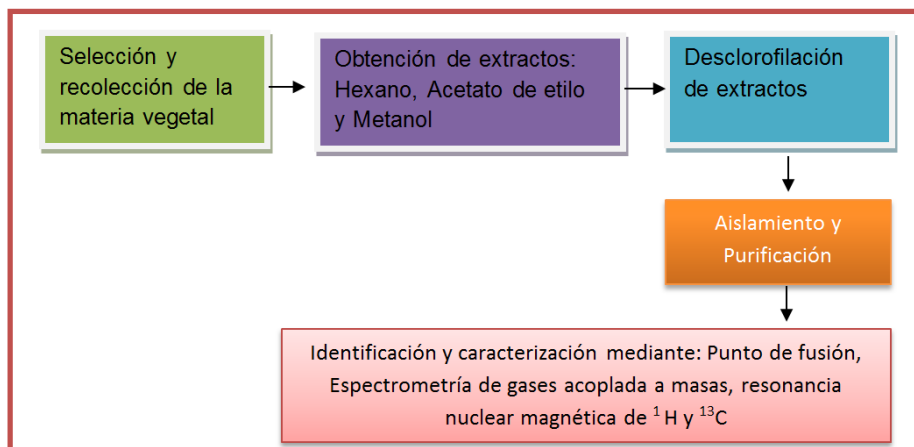


Figura 1: Esquema de la metodología empleada para el desarrollo experimental

Fuente: Autora

3.2. Selección y recolección de la especie *Baccharis oblongifolia*.

Se seleccionó la especie en base a información bibliográfica (da Silva Filho *et al*, 2009 y Passero *et al*, 2011). La especie se recolectó en el sector cerro Toledo de la parroquia Yangana de la provincia de Loja al sur del Ecuador con coordenadas S 04°22'56.41"; W79°09'01.9". Ver figura 2.

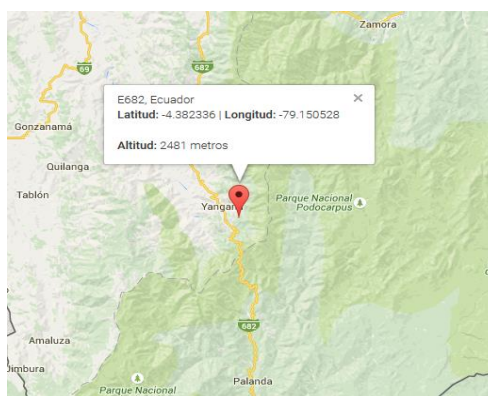


Figura 2: Mapa de la parroquia Yangana de la provincia de Loja lugar de recolección de la especie *B. oblongifolia*

Fuente: Autora

La especie fue identificada por la Dra. Fani Tinitana, una muestra de esta especie se depositó en el herbario de la UTPL bajo el número de voucher HUTPL5336

3.3. Tratamiento de la materia vegetal y obtención de extractos.

La especie se sometió a un proceso de secado a 30°C durante aproximadamente diez días en un secadero de bandejas con flujo de aire continuo en el Departamento de Química de la UTPL y posteriormente fue sometida a maceración estática empleando disolventes de polaridades crecientes (Hexano, Acetato de etilo y Metanol), 5.03 kg de materia vegetal se cubrieron totalmente con aproximadamente 20 litros de disolvente y se dejó reposar por tres días, seguidamente se llevó a cabo una filtración al vacío y con la ayuda de un rotaevaporador se concentró y se eliminó el disolvente presente en los extractos. Este procedimiento se llevó a cabo por tres ocasiones, finalmente se obtuvo los distintos extractos que fueron pesados y etiquetados.

Para calcular el rendimiento de los extractos se utilizó la siguiente formula:

$$Rendimiento(\%) = \frac{Peso\ total\ del\ extracto}{Peso\ de\ materia\ prima\ seca} \times 100$$

3.4. Desclorofilación de extractos.

Se empleó cromatografía en columna abierta utilizando sílica gel C18 y extracto (10 gramos) en proporción 1:10, este procedimiento se repitió por 5 ocasiones desclorofilando un total de 50g de extracto de acetato de etilo. Para la elución de las columnas se empleó mezclas de: agua y metanol. Posterior a ello se realizó cromatografía de capa fina a cada una de las fracciones obtenidas, para visualizar la eliminación de clorofilas y riqueza fitoquímica. Este procedimiento no se realizó para el extracto metanólico ya que se perdía la riqueza fitoquímica del mismo.

3.5. Aislamiento y purificación de los extractos.

3.5.1. Aislamiento

3.5.1.1. Cromatografía en columna abierta.

Para fraccionar los extractos se utilizó cromatografía en columna abierta, para ello se empleó: sílica gel 60 F254 y fracciones de extracto de acetato de etilo libre de clorofilas, con un buen perfil fitoquímico en proporción 1:100. Para eluir las columnas se usó mezclas de: hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol, para obtener fracciones de aproximadamente 100 ml, las cuales fueron llevadas a rotaevaporación con la finalidad de eliminar los disolventes y posteriormente realizar cromatografía de capa fina de cada fracción y evaluar su perfil fitoquímico.

Para el extracto metanolico se utilizó, el extracto sin desclorofilar y se continuó con el mismo procedimiento expuesto en el apartado 3.5.1.1.

3.5.1.2. Cromatografía en capa fina.

En este tipo de cromatografía se utilizaron placas de aluminio de silica gel 60 F₂₅₄ que fueron eluidas en diferentes mezclas de disolventes tales como: diclorometano, hexano, acetato de etilo y metanol, para posteriormente ser observadas en la luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y en la luz ultravioleta de onda larga (365 nm) y finalmente fueron reveladas con soluciones de ácido sulfúrico y vainillina.

3.5.2. Purificación de los compuestos.

En base a la cromatografía en capa fina, se unieron las fracciones que presentaron un perfil cromatográfico similar con la finalidad de purificarlas.

3.6. Caracterización química de metabolitos secundarios.

3.6.1. Solubilidad.

Los disolventes utilizados para evaluar la solubilidad de los metabolitos aislados fueron: hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol, acetona y DMSO

3.6.2. Factor de retención.

El factor de retención se expresa la relación entre la distancia recorrida por los componentes de la muestra y la distancia recorrida por el solvente.

El valor fue obtenido a través de la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

3.6.3. Punto de fusión.

Tomando una muestra solida de los compuestos aislados se determinó el punto de fusión mediante el equipo Fisher Johns, serial 40-22 de 50-60 Hz.

3.6.4. Cromatografía de gases acoplado a Espectroscopia de masas (CG/EM).

Los compuestos aislados fueron analizados en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5973 inert), de esta manera fueron determinados los espectros empleando una columna cromatográfica BSNS.

3.6.5. Resonancia magnética nuclear (RMN).

Los compuestos aislados previamente disueltos en disolventes deuterado, fueron sometidos a RMN para determinar los espectros de ^1H y ^{13}C mediante el empleo del equipo de resonancia magnética nuclear Varian 400 y 100 MHz-Premium Schelded, los desplazamientos químicos se expresaron en δ (ppm) en relación al tetrametilsilano (TMS), mientras que las constantes de acoplamiento J se expresaron en Hertz.

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÒN

4.1. Rendimiento de extractos de la especie en estudio.

Los resultados que corresponden al peso obtenido de los diferentes extractos y su rendimiento se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Peso y rendimiento de los diferentes extractos obtenidos de *B. oblongifolia*

Especie	Disolvente	Peso (g)	Rendimiento (%)
<i>Baccharis oblongifolia</i>	Hexano	81,75	1,62
	Acetato de etilo	84,55	1,68
	Metanol	247,63	4,92

Fuente: Autora.

4.2. Desclorofilación del extracto de acetato de etilo.

Al realizarse el procedimiento por 5 ocasiones se obtuvo 5 grupos de desclorofilación, el primero con 29, el segundo con 12, el tercero con 30, el cuarto con 19 y el quinto con 21 fracciones, es así que se obtuvieron en total 111 fracciones las que fueron evaluadas y unidad de acuerdo al perfil cromatográfico mostrado en CCF obteniendo 52 fracciones libres de clorofila (AcOEtF1-AcOEtF52).

4.3. Aislamiento de compuestos.

4.3.1. Extracto de acetato de etilo.

De la fracción AcOEtF20 desclorofilada, se obtuvo 58 fracciones, cada una con un volumen de 100 ml que se unieron después de evaluar su perfil cromatográfico y se consiguieron 42 fracciones (AcOEtFDC20-1: AcOEtFDC20-42).

4.3.2. Extracto metanólico.

Se obtuvo 61 fracciones cada una con un volumen de 100 ml que se unieron después de evaluar su perfil cromatográfico obteniendo 48 fracciones (MEOHF1- MEOHF48).

