



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Caracterización de metabolitos secundarios aislados de *Baccharis obtusifolia* Kunth.

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Gina Cecilia, Ortega Torres.

DIRECTOR: Juan Carlos, Romero Benavides, Ing.

LOJA – ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN

Ingeniero

Juan Carlos Romero

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: “Caracterización de Metabolitos secundarios aislados de *Baccharis obtusifolia* (Kunth)”, realizado por Gina Cecilia Ortega Torres, ha sido orientado y revisado durante su elaboración, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Septiembre de 2013

Ing. Juan Carlos Romero

CI: 1103018477

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Gina Cecilia Ortega Torres declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: Caracterización de metabolitos secundarios aislados de *Baccharis obtusifolia* Kunth, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Juan Carlos Romero Benavides director 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. 67 del Estatuto Orgánico de La Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte de 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”.

Loja, Agosto de 2013

Gina Cecilia Ortega Torres

C.I 1105037137

DEDICATORIA

El presente proyecto de tesis va dedicado en primera instancia al único director de mi vida, Dios. A mi familia que son el pilar fundamental de mi día a día y el pedacito de cielo que Dios me ha regalado, mis padres Patricio y Cecilia que han puesto siempre toda su confianza en mí y que se han convertido en una motivación para ser una persona de bien, a mis hermanos Diego, Bruno, Coralía y a mis amigos de siempre Paola, Xamara, Daniela, Andrés que hicieron de mi vida universitaria una linda experiencia que llevaré en mis recuerdos.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por tantas bendiciones, por la vida que tengo y por permitirme cumplir con todas mis metas. Además expreso un gran agradecimiento al director del presente trabajo de tesis, Ing. Juan Carlos Romero quien además de su calidad de persona es un docente excelente con gran capacidad de enseñanza, por su paciencia y disponibilidad para apoyarme en la realización del presente trabajo. A la Ing. Paola Ordoñez con quien inicié mi proyecto de tesis y me incentivó con sus conocimientos.

A mi compañero Bq. Javier Villacís, quien con gran atención colaboró en el presente trabajo. A todos los docentes que forman parte del área de productos naturales quienes me han apoyado durante la realización de este proyecto y a mis compañeros de laboratorio.

Nuevamente a mi familia por ser las personas con quien comparto felizmente mi vida, les agradezco por preocuparse por mi bienestar y alegrarse por los logros que voy cumpliendo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁG
CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	1
ABSTRACT AND KEYWORDS	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I	
FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO	
1.1. Fin del Proyecto	5
1.2. Propósito del Proyecto	5
1.3. Componentes del Proyecto	5
CAPÍTULO II	
2.1. Generalidades	7
2.2. Química de los Productos Naturales	7
2.3. Métodos de aislamiento y purificación	8
2.3.1. Extracción por disolvente	8
2.3.2. Cristalización	8
2.4. Métodos de Estructura y Elucidación	8
2.4.1. Métodos Cromatográficos	8
2.4.1.1. <i>Cromatografía en capa fina (TLC)</i>	9

2.4.1.2. Cromatografía en columna (CC)	9
2.4.2. Punto de Fusión	9
2.4.3. Espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS)	10
2.4.4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	10
2.4.5. Cromatografía de Gases acoplado a Espectroscopia de Masas (GC/MS)	10
2.5. Enfoques sintéticos	11
2.6. Metabolitos secundarios en el tratamiento del cáncer	11
2.6.1. Mecanismos de acción de metabolitos secundarios en la terapia del cáncer	12
2.7. Familia Asteraceae	13
2.7.1. Características y Distribución	13
2.8. Género <i>Baccharis</i>	14
2.8.1 Fitoquímica del género <i>Baccharis</i>	14
2.8.1.1. <i>Flavonoides</i>	14
2.8.1.2. <i>Diterpenoides</i>	15
2.8.1.3. <i>Triterpenoides</i>	16
2.8.1.4. <i>Cumarinas</i>	17
2.9. <i>Baccharis obtusifolia</i> Kunth.	17
2.9.1. Antecedentes	17
2.9.2. Características	18
2.9.3. Taxonomía	19
2.9.4. Descripción	19

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material Vegetal	21
3.1.1. Área de Recolección	21
3.2. Extracción	22
3.2.1. Extracción de clorofilas	23
3.3. Fraccionamiento en columna de la Fracción 1	23
3.3.1. Análisis de las fracciones obtenidas	23

3.3.2. Purificación	24
3.4. Procedimientos de caracterización	24
3.4.1. Punto de fusión	24
3.4.2. Factor de Retención	25
3.4.3. Identificación de los compuestos aislados	25
3.4.3.1. <i>Espectro de Gases acoplado a Masas</i>	25
3.4.3.2. <i>Espectro de Resonancia Magnética Nuclear</i>	26
3.5. Pruebas de Inhibición del crecimiento celular	27

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1. Extracto	29
4.1.1. Peso y Rendimiento	29
4.2. Fraccionamiento del extracto metanólico.	29
4.3. Metabolitos aislados de <i>Baccharis obtusifolia</i>	31
4.3.1. Análisis del espectro de masas compuesto 1 y 2	32
4.3.2. Análisis de espectro RMN compuestos 1 y 2	33
4.3.2.1. <i>Espectro RMN ¹H</i>	33
4.3.2.2. <i>Espectro RMN ¹³C</i>	34
4.3.3. Características generales de los compuestos aislados	35
4.3.4. Fracción 94-98	37
4.3.5. Fracción 82-83	37
4.3.6. Fracción 135-138	37
4.4. Efecto de los compuestos en dos líneas celulares	37

CONCLUSIONES	40
---------------------	----

RECOMENDACIONES	41
------------------------	----

BIBLIOGRAFÍA	42
---------------------	----

ANEXOS	46
---------------	----

LISTADO DE TABLAS

TABLA	PÁG.
1. Taxonomía de <i>Baccharis obtusifolia</i> .	19
2. Condiciones de operación del equipo GC/MS.	26
3. Peso y Rendimiento del extracto de <i>Baccharis obtusifolia</i> .	29
4. Fraccionamiento de la fracción 1 de <i>Baccharis obtusifolia</i> .	30
5. Iones en el espectro de masas de los compuestos 1 y 2 .	32
6. Datos espectrales de RMN ¹ H (CDCl ₃) de los compuestos 1 y 2 .	33
7. Datos espectrales de RMN ¹³ C (CDCl ₃) de los compuestos 1 y 2 .	35
8. Características generales de los compuestos aislados de <i>Baccharis obtusifolia</i> .	36

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA	PÁG.
1. Estructura química de quercetina, resveratrol y curcumina	12
2. Estructura química de luteonina, naringenina, hispidulina y eriodictiol	15
3. Estructura química de gaudichanolido A, B Y C y bacchariol	16
4. Estructura química del ácido oleanólico e ursólico	17
5. Estructura química de escopolin	17
6. Esquema del proceso de experimentación.	21
7. Mapa del lugar de recolección de la especie <i>B. obtusifolia</i> .	22
8. Medida del <i>R_f</i> en la placa TLC	25
9. Estructura química de Sakuranetin (1)	31
10. Estructura química de 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona (2)	31
11. Rompimientos retro-Diels-Alder	32
12. Porcentaje de inhibición de crecimiento en las líneas celulares RKO y D384 de los compuestos 1 y 2	38

ABREVIATURAS

AcOEt: Acetato de etilo

CC: *Column Chromatography*. Cromatografía en Columna

CDCl₃: Cloroformo deuterado

DMSO: Dimetilsulfóxido

D384: Línea celular humana de astrocitoma cerebral

EM: Espectrometría de masas

GC: Cromatografía de Gases.

GC/MS: Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry/Cromatografía de Gases acoplado a Espectroscopia de Masas

Hex: Hexano

MeOH: Metanol

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

R_f: Factor de Retención

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RMN ¹H: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de protón

RMN ¹³C: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de carbón

RKO: Línea celular humana de cáncer de colon

TLC: *Thin Layer Chromatography*. Cromatografía en capa fina

t_R: Tiempo de retención

UV: Espectroscopía ultravioleta-visible

RESUMEN

La especie *Baccharis obtusifolia* fue recolectada en el sector Villonaco, provincia de Loja-Ecuador. Se obtuvo el extracto metanólico de las partes aéreas de la planta y se sometió a extracción de clorofilas. A partir del fraccionamiento del extracto sin clorofilas se aislaron dos compuestos de tipo flavonoide denominados como 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona (**1**) y 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona (**2**). Las estructuras fueron determinadas por resonancia magnética nuclear (RMN), experimentos RMN ¹H, RMN ¹³C y espectroscopia de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). La comparación en literatura confirmó la estructura de tipo flavonoide de los compuestos obtenidos que se diferencian por el sustituyente en la posición 4' del anillo B de flavonas. Es importante destacar que estos compuestos se reportan por primera vez para esta especie. Además se evaluó la inhibición del crecimiento celular de los compuestos obtenidos en dos líneas de cáncer humano: RKO y D384. La flavona **1** presentó baja actividad en las dos líneas celulares (14% y 6%) mientras que la flavona **2** tuvo actividad moderada la línea celular D384 (41.3%).