4.4. Identificación y caracterización química de metabolitos secundarios de *Baccharis oblongifolia*.

4.4.1. Extracto Acetato de etilo.

4.4.1.1. Fracción AcOEtFD20_19.

De la fracción AcOEtFD20_19, eluido en polaridad Hex 7:3 AcOEt, se obtuvo un material cristalino amarillo que al ser evaluado mediante CCF presento impurezas por lo que fue llevado a recristalización con metanol, obteniendo al final del proceso 25.1 mg de un sólido cristalino con punto de fusión de 173-176°C, soluble en diclorometano y cloroformo, con un R_F de 0,65 eluido en polaridad Hex 8:2 AcOEt. Este compuesto se analizó mediante CG/EM (Anexo 1) el mismo que muestra un tiempo de retención t_R = 23,35 min y además se sometió a espectroscopia de RMN de ^1H (CDCl_3) y ^{13}C (CD_2Cl_2) (Anexos 2 y 3). La identificación se realizó comparando con espectros reportados en literatura (Suárez *et al.*, 2013). Este compuesto se identificó como ácido ent-kaurenoico (figura 3), con fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ y peso molecular de 302 g/mol, que coincide con el $M_{\pm}$, mostrado en el espectro de masas de 302 m/z este es el primer reporte del compuesto para *B oblongifolia*, sin embargo este mismo compuesto ya se ha reportado en la especie *Croton gossypifolius*, perteneciente a la familia Crotonoideae (Suárez *et al.*, 2013) y *Mitrephora celebica* perteneciente a la familia Asteraceae (Peña., 2009).

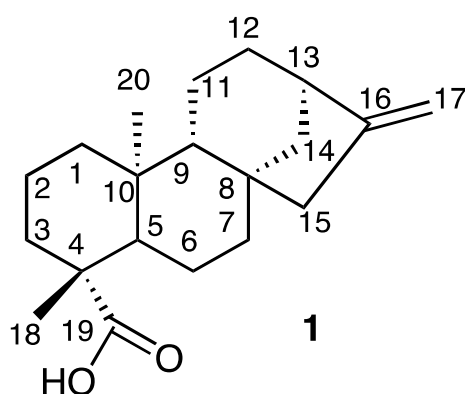


Figura 3: Ácido ent- kaurenoico (**1**)

Fuente: Autora

Los datos espectroscópicos del **1** se muestran en la tabla 3 y 4.

Tabla 3: Datos espectroscópicos de ^{13}C RMN (CD_2Cl_2) de **1** y la referencia bibliográfica.

Compuesto 1		Referencia (Suárez <i>et al.</i> , 2013)		
Desplazamiento químico (ppm)	Tipo de Carbonos	Desplazamiento químico ^{13}C	Tipo de Carbonos	Asignación
184.4	C	184.01	C	C-19
156.0	C	156.11	C	C-16
103.1	CH ₂	102.77	CH ₂	C-17
57.1	CH	57.02	CH	C-5
55.1	CH	55.17	CH	C-9
49.0	CH	49.02	CH	C-15
44.3	CH	44.27	CH	C-8
43.9	CH	44.04	CH	C-13
43.8	CH	43.75	CH	C-4
41.3	CH ₂	41.30	CH ₂	C-7
40.8	CH ₂	40.75	CH ₂	C-1
39.7	CH ₂	39.75	CH ₂	C-14
39.3	CH ₂	39.72	CH ₂	C-10
37.9	CH ₂	37.82	CH ₂	C-3
33.2	CH ₂	33.20	CH ₂	C-12
29.0	CH ₃	28.80	CH ₃	C-18
21.9	CH ₂	21.88	CH ₂	C-6
19.2	CH ₂	19.20	CH ₂	C-2
18.5	CH ₂	18.48	CH ₂	C-11
15.7	CH ₃	15.52	CH ₃	C-20

Fuente: Autora

Tabla 4: Datos espectroscópicos de ^1H RMN (CDCl_3) de **1** y referencia bibliográfica

Compuesto 1		Referencia (Suárez <i>et al.</i> , 2013)		
Desplazamiento químico (ppm)	Multiplicidad	Desplazamiento químico	Multiplicidad	Asignación
1.01	m	0.98	dt	H-3 ^a
0.95	s	0.99	s	H-20
1.02-1.05	m	1.02-1.05	m	H-9
1.15	m	1.07	dd	H-14 ^a
1.23	s	1.23	s	H-18
1.43-1.60	m	1.48-1.57	m	H-2, H-7, H-11a, H-12
1.60-1.88	m	1.80-1.84	m	H-1b, H-6, H-11b
2.02	m	1.89	d	H-14b
1.99-2.06	m	1.99-2.03	m	H-15
2.60	t	2.67	sa	H-13
4.73	s	4.72	s	H-17 ^a
4.79	s	4.78	s	H-17b

Fuente: Autora

4.4.1.2. Fracción AcOEtFD20_22.

De la fracción AcOEtFD20_22 eluida en cromatografía en columna, en polaridad CH_2Cl_2 100%, se obtuvo 0,9 mg de un polvo blanquecino, con punto de fusión 98-103°C y soluble en diclorometano y cloroformo. Esta fracción fue analizada por CG/EM (Anexo 4) mostrando seis tiempos de retención distintos, t_R = 21,36; 22,87; 24,10; 28,20; 28,82 y 34,29 min, no fue posible identificar los elementos que conforman la mezcla, debido a la poca cantidad que se obtuvo y tampoco se logró separar los compuestos ya que los tiempos de retención son muy similares .

4.4.1.3. Fracción AcOEtFD20_38.

De la fracción AcOEtFD20_38 eluida en polaridad CH_2Cl_2 100%, se obtuvo un material cristalino amarillo que al ser evaluado mediante CCF presento impurezas por lo que fue llevado a recristalización con metanol, obteniendo al final del proceso 2.3 mg de un sólido cristalino con punto de fusión de 61-63°C, soluble en diclorometano y cloroformo, con un R_F correspondiente a 0,6 eluido en polaridad CH_2Cl_2 100%. Este compuesto se analizó mediante CG/EM (Anexo 5) mostrando un tiempo de retención t_R = 19,22 min y además se sometió a espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C (CDCl_3) (Anexos 6 y 7). La identificación se la realizó en base a los resultados obtenidos en CG/EM en donde se emplea la base de datos Wiley 7n.I, también se tomó en cuenta reportes de literatura anteriores que apoyan esta estructura (Benavides., 2004). Este compuesto se lo identificó como ácido palmítico con fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ y peso molecular de 256 g/mol, que coincide con el $M_{\pm}$, mostrado en el espectro de masas de 256 m/z este es el primer reporte del compuesto para *B oblongifolia*, sin embargo este mismo compuesto ya se ha reportado en la especie *Grias neuberthii*, perteneciente a la familia *Lecythidaceae* (Alva et al., 2002) y *Annona muricata*, perteneciente a la familia *Annonaceae* (Ocampo et al., 2007). Ver figura 4.

2

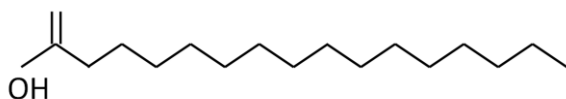


Figura 4: ácido palmítico 2

Fuente: Autora

Los datos espectroscópicos de 2 se muestran en la tabla 5 y 6.

Tabla 5: Datos espectroscópicos de ^{13}C RMN (CDCl_3) de **2**.

Compuesto 2		
Desplazamiento químico (ppm)	Tipo de Carbonos	Asignación
180	C	C-1
33.69	CH ₂	C-2
32.07	CH ₂	C-3
29.22-29.84	CH ₂	C-4-C13
24.86	CH ₂	C-14
22.84	CH ₂	C-15
14.27	CH ₃	C-16

Fuente: Autora

Tabla 6: Datos espectroscópicos de ^1H RMN (CDCl_3) de **2**.

Compuesto 2		
Desplazamiento químico (ppm)	Multiplicidad	Asignación
0.87	m	H-16a, 16b, 16c
1.61-1.65	t	H-3a, 3b
2.33-2.36	t	H-2a, 2b
1.20-1.33	m	H-4a, 4b H-5a, 5b H-6a, 6b H-7a, 7b H-8a, 8b H-10a, 10b H-11a, 11b H-12a, 12b H-13a, 13b H-14a, 14b H-15a, 15b

Fuente: Autora

4.4.2. Extracto metanólico.

4.4.2.1. Fracción MEOHF30.

De la fracción MEOHF30 eluida en una mezcla de $\text{AcOEt}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$, en proporción 5:0,8:0,5 mediante cromatografía en columna se obtuvo 1,36 mg de un polvo de color blanquecino, con punto de fusión $158\text{-}163^\circ\text{C}$, soluble en MeOH. Esta fracción fue analizada por CG mostrando ocho tiempos de retención distintos, que corresponden a ocho compuestos, Ver anexo N°8. De acuerdo con la base de datos Wiley 7n.I, probablemente tres podrían ser: 2-tridecilo xirano (**3**) con $t_R = 22,46$ min y peso molecular de 226 g/mol, tetradecanal (**4**) con $t_R = 23,30$ min y peso molecular de 212

g/mol, octadecanal (**5**) con $t_R = 24,11$ min y peso molecular de 268 g/mol, en cuanto a los tiempos de retención sobrantes: $t_R = 16,40$ min, $t_R = 16,58$, $t_R = 19,23$, $t_R = 23,91$, no fue posible identificarlos. Ver figura 5,6 y 7.

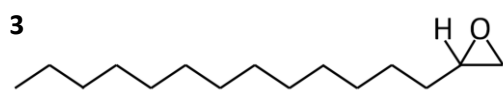


Figura 4: 2-trideciloóxirano (**3**)

Fuente: Autora

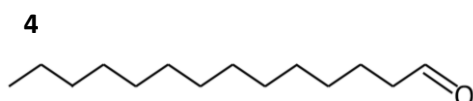


Figura 5: tetradecanal (**4**)

Fuente: Autora

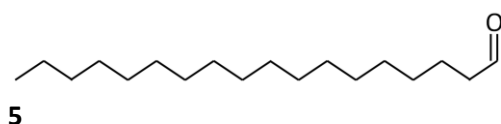


Figura 6: Octadecanal (**5**)

Fuente: Autora

4.4.2.2. Fracción MEOHF29.

De la fracción MEOHF29 eluida en una mezcla de AcOEt:MEOH:H₂O, en proporción 5:0,8:0,5 mediante cromatografía en columna, se obtuvo 13 mg de un polvo de color blanquecino, con punto de fusión mayor a 300°C, soluble únicamente en piridina, por problemas de solubilidad está en proceso de identificación.

CONCLUSIONES

De los extractos obtenidos de *Baccharis oblongifolia* el que evidencio mayor rendimiento fue el extracto metanolico con 4,92%, en comparación con el extracto hexánico y en acetato de etilo.

Del extracto en acetato de etilo de *Baccharis oblongifolia* se identificó dos compuestos: Fracción: AcOEtFDC20-19 ácido ent-kaurenoico (**1**), este es el primer reporte de este compuesto para *B.oblongifolia*, sin embargo este mismo compuesto ya se ha reportado en la especie *Croton gossypifolius*, perteneciente a la familia Crotonoideae y *Mitrephora celebica* perteneciente a la familia Asteraceae. Fracción AcOEtFDC20- 38 ácido palmítico (**2**), este también es el primer reporte de este compuesto para *B oblongifolia*, sin embargo este mismo compuesto ya se ha reportado en la especie *Grias neuberthii*, perteneciente a la familia Lecythidaceae y *Annona muricata*, perteneciente a la familia Annonaceae, también se aisló una mezcla de seis compuestos: Fracción AcOEtFDC20-22 que no se logró identificar.

Del extracto metanólico de *Baccharis oblongifolia* se obtuvo la Fracción MEOHF29 un producto que por problemas de solubilidad está en proceso de identificación y la Fracción MEOHF30 la fue una mezcla de ocho compuestos de los cuales 3 probablemente podrían ser: 2-trideciloxirano (**3**) (t_R = 22,46 min) cuyo peso molecular es de 226 g/mol, Tetradecanal (**4**) t_R = (23,30 min) cuyo peso molecular es 212 g/mol, octadecanal (**5**) t_R = (24,11 min) cuyo peso molecular es de 268 g/mol.

RECOMENDACIONES

Continuar con el aislamiento de metabolitos secundarios del género *Baccharis* con el fin de determinar cuáles son los componentes responsables de las propiedades biológicas de las especies.

Realizar pruebas biológicas a los compuestos obtenidos para determinar sus propiedades.

Usar técnicas más selectivas como HPLC preparativo o cromatografía flash, con el fin de obtener una separación más eficiente de los componentes de las mezclas.

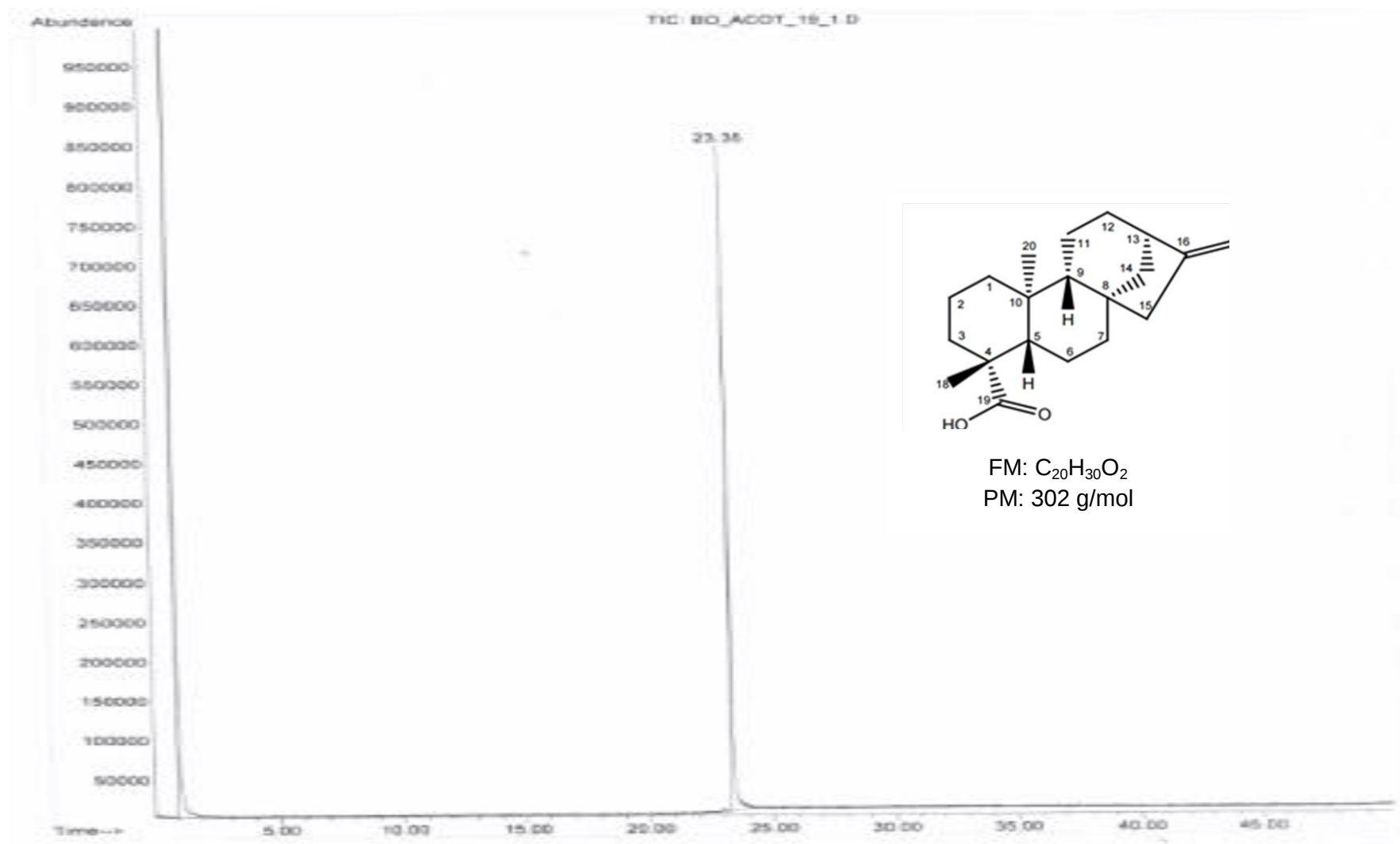
BIBLIOGRAFÍA

1. Alva, A., Vásquez, O., Cunibertti, R., Del Castillo, A., y Guerra, W. (2002). Extracción y caracterización de ácidos grasos de la Especie *Grias neuberthii* Macht (Sachamango). *Alimentaria*, 2(1), 103-106.
2. Avalos García, A., y Pérez-Urria Carril, E. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3).
3. Avello, M., y Cisternas, I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista médica de Chile*, 138(10), 1288-1293.
4. Benavides Calvache, O. L. (2004). *Estudio químico de la fracción insaponificable del hongo macromiceto Lentinula edodes (Shiitake)* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales).
5. Brown, T. L., Brown, T. E., LeMay Jr., H. E., Escalona y García H. J., Bursten, B. E., Burdge J. R., Escalona y García, R. (2004). Química: La ciencia central. México. Ed. Pearson Educación.
6. Calle, A., Yupanqui, J., Flores, Y., y Almanza, G. R. (2012). Flavonoides de *Baccharis boliviensis*. *Rev. Bol. Quim*, 29(2), 158-163
7. Castro Méndez, I. (2006). Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 11(2), 0-0.
8. Cuví, M., y Caranqui, J. (2011). Estudio de la diversidad florística a diferente gradiente altitudinal en el bosque montano alto Ilucud, cantón Chambo, Provincia de Chimborazo.
9. García, D. E. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y forrajes*, 27(1), 1-12.
10. Giuliano, D. A. (2001). Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Darwiniana, nueva serie*, 39(1-2), 131-154.
11. Hua, K., y Yao, X. (2002). The cytotoxicity of protodioscin, a furostanol saponin from the rhizomes of *Dioscorea collettii* var *hypoglauca*, against human cancer cells in vitro. *Phytomedicine*. 9(6), 560-65.
12. Jhonson, C., y Pasto, D. (1977). Determinación de estructuras orgánicas. España: Editorial Reverté, s.a
13. Katinas, L. (2004). Botánica Sistemática Ecuatoriana. *Darwiniana*, 42(1-4), 216-216.
14. Katinas, L., Gutiérrez, D. G., Grossi, M. A., y Crisci, J. V. (2007). Panorama de la familia Asteraceae (= Compositae) en la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 42(1-2), 113-129.