PALABRAS CLAVE: *Baccharis obtusifolia*, 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona, 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona, D384.

ABSTRACT

Baccharis obtusifolia specie was collected in Villonaco sector, province of Loja- Ecuador. Was obtained methanol extract of the aerial parts of the plant and extracted chlorophyll. From extract without chlorophylls were isolated two flavonoid type compounds known as 5, 4'-dihydroxy-7-methoxyflavone (**1**) and 5-hydroxy-7, 4'-dimethoxyflavone (**2**). The structures were elucidated by nuclear magnetic resonance (NMR) experiments NMR ¹H, NMR ¹³C spectroscopy and gas coupled to mass spectrometry (GC/MS). The comparison in literature confirm the structure of flavonoid type of compounds obtained and they can be differentiated by the substituent at 4' position of the B ring of flavones. It's important to highlight, these compounds are reported for the first time for this specie. Also was evaluated the inhibition of cell growth of the compounds obtained in two human cancer cell lines: RKO and D384. The flavone **1** showed low activity in the two cell lines (14% and 6%) while the flavone **2** had moderate activity flavone cell line D384 (41.3%).

KEYWORDS: *Baccharis obtusifolia*, 5, 4'-dihydroxy-7-methoxyflavone, 5-hydroxy-7, 4'-dimethoxyflavone, D384.

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales son en la actualidad causa de investigación especialmente por las industrias farmacéuticas. El Ecuador es un país privilegiado en cuanto a la riqueza y la biodiversidad de su flora, contando así con un amplio conocimiento en medicina tradicional. Este conocimiento ancestral abre muchos campos en la investigación de los principios activos que nuestras especies poseen y constituyen bases importantes en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de las enfermedades.

La investigación en el ámbito de los productos naturales consiste en métodos de extracción de las drogas vegetales, purificación y la estandarización de las mismas (Sharapin, 2000). La caracterización química constituye la base del conocimiento de las especies estudiadas en nuestra Provincia (Loja-Ecuador), de manera que se pueden establecer patrones fitoquímicos conforme avanza el análisis de cada uno de los géneros vegetales.

Baccharis obtusifolia Kunth, especie de nuestro estudio pertenece a la familia Asteraceae, su nombre vulgar es Chilca redonda, también se la conoce como Shadán (Ansaloni, 2010) y su sinónimo *Baccharis luxensis* Kunth. La composición fitoquímica que se ha reportado para esta especie, incluye flavonoides, triterpenoides y clerodanos (Verdi L et al, 2005). Los flavonoides se han asignado como importantes marcadores químicos de la familia Asteraceae y están siendo estudiados en aplicaciones médicas debido a sus propiedades antioxidantes y actividad anti-VIH (Gonzaga et al, 2005)

La mayoría de reportes fitoquímicos del género *Baccharis* hacen mención a varias especies entre las que más se destacan se encuentran, *B. latifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. articulata*. Metabolitos secundarios de la especie *Baccharis obtusifolia* no se han descrito en detalle. El conocimiento de la química de esta especie es de gran importancia en el conocimiento de las especies vegetales de nuestro país considerando que esta especie es utilizada en la medicina tradicional (antiinflamatorio, reumatismo, dolor de estómago, antimicótico) y que se encuentra ampliamente distribuida en nuestra provincia (Ansaloni et al 2010, Tene et al, 2007).

CAPÍTULO I

FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1 FIN DEL PROYECTO

Aportar al conocimiento de la química de las especies vegetales de Ecuador y especialmente del género *Baccharis*. La investigación de este género abrirá nuevos campos de investigación en virtud de las aplicaciones que se pueden dar en el ámbito de la biotecnología para el desarrollo de nuevas herramientas en la industria y el tratamiento de enfermedades.

1.2 PROPÓSITO DEL PROYECTO

Contribuir a la investigación fitoquímica de la especie *Baccharis obtusifolia* mediante la obtención y caracterización de los metabolitos secundarios contenidos en esta especie y su posterior evaluación de la actividad inhibitoria en líneas celulares de cáncer humano.

1.3 COMPONENTES DEL PROYECTO

- Obtención del extracto total utilizando metanol como disolvente.
- Aislamiento, purificación y caracterización química de los metabolitos secundarios contenidos en la especie *Baccharis obtusifolia*.
- Determinación de la actividad inhibitoria de los compuestos obtenidos a partir de la especie *Baccharis obtusifolia* en dos líneas celulares de cáncer humano RKO y D384.

CAPITULO II

2.1. Generalidades.

El Ecuador tiene una gran biodiversidad de flora debido a la variedad de ecosistemas presentes. Como lo indica Ansaloni (2010), todas las aplicaciones que se le dan a las plantas son influidas por el gran contraste de especies y la cultura étnica de las comunidades que hacen uso de la medicina tradicional. La etnobotánica del sur del Ecuador principalmente enfoca las propiedades de especies nativas como *Baccharis obtusifolia*, para el tratamiento de numerosas enfermedades en especial afecciones gastrointestinales.

La obtención de compuestos naturales estandarizados además de aportar en la industria de fitofármacos puede identificar a un género vegetal como patrones químicos específicos. El establecimiento de la naturaleza química de una especie enriquece la conservación y correcto aprovechamiento de sus propiedades farmacológicas.

Según la ONU (Organización de Naciones Unidas) nuestro país pese a su pequeña extensión cuenta con 25.000 especies de plantas vasculares de las cuales tan solo 2.725 han sido catalogadas y estudiadas (. Esta referencia nos da una idea del amplio campo de estudio que existe en cada región del Ecuador y por lo tanto la diversidad de compuestos naturales que se pueden obtener para el tratamiento de enfermedades, además de la industria alimenticia y cosmética en donde cada vez está alcanzando mayor importancia.

2.2. Química de los Productos Naturales

La química de los productos naturales puede ser dividida en tres diferentes ámbitos (Voelter, 1996):

- Métodos de aislamiento y purificación
- Métodos de estructura y elucidación
- Enfoques sintéticos

2.3. Métodos de aislamiento y purificación

2.3.1.Extracción por disolvente.

La extracción por disolvente se utiliza por lo general para recuperar un componente sólido o un líquido. La muestra se pone en contacto con un disolvente que disuelva los solutos de interés. Algunas técnicas de extracción implican partición entre dos líquidos inmiscibles, otros implican extracciones ya sea de forma continua o por lotes de extracción. Los métodos utilizados para obtener soluciones extractivas son: maceración, digestión, infusión, decocción y percolación o lixiviación. En la extracción de drogas vegetales los materiales de plantas pulverizadas se sumergen en un disolvente orgánico para extraer los metabolitos secundarios que se pretenden elucidar. (Sharapin, 2000).

2.3.2.Cristalización.

La purificación de una sustancia sólida por disolución y posterior cristalización se basa en la eliminación de impurezas insolubles que acompañan a un sólido en una primera filtración. La primera etapa para conseguir la cristalización de una sustancia, a partir de una disolución, es lograr la sobresaturación de dicha disolución. La sobresaturación provoca la aparición del exceso de sólido bajo la forma de cristales, lo que puede conseguirse mediante un descenso de la temperatura debido a la variación que, habitualmente, experimenta la solubilidad con la misma. Generalmente el sólido que se vaya a purificar se disuelve en el disolvente caliente, la mezcla resultante se filtra en caliente para eliminar todas las impurezas insolubles. Enfriar la disolución filtrada hace que se produzca la cristalización y al enfriarse el líquido filtrado se alcanza muy pronto la saturación, con lo que desde ese momento hasta que se alcance la temperatura final se separará el exceso de sólido correspondiente a la diferencia de solubilidad. (Grases et al, 2000).

2.4. Métodos de estructura y elucidación

2.4.1.Métodos Cromatográficos.

La cromatografía es el método de elección en el aislamiento de un compuesto de interés a partir de una mezcla natural compleja. Por lo tanto, se describen brevemente los métodos cromatográficos utilizados durante el presente trabajo.

2.4.1.1. Cromatografía en capa fina (TLC).

La cromatografía en capa fina incluye el uso de partículas adsorbentes propagadas sobre una hoja inerte de vidrio, plástico, o metal como fase estacionaria. La fase móvil avanza en la placa en donde la muestra se colocó inicialmente en el adsorbente justo por encima del disolvente. Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria, la separación puede ser en particiones o cromatografía de adsorción. La ventaja de TLC es que las muestras no tienen que someterse a amplias medidas de limpieza, y la capacidad para detectar una amplia gama de compuestos, utilizando reactivos de pulverización (Tesso, 2005)

2.4.1.2. Cromatografía en Columna (CC).

La CC consiste de una columna de partículas, de materiales tal como sílice o alúmina que pasan a través de un disolvente a presión atmosférica, media o baja. La separación puede ser líquido / sólido (adsorción) o líquido / líquido (partición). Las columnas son generalmente de vidrio o plástico, la mayoría de los sistemas se basan en la gravedad para empujar el disolvente a través de la fase estacionaria. La muestra se disuelve en un disolvente y se aplica en la parte superior de la columna (embalaje húmedo), o, alternativamente, adsorbido en un gel de sílice gruesa (embalaje seco). El disolvente eluye la muestra a través de la columna, permitiendo que los componentes se separen. El disolvente normalmente se cambia por pasos, y las fracciones se recogen de acuerdo con la separación requerida, con los productos de elución normalmente monitorizado por TLC (Guiochon, 2001).