15. Lock, O. (2007). Análisis Fitoquímico y Metabolitos Secundarios. *Manual de Fitoterapia*, 41-64
16. López Valencia, J. (2008). Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas para la identificación y cuantificación de metilésteres de ácidos. pp. 1234–1237
17. Mareggiani, G. (2001). Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. *Manejo Integrado de Plagas*, 60, 22-30
18. McMurry, J. (2012). Química orgánica: Editores Cengage Learning
19. Molares, S., González, S., Ladio, A., y Castro, M. A. (2009). Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. et Arn.(Asteraceae: Astereae). *Acta Bot Bras*, 23(2), 578-589.
20. Morón Rodríguez, F. J., y Jardines Méndez, J. B. (1997). La medicina tradicional en las universidades médicas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2(1), 35-41.
21. Neill, D. A. (2012). ¿ Cuántas especies nativas de plantas vasculares hay en Ecuador?. *Revista amazónica: Ciencia y tecnología*, 1(1), 70-83.
22. Nesom, G.L., 2000. Generic Conspectus of the Tribe Astereae (Asteraceae) in North America and Central America, the Antilles and Hawaii. Botanical Research Institute of Texas. Chapel Hill: USA
23. Ocampo, D., Betancur, L., Ortiz, A., y Ocampo, R. (2007). Estudio cromatográfico comparativo de los ácidos grasos presentes en semilla de *Annona cherimolioides* y *Annona muricata* L. *Vector*, 2, 103-112.
24. Ordóñez, A. A. L. (2007). Medicina Alternativa en Comuna Rural “El Manantial”(Argentina). *Lat. Am. J. Pharm*, 26(3), 449-53.
25. Organización mundial de la salud. (2015) Medicina tradicional. Recuperado de: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
26. Organización mundial de la salud. (2015) Medicina tradicional. Recuperado de: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/
27. Paredes, J. R., de López, M. A., Flowers, W. R., Medina, M., Herrera, P., y Peralta, E. L. (2012). Medición de la Biodiversidad Alfa de Insectos en el Bosque “Cruz del Hueso” de Bucay, Guayas-Ecuador.
28. Ravelo, A. G., y Braun, A. E. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el s. XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103(2), 409-420.
29. Rocha, L. (2000). Control de calidad de productos fitoterapéuticos. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*, 78, 157

30. S.S. Grecco, J.Q. Reimão, A.G. Tempone, P. Sartorelli, P. Romoff, M.J.P. Ferreira, O.A. Fávero, J.H.G. Lago Isolation of an antileishmanial and antitrypanosomal flavanone from the leaves of *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). *Parasitol. Res.*, 106 (2010), pp. 1245–1248 (b)
31. S.S. Grecco, L. Gimenes, M.J.P. Ferreira, P. Romoff, O.A. Favero, C.A. Zalewski, J.H.G. Lago Triterpenoids and phenolic derivatives from *Baccharis uncinella* C.DC. (Asteraceae) *Biochem. Syst. Ecol.*, 38 (2010), pp. 1234–1237 (a)
32. Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos (Vol. 78): Convenio Andres Bello
33. [Shriver](#), D; [Atkins](#) P; [Langford](#) C. (2004). Química Orgánica. Vol 2. Editorial Reverte, S.A. Murcia-España.
34. Sierra, R., Campos, F., y Chamberlin, J. (2002). Assessing biodiversity conservation priorities: ecosystem risk and representativeness in continental Ecuador. *Landscape and Urban Planning*, 59(2), 95-110.
35. Soler Cardoso, B. A., y Porto Verdecia, M. (1997). Experiencia cubana en el estudio y aplicación de medicamentos herbarios. *Revista cubana de plantas medicinales*, 2(1), 30-34.
36. Suárez, A. I., Chavez, K., Blanco, Z., Compagnone, R. S., Tillett, S., y Torrico, F. (2013). Estudio fitoquímico de la corteza de *Croton gossypifolius* colectada en Venezuela. *Revista latinoamericana de química*, 41(3), 161-170.
37. Suley, P. R., Prieto-González, S., Pérez-Rodríguez, M. E., y MOLINA-TORRES, J. (2004). Género *Erythrina*: Fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica. *Acta Farm. Bonaerense*, 23(2), 252-8.
38. Tesso, H. (2005). Isolation and Structure Elucidation of Natural Products from Plants. Hamburg: Institute of Organic Chemistry University of Hamburg. 126-131
39. UNEP WCMC. (2003). UNEP World Conservation Monitoring Centre. Checkl. CITES Sp. 1-339. Cambridge.
40. Valdés, R. y Balbín, María Irene. 2000. Curso de fisiología y bioquímica vegetal. UNAH. La Habana, Cuba. 89 p.

ANEXOS

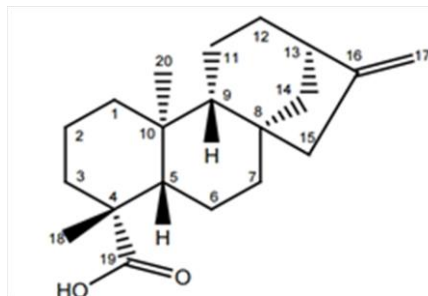


Anexo 1: Cromatograma de CG de la fracción AcOEtFDC20_19 de *Baccharis oblongifolia*. Se observa tR= 23,35 min.

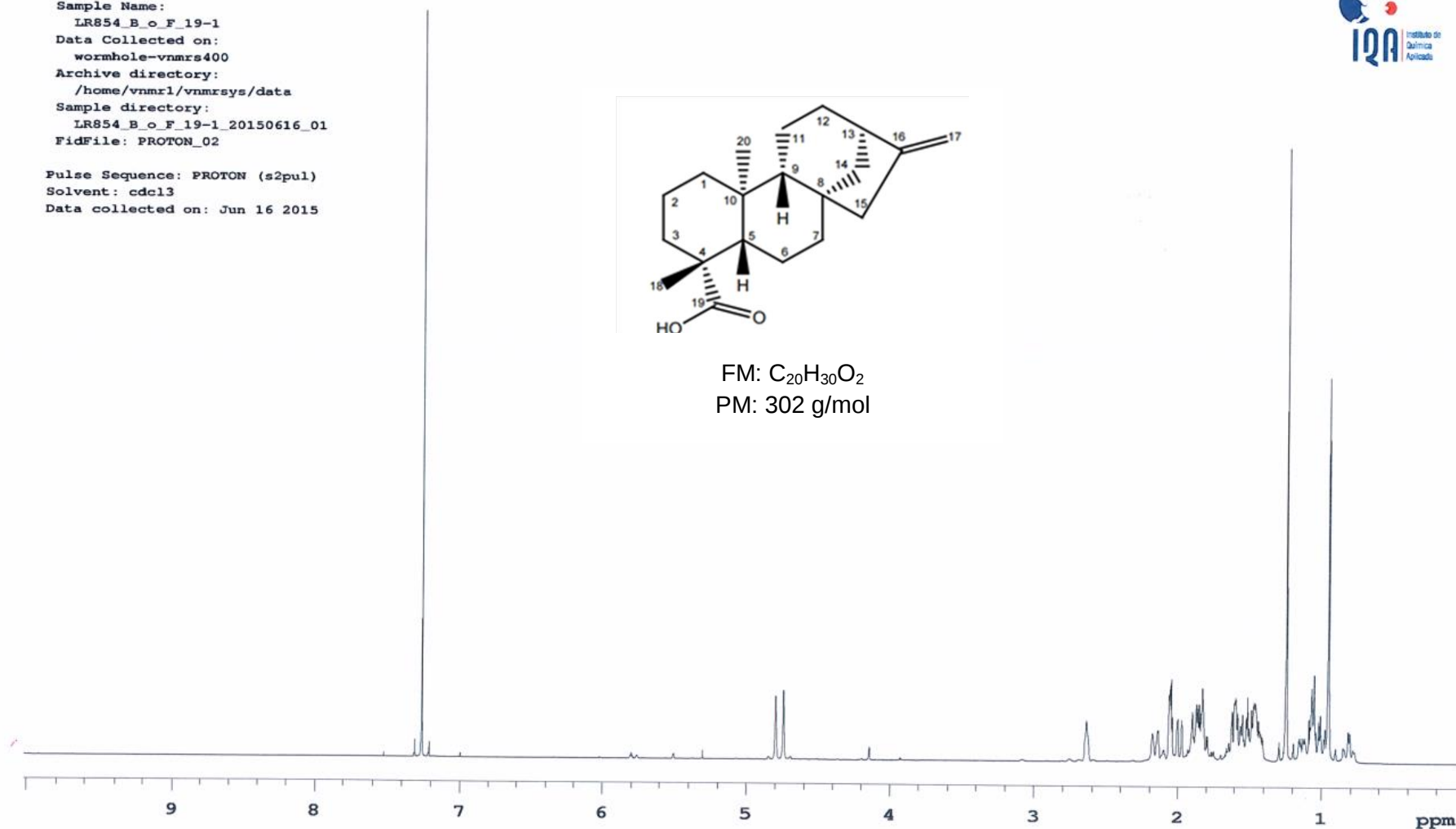
STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
LR854_B_o_F_19-1
Data Collected on:
wormhole-vnmrs400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
LR854_B_o_F_19-1_20150616_01
FidFile: PROTON_02