2.4.2. 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).

2.4.3. Espectroscopia ultravioleta (UV).

La espectroscopia ultravioleta (UV) revela información relativa a la presencia de sitios de insaturación en la estructura. Los compuestos orgánicos, especialmente aquellos con un alto grado de conjugación, absorben luz en las regiones del espectro electromagnético visible o ultravioleta. Los disolventes para estas determinaciones son a menudo el agua para los compuestos solubles en agua, o el etanol para compuestos orgánicos solubles. Los disolventes orgánicos pueden tener una significativa absorción de UV, por lo que no todos los disolventes son adecuados para su uso en espectrometría UV. La polaridad y el pH del disolvente pueden afectar la absorción del espectro de un compuesto orgánico. (Tesso, 2005).

2.4.4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Espectroscopia es el estudio de la interacción de la radiación electromagnética (EMR) con la materia. La espectroscopía de RMN es el estudio de la interacción de la frecuencia de radio (RF) de la EMR con espines nucleares no apareados en un campo magnético externo para extraer información estructural sobre una muestra dada. La espectroscopía de RMN se utiliza de forma rutinaria por los químicos para estudiar la estructura química de las moléculas simples usando técnicas tridimensionales simples (1D-RMN). Técnicas de dos dimensiones (2D-RMN) se utilizan para determinar la estructura de las moléculas más complicadas (Pretsch, 1997). La química orgánica se ocupa principalmente del estudio de los compuestos de carbono. Como consecuencia de ello, RMN 1D implica experimentos de protón (^1H) y carbón (^{13}C) respectivamente. (Tesso, 2005).

2.4.5. Espectrometría de Gases acoplado a Espectroscopia de Masas (GC/MS).

En GC/MS una mezcla de compuestos a analizar se inyecta inicialmente en el GC, donde la mezcla se vaporiza en una cámara climatizada (inyector). La mezcla de gas viaja a través de una columna de GC llevado por un gas portador, donde los compuestos se separan a medida que interactúan con la fase estacionaria de la columna. Los compuestos separados inmediatamente a continuación, entran en el espectrómetro de masas que genera el espectro de masas de los compuestos individuales. (Guiochon, 2001).

Las moléculas del analito deben ser primero ionizadas para ser atraídas (o repelidas) por un apropiado campo magnético o eléctrico. Existen numerosas técnicas de ionización, pero el impacto electrónico (IE) es el más antiguo, común y simple. La fuente de ionización es calentada y bajo vacío la mayoría de las muestras son fácilmente vaporizadas e ionizadas (McNair et al, 1997).

2.5. Enfoques sintéticos

La purificación de metabolitos secundarios es limitada debido a lo siguiente:

- a) Baja abundancia en la naturaleza.
- a) Contaminación inevitable de extractos de plantas con contaminantes ambientales.
- b) Variaciones estacionales de la cosecha de la planta.
- c) Pobre estandarización del producto final debido a las condiciones variables de crecimiento de las plantas.
- d) Dificultades de extracción de metabolitos secundarios y la purificación de las partes de las plantas cultivadas.

La síntesis química de las moléculas extremadamente complejas es difícil y poco rentable. Varios enfoques biotecnológicos se han desarrollado y aplicado para producir ya sea sustancias finales deseadas o bien, que sus precursores sean más modificados químicamente (Korkina y Kostyuk, 2012).

2.6. Metabolitos secundarios en el tratamiento del cáncer

Existe un número creciente de reportes en donde los metabolitos secundarios de plantas superiores ejercen numerosos efectos sobre la tumorigénesis, células tumorales in vitro, tumores en animales de experimentación in vivo e interacción con fármacos anti-cáncer. Además de proteger tejidos normales del organismo huésped contra los efectos adversos de las terapias contra el cáncer (Korkina, 2007).

Algunos de ellos han sido ampliamente utilizados en la quimioterapia del cáncer (paclitaxel, vinblastina, vincristina, etopósido, etc) y otros han entrado recientemente en ensayos clínicos (artemisinina, cannabioides, el resveratrol, camptotecina, etc.). Por otra parte, terapias actuales de combinación contra el cáncer incluyen compuestos citotóxicos convencionales asociados con las sustancias derivadas de las plantas diseñados para disminuir la toxicidad y la incidencia de resistencia a fármacos en tumores (Waterhouse et

al, 2006). Estudios clínicos han demostrado que los polifenoles quercetina, el resveratrol y la curcumina (Figura 1) potencian la eficacia anti-cáncer de agentes quimioterapéuticos (Schmidt et al, 2007).

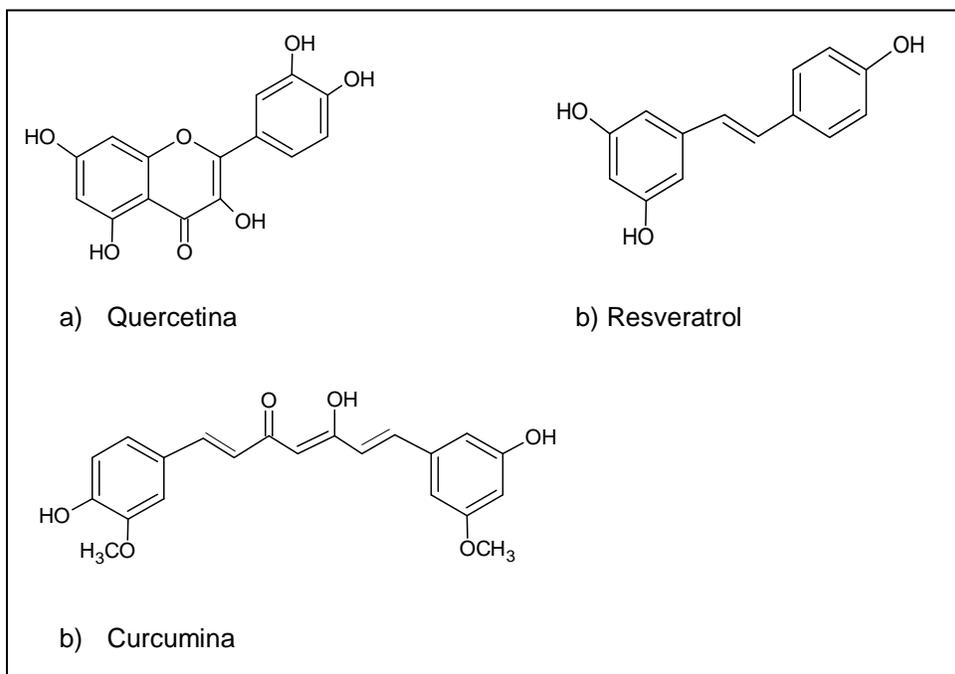


Figura 1. Estructura química de la quercetina, resveratrol y curcumina

Fuente: Autor.

2.6.1. Mecanismos de acción de metabolitos secundarios en la terapia del cáncer.

Estudios in vitro con diferentes metabolitos secundarios vegetales han demostrado que estas moléculas son capaces de modular:

- Proliferación no controlada de células cancerígenas.
- Potencial apoptótico de células transformadas, incrementándolo.
- Potencial pro-angiogénico y metastásico de células tumorales, disminuyéndolo.

Una asociación causal entre inflamación y cáncer se ha sospechado durante mucho tiempo. La inflamación desempeña un papel fundamental en la promoción y la progresión de la carcinogénesis. Entre los metabolitos más conocidos en la terapia del cáncer se

encuentran: las isoflavonas (fenitoína, diazoan, equol), lignanos (lariciresinol, hidroximatairesinol, secoisolariciresinol, sesamina), cumestanos (coumestrol), flavonoides kaempferol y quercetina, estilbenos (resveratrol) (Gehm et al, 1997) silibina, la silimarina (Gazak et al, 2007) y los glucósidos fenilpropanoides (acteosida y martinósida) (Korkina, 2007)

2.7. Familia Asteraceae

2.7.1. Características y Distribución.

La familia Asteraceae es el grupo sistemático más numeroso dentro de las angiospermas, comprende unos 1.100 géneros y 25.000 especies. Las plantas son muy variadas en apariencia, incluyendo principalmente pequeñas hierbas o arbustos, raramente árboles. Se reconocen por su estructura reproductiva, el capítulo donde las flores se disponen en forma sésil sobre un receptáculo ensanchado. Alrededor del 98% de los géneros se componen de pequeñas plantas, y se encuentran en todos los tipos de hábitats, pero principalmente en las regiones montañosas tropicales de América del Sur (Heywood, 1993).

En Ecuador la familia asteraceae se encuentra ampliamente distribuida, especialmente en las zonas altas de la Cordillera de los Andes. Se reportan en nuestro país 217 géneros nativos, 7 géneros endémicos y 1288 especies, de las cuales 918 son especies nativas y 370 son endémicas (Jørgensen & León-Yañez, 1999; Valencia et al., 2000).

Es la familia evolutivamente más exitosa dentro de las plantas con flores. La continua expansión de la familia ha sido acompañada por diversos cambios fitoquímicos que le han permitido desarrollar y explorar nuevos mecanismos defensivos (alcaloides, conductos laticíferos, olores, etc.). La familia incluye plantas alimenticias, medicinales, ornamentales e industriales, a la par de las malezas y plantas tóxicas (Freire, 2004).

2.8. Género *Baccharis*

El género *Baccharis* incluye alrededor de un tercio de todas las especies ecuatorianas Jørgensen (1999) reportó 45 especies de *Baccharis* para el Ecuador continental, 10 de ellas endémicas. Un estudio preliminar (Müller, 2007), sugiere que el número de especies es probablemente algo menor (35-40), pero el número de especies endémicas es mayor (13). Además, los Andes del centro y sur de Ecuador (Prov. Chimborazo, Loja) son el centro de riqueza de especies y endemismos en el país.

2.8.1. Fitoquímica del género *Baccharis*.

El estudio de las especies del género *Baccharis* ha mostrado grandes avances debido a su prestigioso uso en la medicina popular de América Latina. Su fitoquímica destaca la aparición de flavonoides, cumarinas, diterpenos y triterpenos, siendo las flavonas los compuestos de mayor frecuencia en este género además de flavonoles y diterpenos del tipo labdano y clerodanos (Emerenciano et al, 2001). También se ha observado la presencia de kauranos, ácidos cumáricos, sesquiterpenos y fenilpropanoides. Estudios de actividad biológica destacan efectos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos y acción anti-inflamatoria. Entre las especies más estudiadas en cuanto a su composición química /actividad biológica se encuentran: *B. megapotamica*, *B. incarum*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B. crista*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* y *B. tricuneata* (Verdi et al, 2005).

2.8.1.1. Flavonoides.

Hasta el momento se han reportado 298 compuestos de tipo flavona en el género *Baccharis* con 109 compuestos diferentes, 24 con la unidad de flavona y 85 con la unidad flavanona, de los cuales 48% se presentan un oxígeno en C-3. El patrón de la oxigenación se produce con más frecuencia en C-5 y C-7 del anillo A y C-4' del anillo B, un grupo metoxi se produce con más frecuencia en C-7 y C-6 del anillo A y C-4' Anillo B. Algunos flavonoides encontrados en este género corresponden a: quercetina y 5, 7,4'-trihidroxi-6-methoxiflavona aisladas de *B. grisebachii*; luteolina*, aromadendrina, naringenina, 2'-methoxichrisin, apigenina, 3-O-metilquercetina, taxifolina, quercetina y chrisoeriol de *B. illinita*; hispidulina*, naringenina*, 3'-methoxyluteolin, apigenina, kaempferol, eriodictiol*, aromadendrina, quercetina, 3'-methoxiquercetina, quercetin-3-O-

rhamnosido y quercetin-3-O-glucosido de *B. pseudotenuifolia* (Abad y Bermejo, 2007).⁴ Ver figura 2.

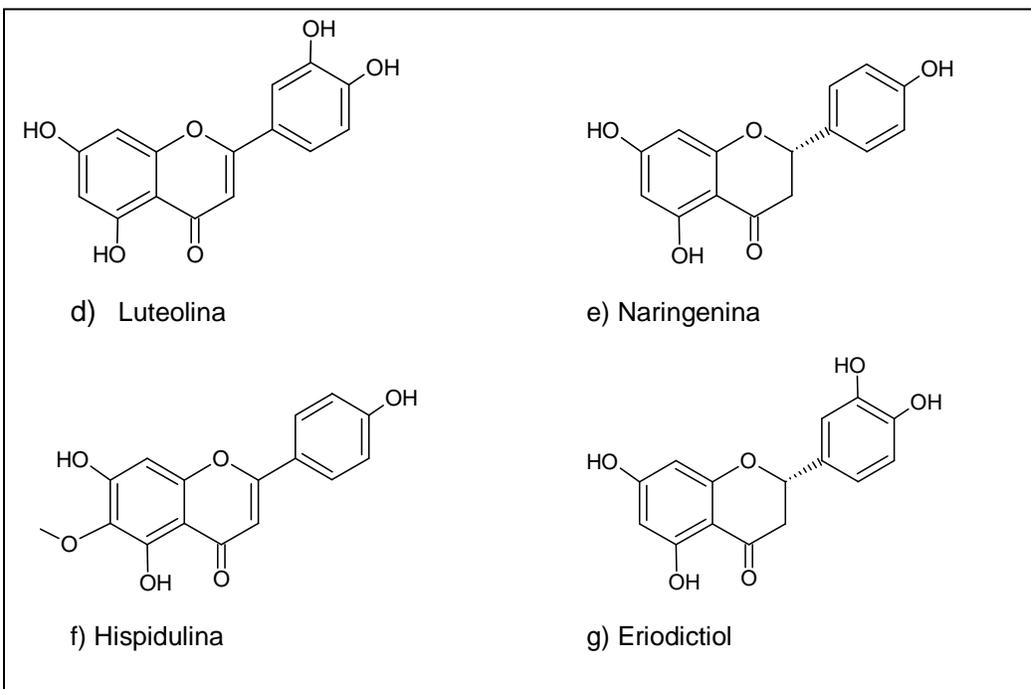


Figura 2. Estructura química de luteolina, naringenina, hispidulina, eriodictiol.
Fuente: Autor

2.8.1.2. Diterpenoides.

Constituyentes diterpénicos característicos del género *Baccharis* son los diterpenos tipo neo-clerodano, aunque derivados de kaurano y labdano también han sido aislados. Por ejemplo de *B. gaudichaudiana* se han aislado dos nuevos clerodanos, gaudichanolidos A, B, C y un nuevo *ent*-clerodano denominado como bacchariol (Figura 3).

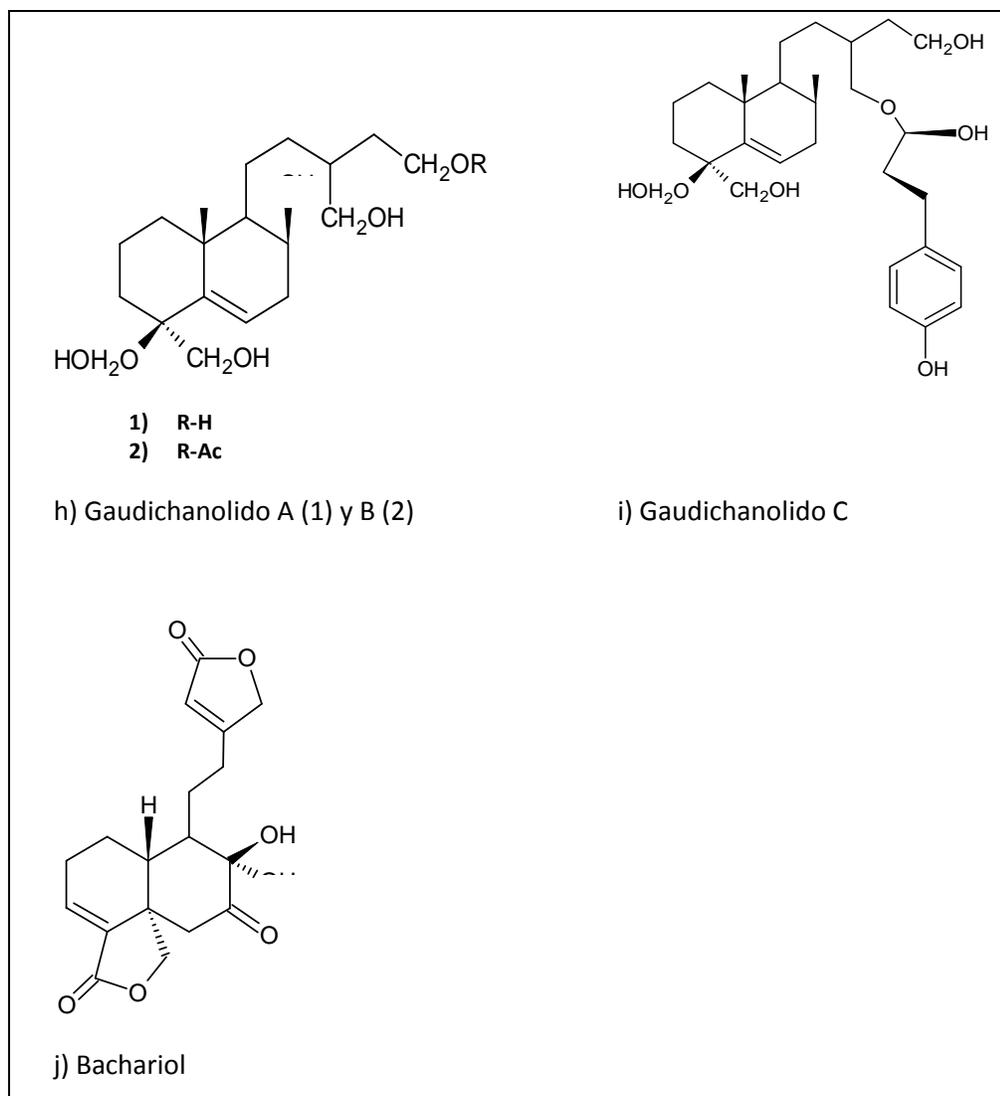


Figura 3. Estructura química de gaudichanolido A, B, C y bachariol
 Fuente: Autor

2.8.1.3 Triterpenoides

Sólo ha habido unos pocos informes sobre compuestos de tipo triterpeno del género *Baccharis* en los últimos años. Los compuestos más ampliamente conocidos de este grupo que se han reportado son triterpenos oleanólicos. El ácido oleanólico ha sido aislado de especies como *B. rufescens* y *B. ligustrina*, de estas especies también se ha logrado aislar el ácido ursólico (Figura 4).