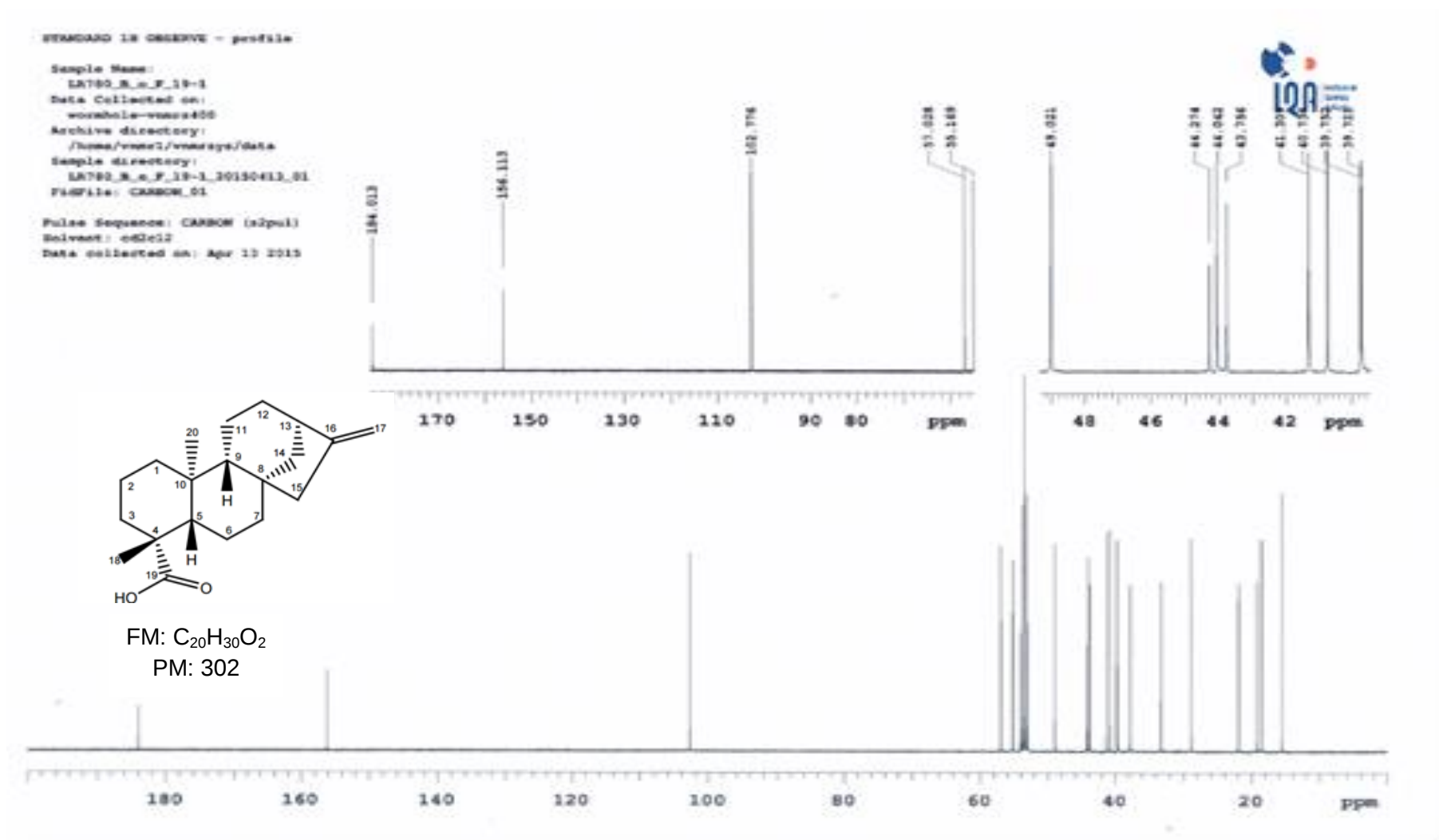
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Jun 16 2015



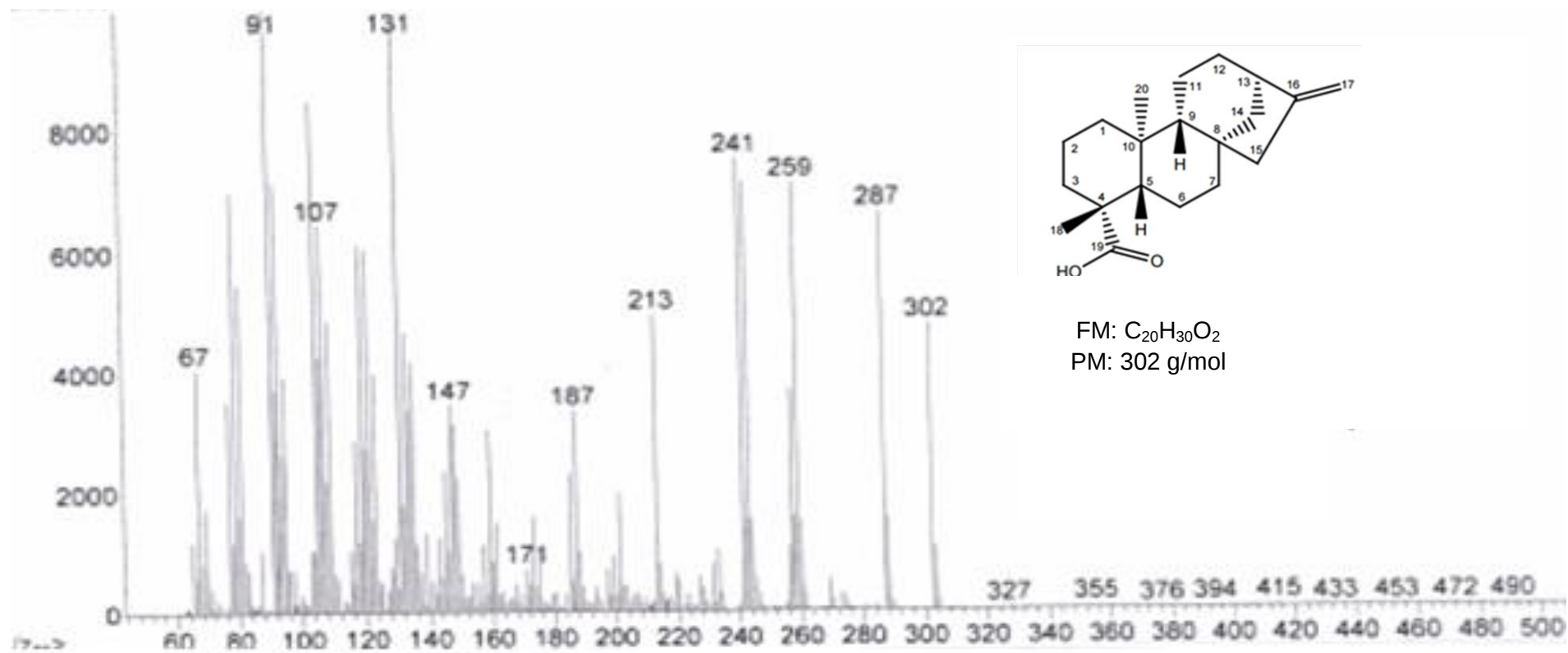
FM: C₂₀H₃₀O₂
PM: 302 g/mol



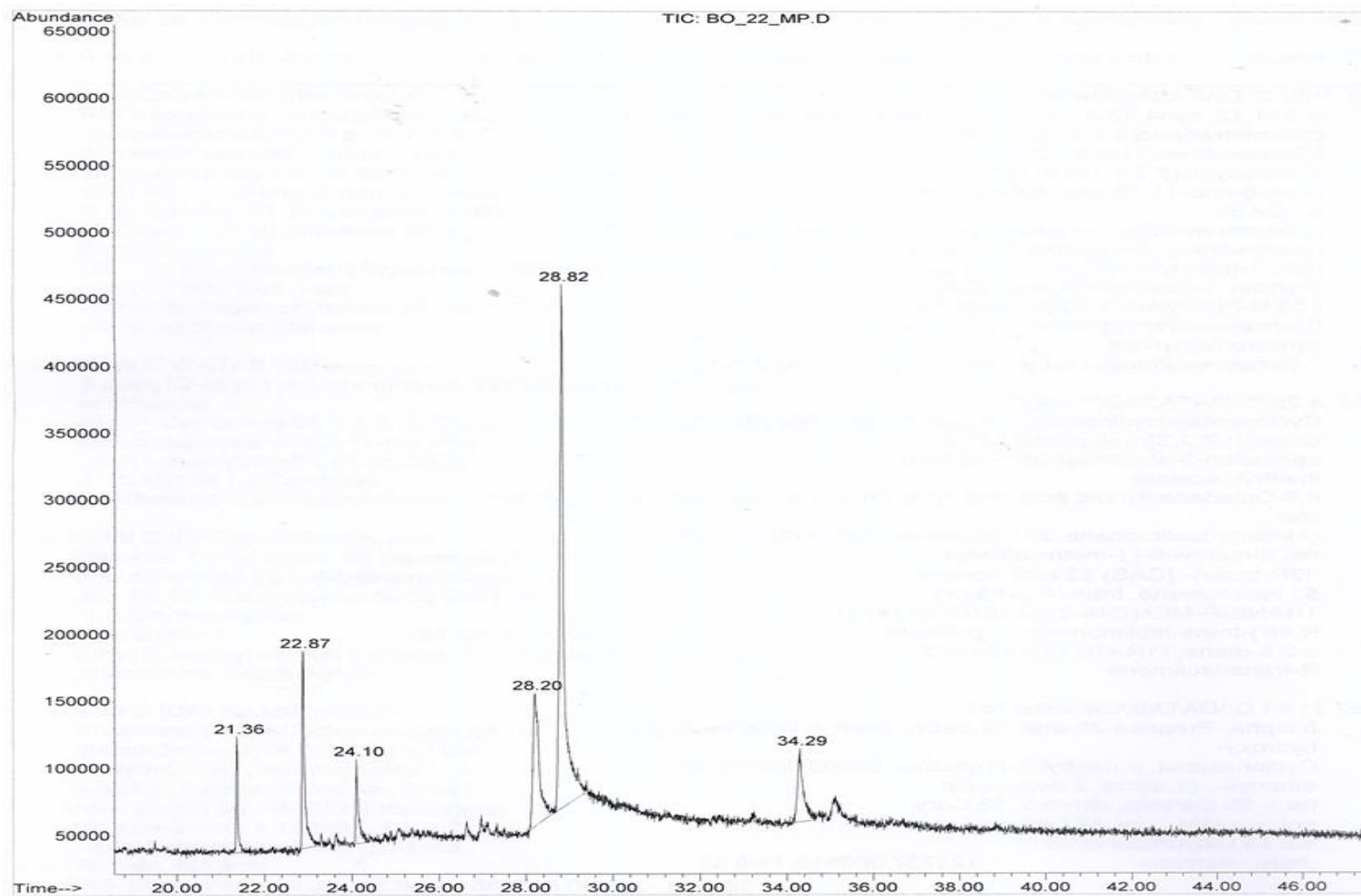
Anexo 2: Espectro de RMN ¹H de la fracción AcOEtFDC20_19 de *Baccharis oblongifolia*.