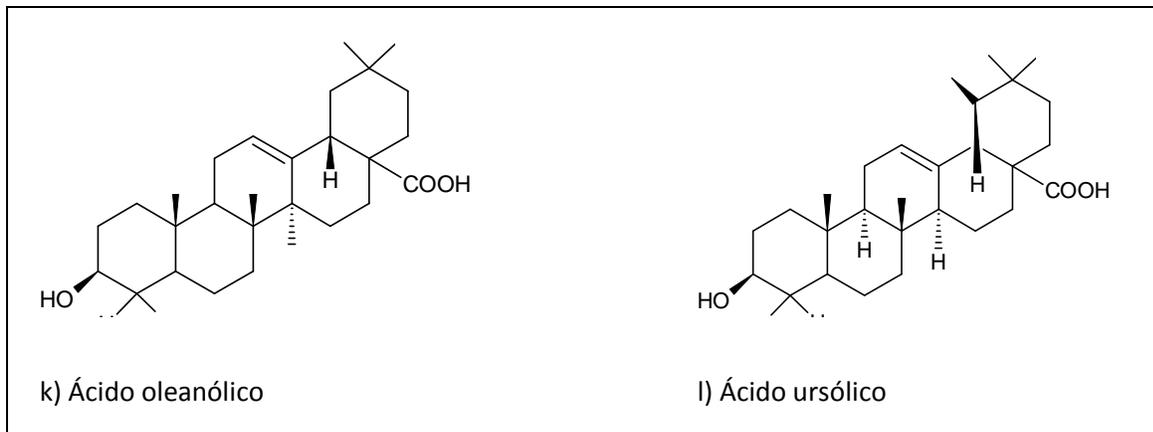


Figura 4. Estructura química del ácido oleanólico e ursólico
Fuente: Autor

2.8.1.4. Cumarinas

Existen solo unos pocos informes de cumarinas reportadas del género *Baccharis* en los últimos años. Estos informes se refieren a la especie *B. grisebachii*, de la cual se obtuvo derivados del ácido *p*-cumárico (Feresin et al, 2003) y de *B. tricuneata*, de la cual se aisló la cumarina escopolin (Figura 5).

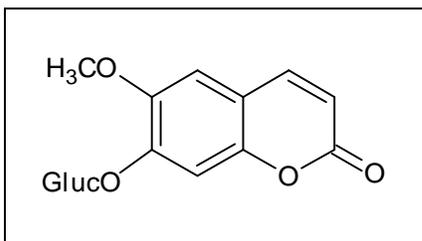


Figura 5. Estructura química de escopolin
Fuente: Abad y Bermejo, 2007

2.9. *Baccharis obtusifolia*.

2.9.1. Antecedentes.

La investigación científica es una instancia básica que tiene el poder de influir benéficamente en la interacción del hombre con las plantas a diferentes escalas y proporciona pautas para el uso sostenible de especies y ecosistemas. La mayoría de reportes se han llevado a cabo para poner el conocimiento a disposición de la comunidad

en general. Estos estudios se han realizado para rescatar un conocimiento que está en riesgo de perderse, por un afán de documentación de sitios inexplorados o peculiares, o bien para profundizar en el uso y manejo de especies o grupos de plantas en las zonas de origen, y con ello, ofrecer mejoras o alternativas de explotación (De la Torre et al, 2008).

En la provincia de Loja se ha estudiado el uso que se da a las plantas que crecen en los bosques secos y las estribaciones occidentales. Elleman (1991) reportó 370 especies útiles catalogadas como medicinales en la provincia de Saraguro a diferencia de otras provincias en donde los usos de las especies vegetales son de carácter alimenticio y comercial. El estudio Fitoquímico de las especies vegetales en nuestro país está avanzando a medida que aumenta el interés en medicina tradicional como parte de una práctica muy utilizada desde la antigüedad.

Este conocimiento ancestral se convierte en una gran herramienta al momento de estudiar los compuestos que son los responsables de las propiedades terapéuticas que se les atribuye y que se encuentran contenidos en estas especies. La investigación química de la especie *Baccharis obtusifolia*, comenzó por el conocimiento de las aplicaciones antiinflamatorias que le dan las comunidades étnicas en nuestra provincia de Loja (Tene et al, 2007), a partir de ello se han realizado estudios de los extractos totales obtenidos a partir de esta especie en donde se reportan la presencia de esteroides, lactonas sesquiterpénicas y cumarinas mediante marchas fitoquímicas (Ordóñez et al, 2006)

2.9.2 Características.

Baccharis obtusifolia Kunth, es una especie de la familia Asteraceae, su nombre vulgar es *Chilca redonda*, también se la conoce como Shadán (Ansaloni, 2010) y con el sinónimo de *Baccharis luxensis* Kunth. La composición fitoquímica de esta especie, incluye flavonoides, triterpenoides y clerodanos (Verdi et al, 2005).

Los flavonoides se han asignado como importantes marcadores químicos en la familia Asteraceae y están siendo estudiados en aplicaciones médicas debido a sus propiedades antioxidantes y actividad anti-VIH (Emerenciano et al 2001, Gonzaga et al, 2005). Un estudio realizado en la provincia de Loja, caracterizó a esta especie para tratar luxaciones, esguinces, cortes y moretones, inflamación de las articulaciones y las vías urinarias, antibacteriana y antifúngica (Tene et al, 2007).

2.9.3. Taxonomía.

Tabla1. Taxonomía de *Baccharis obtusifolia*

<p>División: Magnoliophyta</p> <p>Clase: Magnoliopsida</p> <p>Subclase: Magnoliopsida Novák ex Takht.</p> <p>Orden: Asterales (Link)</p> <p>Familia: Asteraceae (Bercht. & J. Presl)</p> <p>Género: <i>Baccharis</i> L.</p> <p>Especie: <i>Baccharis obtusifolia</i></p> <p>Nombre Científico: <i>Baccharis obtusifolia</i> Kunth.</p> <p>Nombre Común: Chilca redonda, Shadán.</p> <p>Sinónimo: <i>Baccharis luxensis</i> (Kunth)</p>	
--	--

Fuente: (Kunth, K, Humboldt, F, Bonpland, A. Nova Genera et Species Plantarum. Recuperado de [http://tropicos.org/NamePublicationDetail.aspx?nameid=2704790.](http://tropicos.org/NamePublicationDetail.aspx?nameid=2704790))

2.9.4. Descripción.

Son arbustos, sufrútices o hierbas perennes. Las hojas son alternas raramente opuestas y a veces bracteiformes y reducidas. Los capítulos son homógamos o heterógamos, discoideos, disciformes o subradiados. El involucre puede ser hemisférico, acampanado o cilíndrico, pluri o pauciseriado. El receptáculo suele ser plano, convexo o cónico, liso o alveolado, desnudo o provisto de páleas en algunos capítulos pistilados. Las flores del margen son pistiladas con corola generalmente filiforme de ápice dentado, truncado o levemente ligulado, constituyendo capítulos propios en las plantas dioicas y gino-dioicas: estilo con ramas lineares largas (Giuliano, 2000).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Los pasos a seguir para la realización del presente estudio se esquematiza a continuación (Figura 6):



Figura 6. Esquema del proceso de experimentación.
Fuente: Autor

3.1. Material Vegetal

3.1.1. Área de Recolección.

Las hojas de la especie *Baccharis obtusifolia*, fue recolectado en el Cerro Villonaco provincia de Loja-Ecuador, ubicado en las coordenadas 04°01'25.20"S, 79°14'45.90"O a una altura de 2849 msnm, en enero de 2012. (Figura 7).