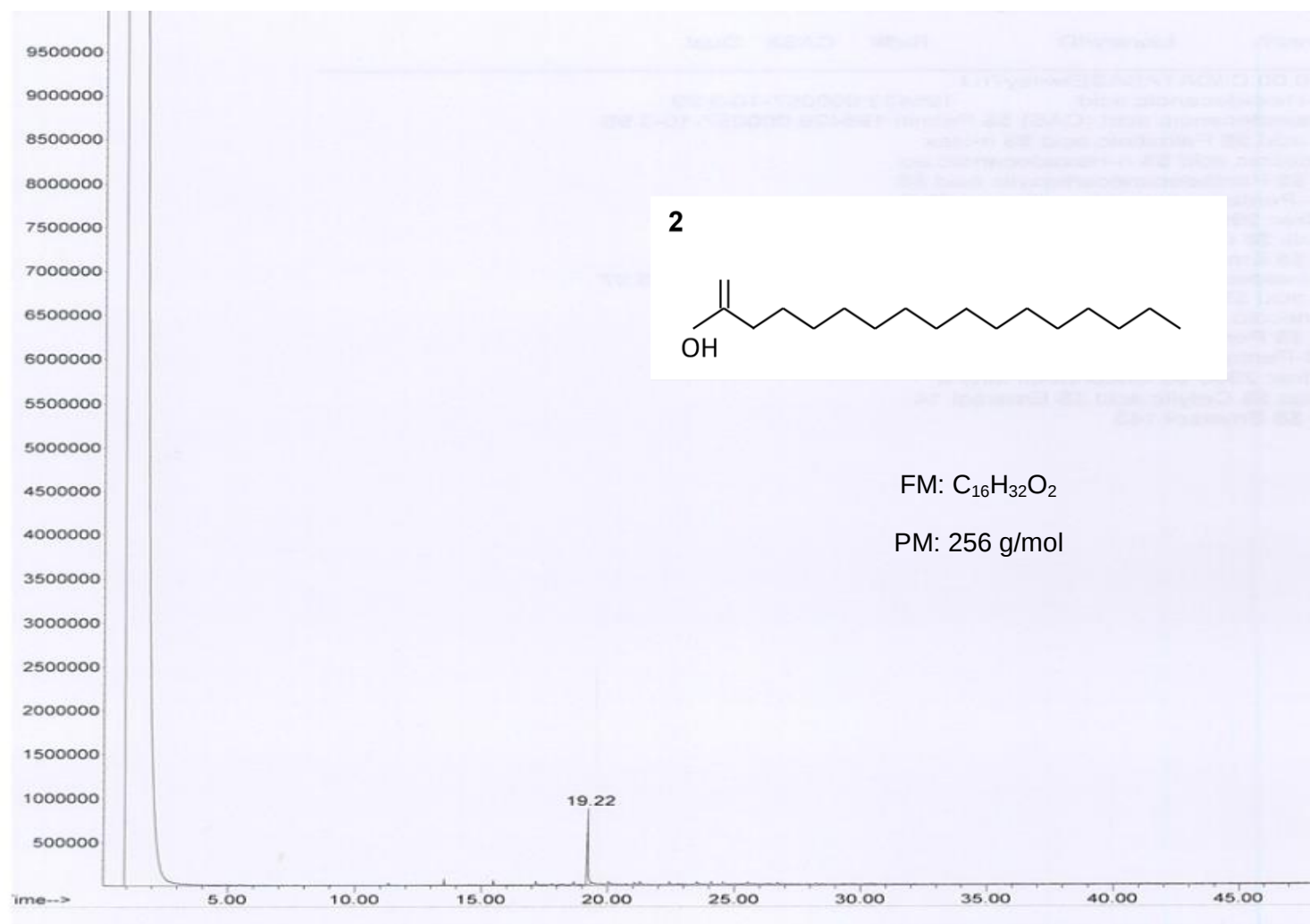
Anexo 3: Espectro de RMN ¹³C de la fracción AcOEtFDC20_19 de *Baccharis oblongifolia*.



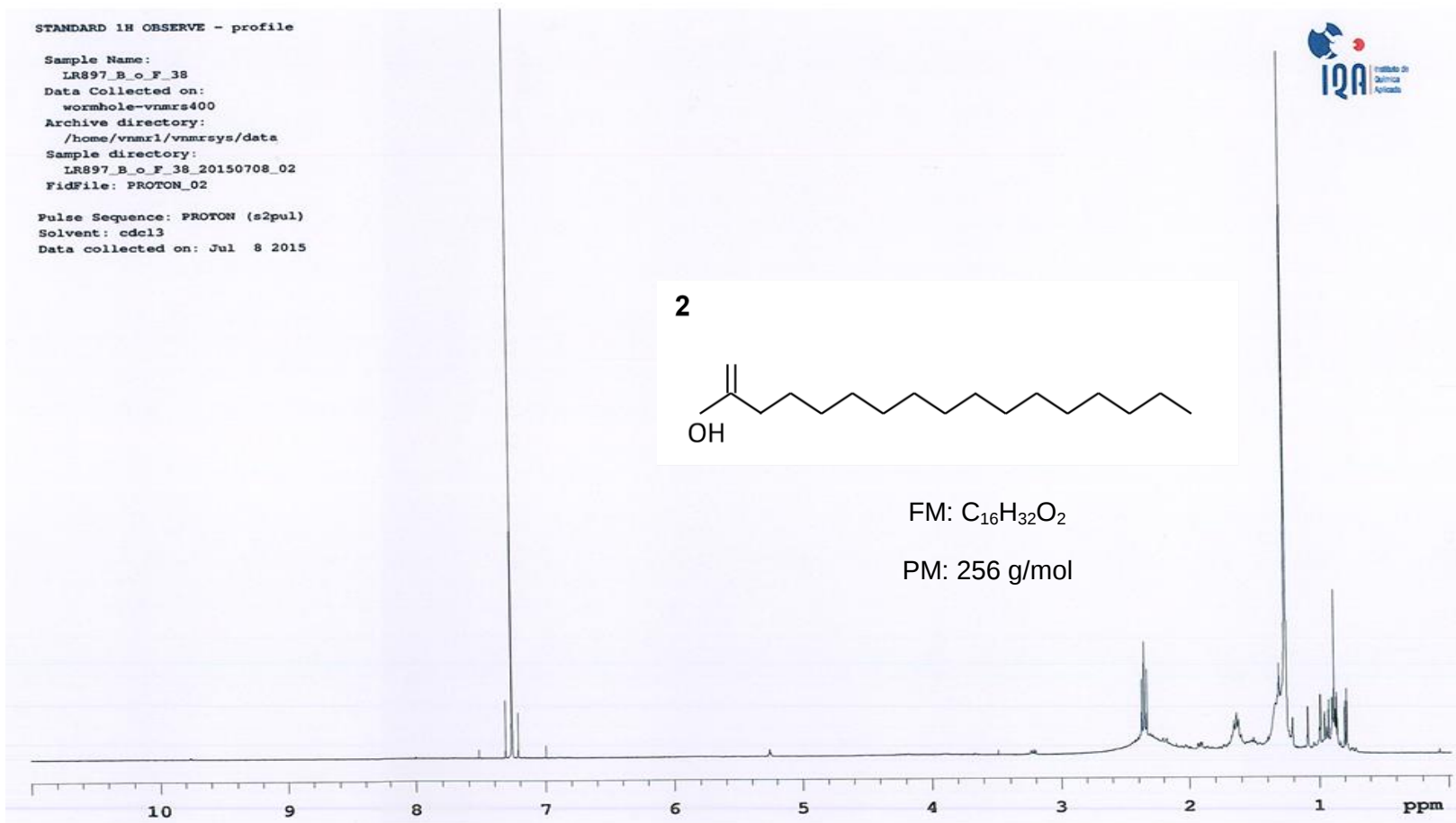
Anexo 4: Espectro de masas la fracción AcOEtFDC20_19 de *Baccharis oblongifolia*.



Anexo 5: Cromatograma de CG de la fracción AcOEtFDC20_22 (mezcla 1) de *Baccharis oblongifolia*.



Anexo 6: Cromatograma de CG de la fracción AcOEtFDC20_38 de *Baccharis oblongifolia*. Se observa tR= 19,22 min.

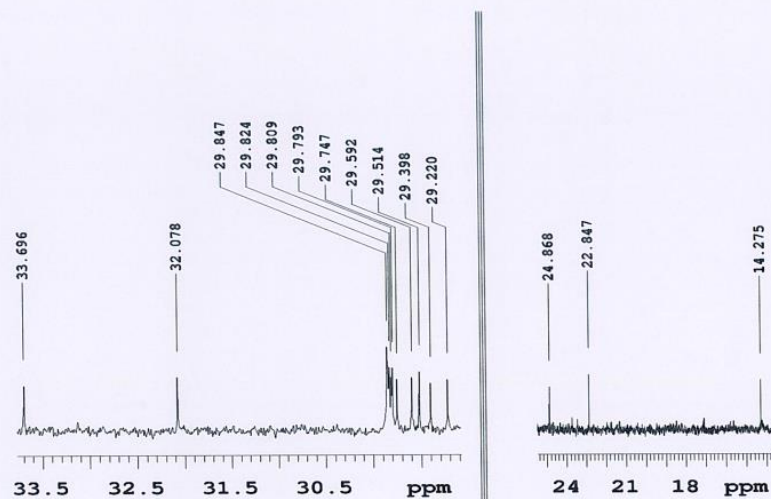


Anexo 7: Espectro de RMN ¹H de la fracción AcOEtFDC20_38 de *Baccharis oblongifolia*.

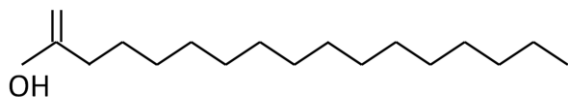
STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
LR906_B_o_F_38
Data Collected on:
wormhole-vnmrs400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
LR906_B_o_F_38_20150713_01
FidFile: CARBON_01