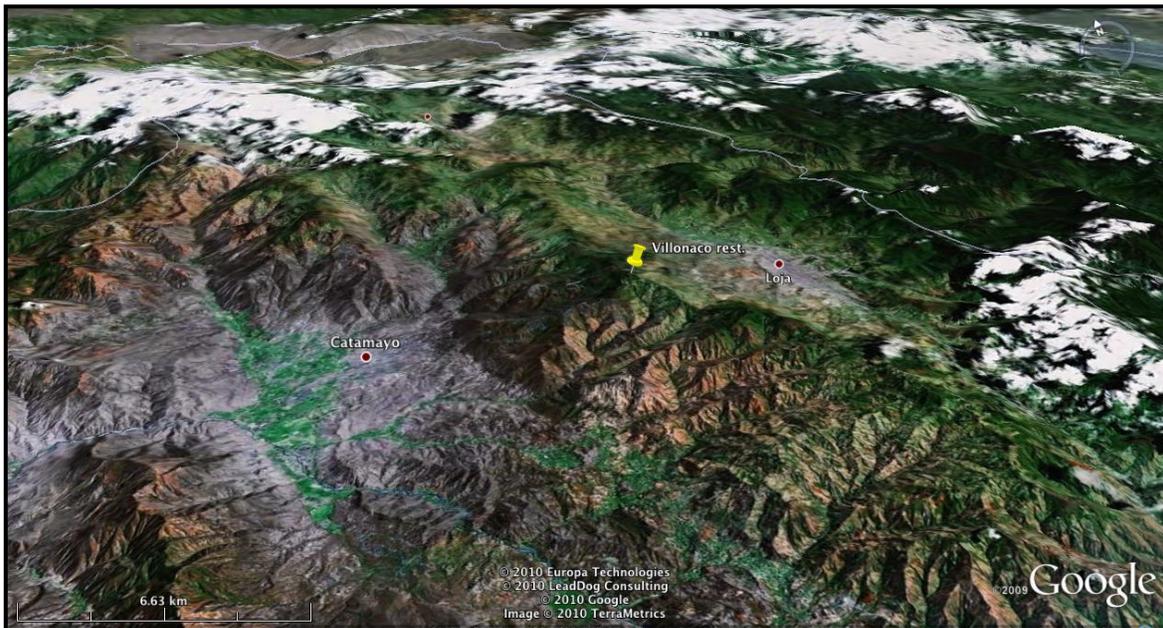


Figura 7. Mapa del lugar de recolección de la especie *B. obtusifolia*.

Fuente: Calatayud et al, 2010. Recuperado de

http://www.rncalliance.org/WebRoot/rncalliance/Shops/rncalliance/4C41/439A/88BF/FFF9/D056/COA8/D218/D26A/Paramo_Villonaco.pdf

Una muestra voucher fue depositada en el herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (PPN-as-014).

3.2. Extracción

La separación de los metabolitos secundarios de *B. obtusifolia* inició con el deshidratado de las hojas en un secadero de bandejas durante 4 días a una temperatura de 34°C. En la maceración, al material vegetal seco y triturado (144.93 g) se agregó metanol con la cantidad suficiente de disolvente como para cubrir totalmente el material vegetal y se aplicó agitación constante durante 5 horas.

La filtración se realizó a vacío y el concentrado se realizó en un rotaevaporador (BUCHI; R-210) obteniéndose el extracto total el cual fue pesado y rotulado con el nombre de la especie y el lugar de recolección.

3.2.1. Extracción de clorofilas.

Este procedimiento se realizó con la finalidad de obtener fracciones libres de clorofila y lograr purificar los metabolitos secundarios de interés con mayor facilidad evitando la pérdida de cantidades importantes de compuesto. De manera que al extracto total obtenido se disolvió en MeOH/H₂O (85:15) y se colocó sobre un sistema de filtración utilizando silica en fase reversa como fase estacionaria (RP18; 5-6 cm) y se realizaron diversas filtraciones utilizando mezclas de disolventes como se detalla a continuación:

- ✓ Fracción 1, MeOH/H₂O relación 85:15 (1000ml).
- ✓ Fracción 2, MeOH/H₂O relación 90:10 (250ml).
- ✓ Fracción 3, MeOH al 100% (500ml).
- ✓ Fracción 4, diclorometano al 100% (500ml).

Las fracciones obtenidas se analizaron mediante TLC para verificar la presencia/ausencia de clorofilas. Se concentró la fracción **1** como aquella que se observó ausencia de clorofilas.

3.3. Fraccionamiento en columna de la fracción 1

La columna fue empacada en húmedo, la muestra se disolvió con metanol y se aplicó en la parte superior de la columna. Como fase estacionaria se utilizó silica gel (RP16, Merck) y estas dos fases se montaron en la columna con una relación 1:40, es decir, por cada gramo de muestra se colocaron 40 g de silica gel y se fraccionó con mezclas de disolventes en polaridad creciente utilizando hexano, acetato de etilo y metanol. Las fracciones se recolectaron de 200 ml aproximadamente.

3.3.1. Análisis de las fracciones obtenidas.

Cada fracción obtenida se la monitoreó mediante placas de silicagel 60 F₂₅₄ de 0,2 mm espesor; 5×4 cm (Merck) como fase estacionaria y como fase móvil se utilizaron mezclas de disolventes en función de la polaridad de la fracción analizada.

La solución reveladora consistió en:

- ✓ Ácido sulfúrico concentrado
- ✓ Vainillina
- ✓ Etanol 96%
- ✓ Ácido acético

Las placas se observaron bajo UV de 254 y 360 nm y las fracciones que presentaron marchas fitoquímicas similares se las reunió en una sola fracción y se las dejó evaporar a temperatura ambiente.

3.3.2. Purificación.

Las fracciones que lograron cristalizar o tomaron forma sólida se analizaron como primer paso por cromatografía de capa fina. Las fracciones que presentaron dos compuestos como máximo en placa de TLC se procedió a purificarla mediante el método de par de disolventes en donde por pruebas de solubilidad se escogieron dos disolventes miscibles entre sí en donde la sustancia sólida a purificar sea muy soluble en el primer disolvente en caliente e insoluble en el segundo disolvente escogido ya sea en frío o en caliente.

3.4. Procedimientos de caracterización

3.4.1. Punto de fusión.

Los puntos de fusión fueron determinados en el equipo Fisher-Jhons Melting Point Apparatus serial 40-22. La cantidad mínima posible a tomar de la muestra se colocó en el lente del equipo. El reóstato se fijó en 70 ya que el punto de fusión de las muestras no se conocía, la evaluación de la temperatura inició al momento en el que apareció la primera gota en la muestra hasta que terminó de fundirse.

El rango de temperatura tomado establece la pureza del compuesto analizado en donde el grado de pureza es mayor cuanto menor sea el intervalo de temperatura del punto de fusión (Grases et al, 2000)

3.4.2. Factor de retención.

Los valores R_f se expresaron aplicando la relación entre el recorrido de cada componente de la mezcla con respecto al recorrido del disolvente. De manera que el cálculo del coeficiente de retención se realizó aplicando la fórmula que se define a continuación:

$$R_f = \frac{\text{Recorrido (muestra)}}{\text{Recorrido (solvente)}}$$

Además la medida del recorrido tanto de la muestra como del solvente se realiza desde el punto de aplicación de la muestra hasta el límite marcado en la placa TLC (Figura 8).

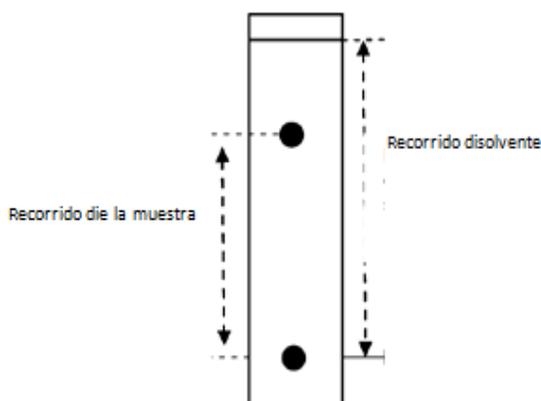


Figura 8. Medida del R_f en la placa TLC

Fuente: Silva et al, 2008.

3.4.3. Identificación de los compuestos aislados.

3.4.3.1. Espectro de gases acoplado a masas.

Los espectros de masas fueron obtenidos en un equipo Agilent 5975 GC/MS que incluye un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1 y un inyector automático split/splitless serie 7683 en condiciones de 70 Ev. Las inyecciones se realizaron en columnas capilares DB-5MS (5% - Fenil –metilpolisiloxano). Las condiciones de operación del equipo GC/MS se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de operación del equipo GC/MS

COLUMNA	Columna Capilar: Agilent 122-5562 DB-5ms, 0.25 mm* 60m* 0.25 um Temperatura máxima: 350°C Modo: Flujo constante Flujo inicial: 1.5 ml/min Presión inicial: 26.99 psi Velocidad promedio: 32 cm/sec Presión de salida: vacío
INYECTOR (Split/Splitless)	Modo: splitless Temperatura inicial: 50°C Gas: Helio
DETECTOR	Temperatura: 250°C Gas: Nitrógeno
HORNO	Temperatura inicial: 80°C Temperatura final: 300°C Gradiente de temperatura: 5°C/min.

Fuente: Laboratorio de análisis instrumental de la UTPL (Universidad Técnica Particular de Loja).

3.4.3.2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear.

Los espectros de resonancia magnética RMN, ^1H y ^{13}C , experimentos, fueron analizados en el equipo Varian Unity RMN Número de serie 21953, que opera a 400 MHz y 100 MHz respectivamente

Los desplazamientos químicos se expresan en δ (ppm) en relación al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y las constantes de acoplamiento J ($^1\text{H}/^1\text{H}$) son expresadas en Hz.