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Jul 13 2015



2

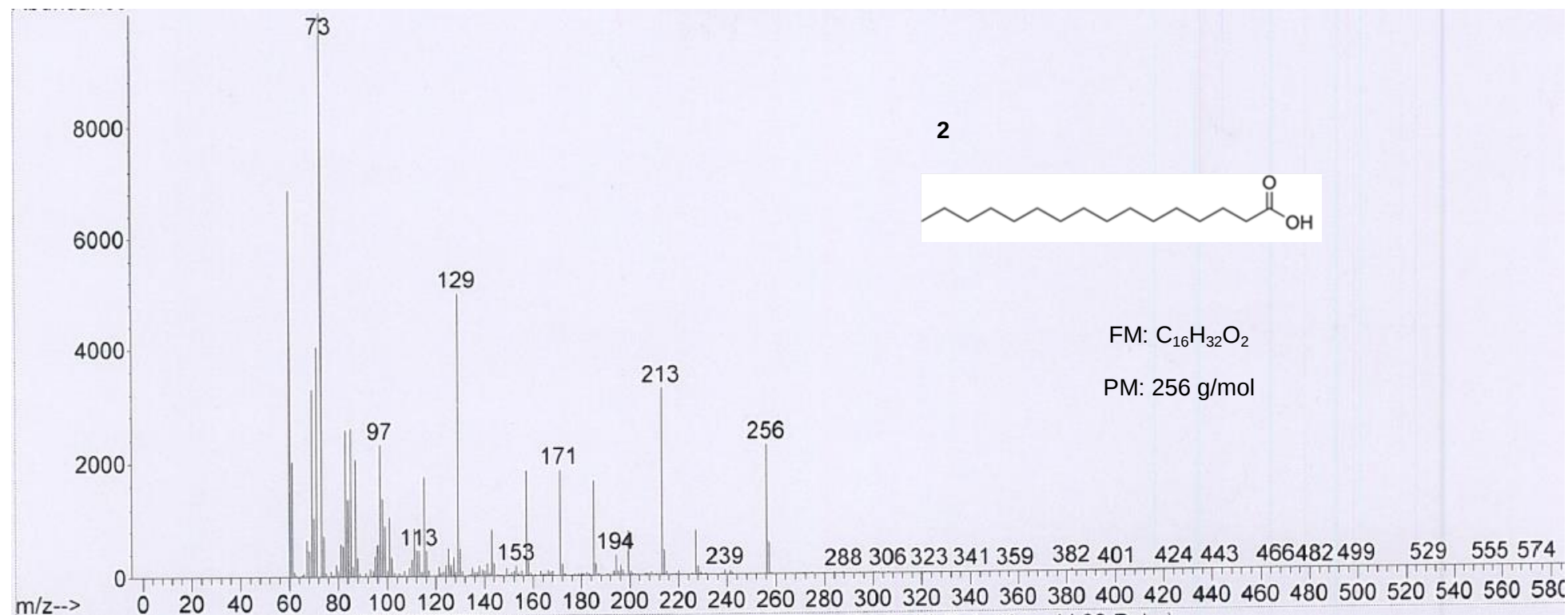


FM: C₁₆H₃₂O₂

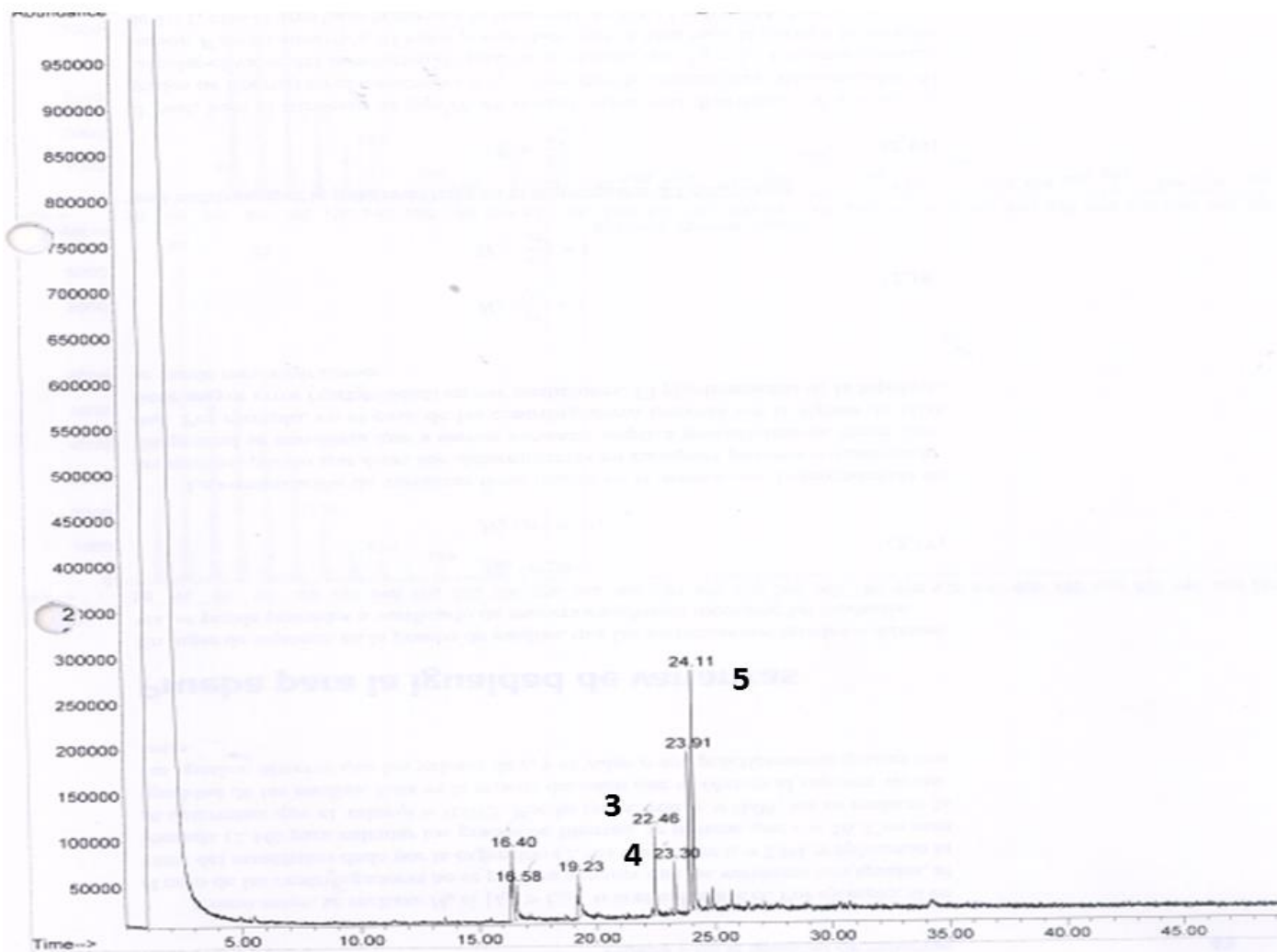
PM: 256 g/mol



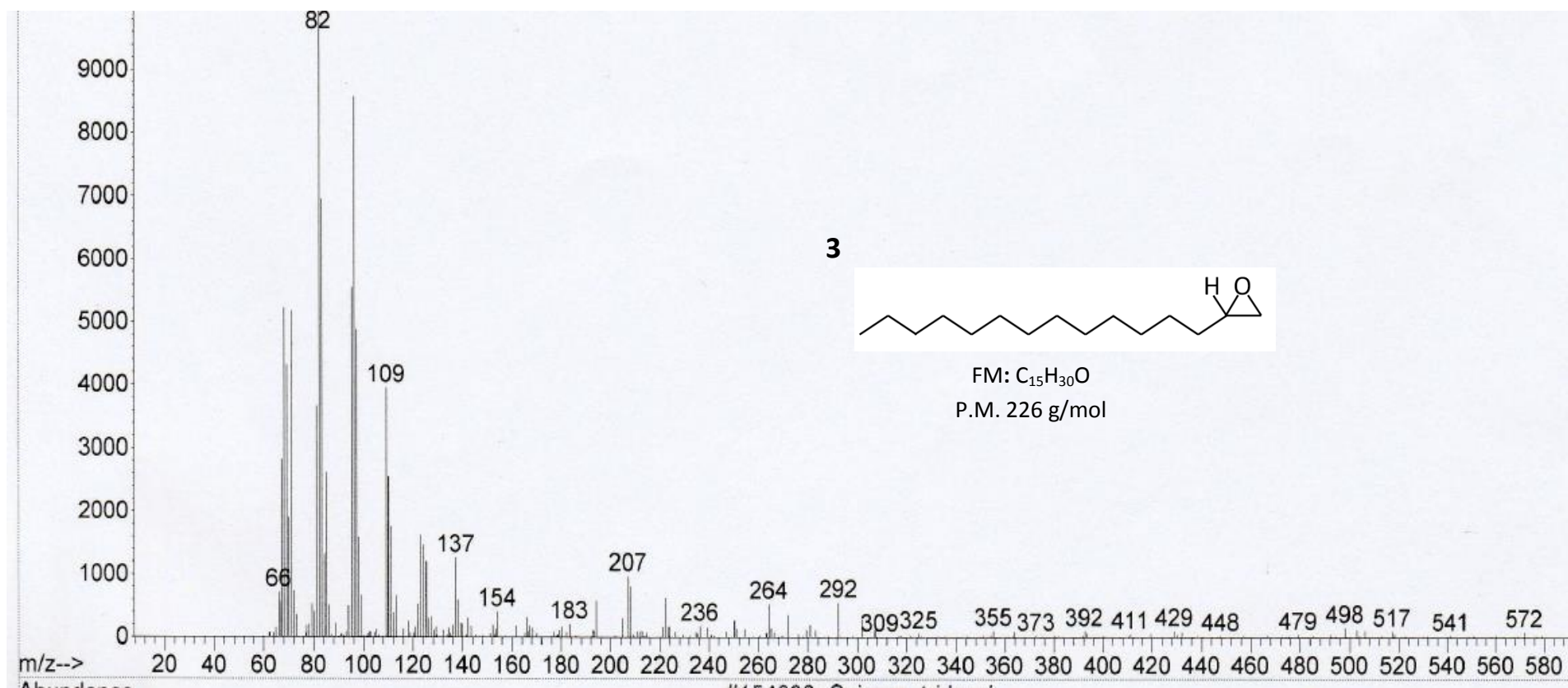
Anexo 8: Espectro de RMN ¹³C de la fracción AcOEtFDC20_38 de *Baccharis oblongifolia*.



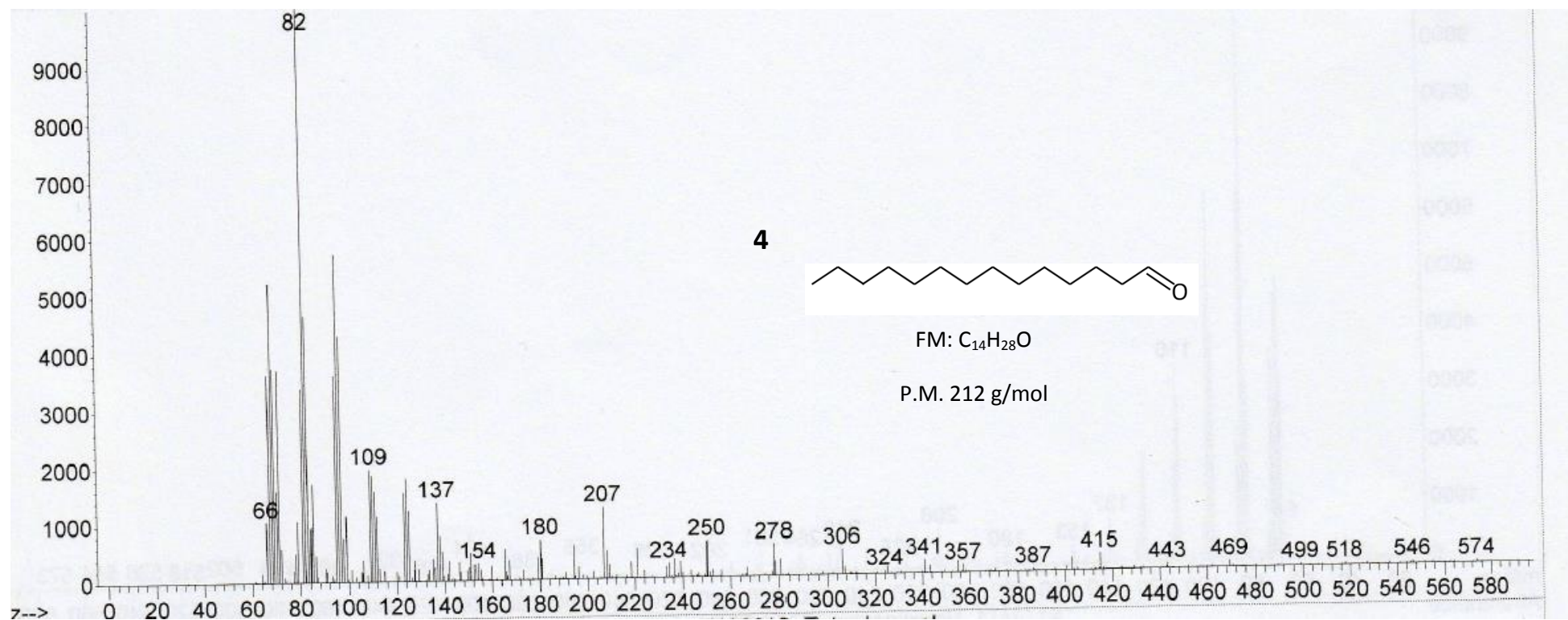
Anexo 9: Espectro de masas de la fracción AcOEtFDC20_38 de *Baccharis oblongifolia*.



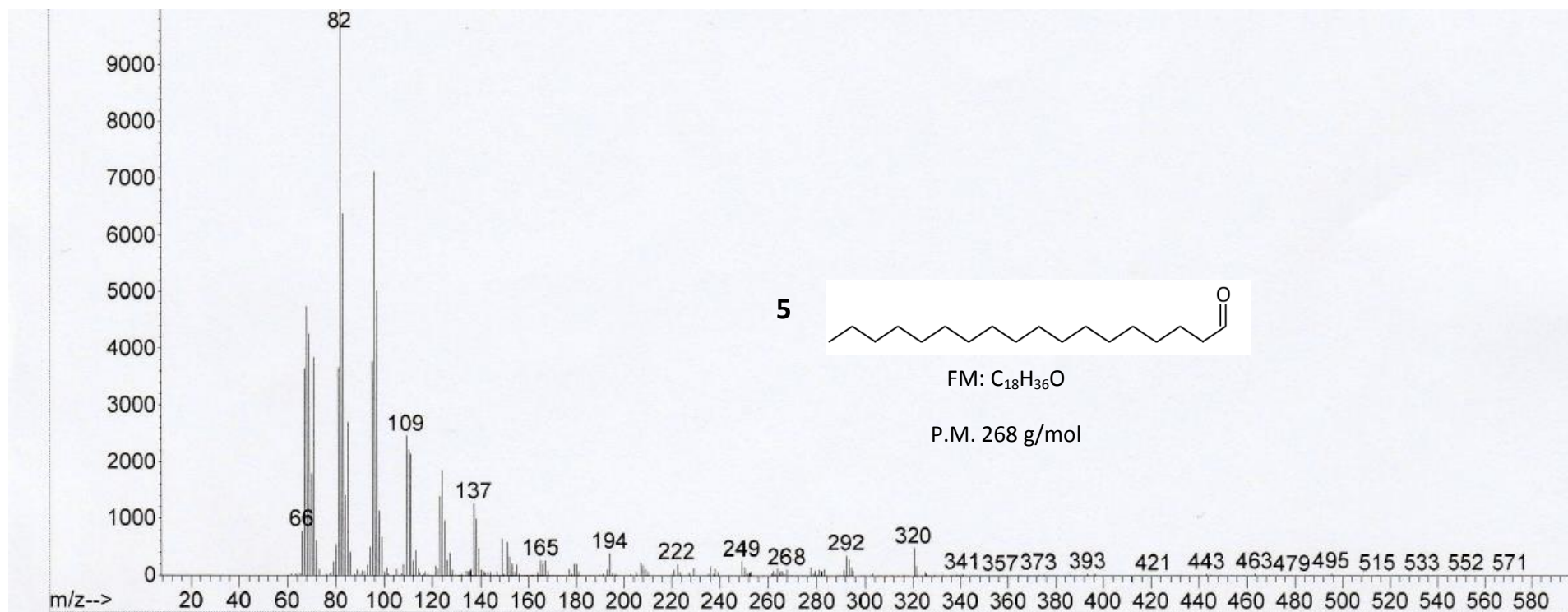
Anexo 10: Cromatograma de CG de la fracción MeOHF30 (mezcla 2) de *Baccharis oblongifolia*.



Anexo 11: Espectro de masas correspondiente a **3** de la fracción MEOHF30 de *Baccharis oblongifolia*..



Anexo 12: Espectro de masas correspondiente a **4** de la fracción MEOHF30 de *Baccharis oblongifolia*..



Anexo 13: Espectro de masas correspondiente a **5** de la fracción MEOHF30 de *Baccharis oblongifolia*.