3.5. Pruebas de inhibición del crecimiento celular

Se utilizaron 2 líneas celulares de cáncer humano: RKO (cáncer de colon) y D384 (SNC). Cada línea celular se cultivó en medio RPMI GIBCO a 37°C, humedad del 95%, en una atmósfera con un 5% de CO₂. Las líneas celulares fueron expuestas por 48 horas a los compuestos analizados a 50 µM, determinándose el efecto inhibitorio empleando el método de MTT siguiendo el protocolo:

1. En una caja multidish de 96 pocillos se sembraron 3000 células con 100 µL de medio de cultivo por pocillo. Se incubó por 24 horas.
2. Se aplicó tratamiento con cada uno de los derivados disueltos en DMSO (0,5%) y medio de cultivo. También se aplicó DMSO (0,5%) como control negativo y Doxorubicina 2 µM como control positivo. En todos los casos se llegó a un volumen final de 200 µL en cada pocillo. Cada dosis se aplicó por triplicado en tres experimentos diferentes. Se incubó por 48 horas.
3. Se añadió 20 µL de reactivo de MTT Gibco, se incubó por 2 horas.
4. Se realizó la lectura en el espectrofotómetro de Elisa (Sunrise) a una absorbancia de 490 nM.

Estas pruebas fueron realizadas en el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica Particular de Loja.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1. Extracto

Mediante procesos mecánicos y utilizando como disolvente metanol, se obtuvo un extracto total de *Baccharis obtusifolia*. El metanol (MeOH) tiene gran poder extractivo y logra extraer la mayoría de los principios activos de interés como alcaloides, flavonoides, glicósidos cardiotónicos y terpenos debido a su condición de altamente polar. El proceso de obtención del extracto no fue dirigido a determinar un grupo específico de compuestos, de manera que al no conocer los constituyentes activos de esta especie se utilizó este tipo de disolvente que es considerado dentro del grupo de disolventes ideales para extraer completamente los metabolitos secundarios (Sharapin, 2000).

4.1.1. Peso y Rendimiento.

Los datos obtenidos de peso y rendimiento del extracto obtenido se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Peso y Rendimiento del extracto de *Baccharis obtusifolia*

Material vegetal seco	144.93 g
Extracto total metanólico	8, 74 g
Rendimiento	6.03%

Fuente: Autor

4.2. Fraccionamiento del extracto metanólico

Como resultado del fraccionamiento por CC de la fracción 1 de *Baccharis obtusifolia*, se obtuvo un total de 258 fracciones en las siguientes polaridades:

Tabla 4. Fraccionamiento de la fracción 1 de *Baccharis obtusifolia*.

Fracción	Relación disolvente/disolvente	Mezclas de Disolvente	Cantidad (mililitros)
1-14	100	Hexano	1000
14-22	95:5	Hex/AcOEt	2000
23-57	90:10	Hex/AcOEt	6000
58-70	85:15	Hex/AcOEt	2500
71-89	80:20	Hex/AcOEt	3600
90-113	75:25	Hex/AcOEt	3000
114-125	70:30	Hex/AcOEt	2000
126-139	65:35	Hex/AcOEt	2400
140-150	60:40	Hex/AcOEt	2000
151-180	55:45	Hex/AcOEt	5000
181-190	50:50	Hex/AcOEt	2000
191-198	60:40	AcOEt/Hex	1500
199-204	70:30	AcOEt/Hex	1000
205-210	80:20	AcOEt/Hex	1000
211-216	90:10	AcOEt/Hex	1000
217-222	100	Acetato de etilo	1000
222-258	100	Metanol	7000

Fuente: Investigación directa

El cambio de polaridad de la columna se realizó evaluando mediante TLC las fracciones recolectadas. La ausencia de marchas fitoquímicas en la placa nos indican el cambio de polaridad.

Las fracciones más representativas que cristalizaron fueron **70-79, 43-45, 94-98, 82-83, 135-138**. Se consideran representativas debido a su cantidad y marchas fitoquímicas observadas en placa TLC como máximo de dos.

4.3. Metabolitos aislados de *Baccharis obtusifolia*

Como resultado del fraccionamiento del extracto sin clorofilas (Fracción **1**), se obtuvo dos fracciones representativas, 70-79 (80 mg; Hex: AcOEt de etilo, 80:20) y 43-45 (11,2 mg; Hex: AcOEt, 90: 10), de las cuales dos compuestos se lograron aislar dos compuestos puros como se puede ver en el espectro EM (ver espectro 5) y que se identificaron como: sakuranetin (5, 4'-dihidroxi-7-metoxiflavanona) (**1**) (Figura 9) y 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona, (**2**) (Figura 10) respectivamente. Los compuestos presentan coloración amarilla en luz UV de 254 nm y verde fluorescente a luz UV de 365 nm, debido a que estos compuestos de tipo flavonoide consisten en compuestos sólidos de sistema conjugado de los anillos aromáticos (Martínez, 2005).

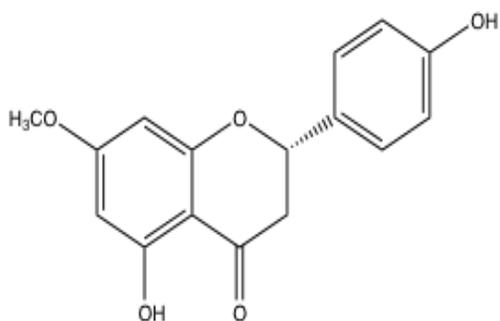


Figura 9. Estructura química de Sakuranetin (**1**)
Fuente: Autor

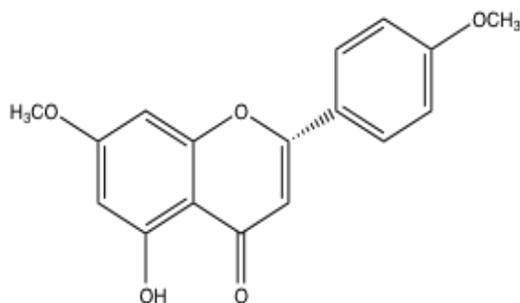


Figura 10. Estructura química de 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona (**2**)
Fuente: Autor

4.3.1. Análisis del espectro de masas de los compuestos 1 y 2.

En el espectro GC se puede observar un solo pico con un tiempo de retención de 14.65 para el compuesto **1** (Espectro 1) y 20.11 para el compuesto **2** (Espectro 5). En el espectro de masas de los compuestos analizados se observó el ion molecular de m/z 286,6 que coincide con la fórmula global de $C_{16}H_{14}O_5$ y un ion molecular m/z 298 que coincide con la fórmula molecular $C_{17}H_{14}O_5$ para los compuestos **1** (Espectro 2) y **2** (Espectro 6) respectivamente. La fragmentación típica de flavonas se originan por rompimientos retro-Diels-Alder (Figura 11) (Herrera et al, 1996, Martínez, 2005), presentando generalmente fragmentos M^+ , $[M-OH]^+$, y $[M-CHO]^+$, A_1^+ , $[A_1-CO]$, B_1^+ y B_2^+ en el espectro de los compuestos obtenidos (Tabla 5).

Tabla 5. Iones en el espectro de masa de **1** y **2**.

Flavona	Valores de masa m/z , (intensidad en % pico base)						
	M^+	$[M-CHO]^+$	$[M-OH]^+$	A_1^+	$[A_1-CO]$	B_1^+	B_2^+
1	286 (100)	N.D. [*]	269 (7)	N.D. [*]	138 (15)	N.D. [*]	120 (25)
2	298 (100)	269 (22)	N.D. [*]	166 (11)	N.D. [*]	132 (13)	135 (11)

N.D.^{*} No detectada.

Fuente: Investigación directa.

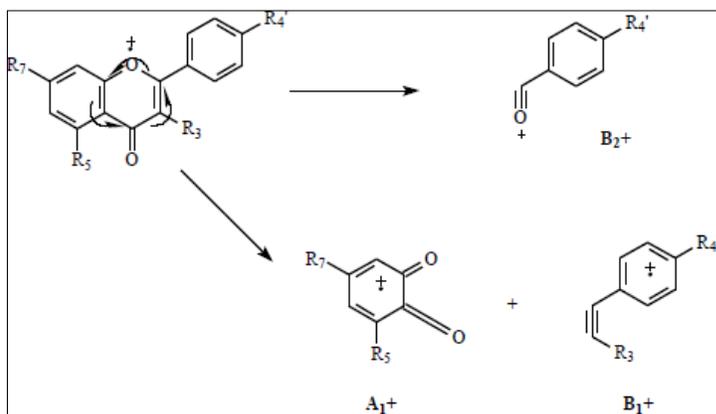


Figura 11. Rompimientos retro-Diels-Alder

Fuente: Martínez, 2005

4.3.2. Análisis del espectro RMN de los compuestos 1 y 2.

4.3.2.1. Espectro RMN ^1H .

El espectro RMN ^1H proporciona elementos de información importantes como lo son el número de señales distintas, el desplazamiento químico, el desdoblamiento químico y la integración de la intensidad de las señales (Fox, 2000). El número de señales en el espectro corresponden a los diferentes tipos de protones que se encuentran en la estructura. De esta manera en el espectro RMN ^1H del compuesto **1** (Espectro 3) podemos determinar 7 señales diferentes. Se observa una señal en la zona alifático δ (3.81 ppm) perteneciente a los protones de un grupo metoxilo y que integra para 3 átomos de hidrógeno. Los desplazamientos químicos en δ (ppm 2.80-3.10; dd, $J = 17.1$), son característicos del sistema de flavonas (Freitas et al, 2008) y el desplazamiento en δ (ppm 7.30-7.41) pertenecen a los protones aromáticos del anillo B.

En el espectro del compuesto **2** (Espectro 7), se observa señales similares a los de la flavona **1**, dos señales en la zona alifática δ (3.89 ppm) que pertenece a los protones de los grupos metoxilo y que integran para 6 átomos de hidrógeno, diferencian estas estructuras. Además se puede observar el desplazamiento hacia campos más bajos de estas señales por la presencia del oxígeno en el grupo metoxi que desapantalla a este tipo de protones.

Tabla 6. Datos espectrales de ^1H RMN (CDCl_3) de **1** y **2**

Protones*	1	2
H-2	5.36; dd, 13.03	—
H-3 α	3.10; dd, 17.1	—
H-3 β	2.80; dd, 17.1	6.59; s
H-6	6.08; d, 2.06	6.38; d, 2.2
H-8	6.05; d, 2.54	6.49; d, 2.65
H-2'	7.30-7.41; m	7.83-7.88; m
H-3'	6.85-6.95; m	7.01-7.04; m
H-5'	6.85-6.95; m	7.01-7.04; m
H-6'	7.30-7.41; m	7.83-7.88; m
OH-5	12.02; s	—
OCH ₃ -7	3.81; s	3.88; s

*Para cada protón se muestra el desplazamiento químico, multiplicidad y la constante de acoplamiento.

Los datos RMN ¹H de **1** y **2** (Tabla 6), muestran un patrón de sustitución "*para*" en el anillo B (Herrera, 1996). De manera que las sustituciones en estas flavonas se encuentran en la posición C-4' del anillo B en estas estructuras. El sustituyente corresponde a un grupo OH para **1** y un grupo metilo CH₃ para **2**.

Las señales en δ (6.08 a 6.05, d, $J = 2.06$; $J = 2.54$), δ (6.38-6.49, d, $J = 2.21$; $J = 2.65$) para **1** y **2** muestran el acoplamiento de los protones H-6 y H-8 en el anillo aromático A. Los protones de los grupos hidroxilos generalmente no se observan en los espectros cuando estos se determinan en disolventes próticos, sin embargo existen métodos para observarlos no solo en los flavonoides sino en cualquier producto natural (Brigmann, 2000)

4.3.2.2. Espectro RMN ¹³C.

El espectro RMN ¹³C en la configuración de la estructura de los compuestos químicos aporta con dos factores a tomar en cuenta como son, el número de señales distintas, que corresponde al número de tipos diferentes de átomos de carbono, y el desplazamiento químico de cada señal que está determinado por el entorno molecular de cada carbono (Fox, 2000).

En las flavonas analizadas se evidencia 16 señales diferentes que corresponden a los 16 átomos de carbono de **1** (Espectro 4) y 17 señales para los 17 átomos de carbono **2** (Espectro 8). Los datos espectrales de RMN ¹³C para **1** y **2** se muestran en la tabla 7.

Para **1**, en la zona de δ alifática (55.6 ppm) aparece una señal, que pertenecen a un grupo metoxilo, una señal en δ (43.1 ppm) asignado a C-3 (Guzmán, 2008, Herrera et al, 1996) y una señal en δ (115.6 ppm) asignado a C-10 de flavonas 5-hidroxiladas que se incluyen en la estructura de nuestro compuesto y se confirma en el espectro de ¹H RMN. Los datos espectrales del compuesto **2** muestran dos señales en δ (55.5-55.7 ppm) que pertenecen a dos grupos metoxilo presentes en esta estructura y que al igual se

confirman en el espectro de ^1H RMN. Además en el intervalo de (92.6-165.4 ppm) se observan 15 señales de átomos de carbono que forman la base estructural de las flavonas que pertenecen al sistema de C6-C3-C6 (Brigmann, 2000).

Tabla 7. Datos espectrales de RMN ^{13}C (CDCl_3) de **1** y **2**

Carbonos	1	2
C-2	79	164.0
C-3	43.1	104.3
C-4	196.0	182.4
C-5	164.1	165.4
C-6	95.1	98.0
C-7	168.0	165.4
C-8	94.2	92.6
C-9	162.8	162.1
C-10	103.1	104.3
C-1'	130.5	123.5
C-2'	128.0	128.0
C-3'	114.2	114.4
C-4'	156.1	157.6
C-5'	115.6	114.5
C-6'	128.0	128.3
OCH₃-7	55.6	55.5
OCH₃-4'	————	55.7

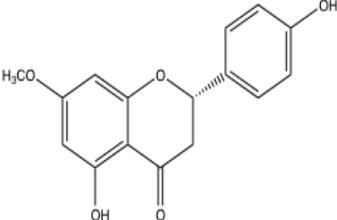
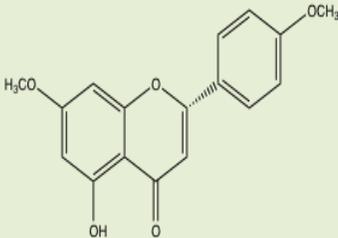
*Desplazamientos químicos en ppm

Fuente: Autor

4.3.3. Características generales de los compuestos aislados.

Las características generales de las flavonas se describen en la tabla 8. El punto de fusión (no corregido) es un parámetro que nos ayuda a definir la pureza de un compuesto pero que no se ha considerado como pieza clave en la caracterización de los compuestos a diferencia de los espectros de ^1H y ^{13}C .

Tabla 8. Características generales de los compuestos aislados de *Baccharis obtusifolia*.

COMPUESTO AISLADOS CARACTERÍSTICAS GENERALES				
Compuesto	Estructura	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)	Punto de fusión (no corregido) (°C)
Sakuranetin (5,4 '-dihidroxi-7- metoxiflavona) (1)		C ₁₆ H ₁₄ O ₅	286,6	240-243
5-hidroxi-7, 4'- dimetoxiflavona (2)		C ₁₇ H ₁₄ O ₅	298,2	160-163

Fuente: Autor

Estas dos flavonas han sido reportados en otras especies: *Baccharis trinervis* (Herrera, 1996) *Baccharis salicifolia* (Del Corral et al, 2012), *Artemisia campestris* (Verdi, 2005) *Chromolaena subscandens* (Guzmán, 2008) *Trigonas pinipes* (Freitas et al, 2008), para el compuesto sakuranetin (5,4 '-dihidroxi-7-metoxiflavanona) **1** y para 5-hidroxi-7, 4 '-dimetoxiflavona **2**, las especies: *Baccharis trinervis* (Herrera, 1996), *Inaequidens ballota* (Citoglu et al, 2005), *Combretum erythrophyllum* (Martini et al, 2004), *Kaempferia parviflora* (Tewtrakul et al, 2008), *Eremosparton songoricum* (Liu et al, 2006).

Los compuestos **1** y **2** se reportan por primera vez en la especie *B. obtusifolia*, y como algunos autores han mencionado (Del Corral et al, 2012, Guzmán, 2008, Emerenciano et al, 2001), estos compuestos de tipo flavonoide pueden ser considerados como importantes marcadores fitoquímicos.

La fitoquímica del género al cual pertenece la especie estudiada incluye además de flavonas la presencia de cumarinas y compuestos de tipo terpenoide. La presente investigación no fue enfocada a extraer un tipo de compuesto en especial por lo que

podemos establecer que estudios posteriores de la especie *Baccharis obtusifolia*, contribuirán al descubrimiento de un número mayor de compuestos químicos de gran importancia para establecer un perfil fitoquímico de la especie *Baccharis obtusifolia*.

De las fracciones **94-98**, **82-83**, **135-138** no se obtuvieron compuestos con la pureza necesaria para lograr ser elucidados ya que las fracciones presentaban mezclas de varios compuestos, además de poca cantidad de cristales para poder realizar los experimentos necesarios. Sin embargo se evaluaron por TLC, UV, tR, GC/MS.

4.3.4. Fracción 94-98.

Esta fracción fue obtenida en 75:25 Hex: AcOEt. Se pesó 6 mg y se observó un tiempo de retención de 12.20. Ver espectro 9.

Además esta fracción se analizó en RMN experimentos ^1H y ^{13}C (Espectro 10 y 11) por la presencia de un solo pico en el espectro GC. Sin embargo no se logró elucidar por presentar varias impurezas en el espectro RMN y tener muy poca cantidad de compuesto para realizar experimentos bidimensionales que proporcionen información necesaria para poder determinar la estructura química.

4.3.5. Fracción 82-83.

Esta fracción fue obtenida en 80:20, Hex: AcOEt. Se pesó 13.9 mg y es una mezcla de seis compuestos diferentes con tiempos de retención como siguen: 8.52, 8.67, 9.62, 13.38, 17.40, 19.87. Ver espectro 12

4.3.6. Fracción 135-138.

Esta fracción fue obtenida en 65:35. Hex: AcOEt. Se pesó 12.4 mg y es una mezcla de cinco compuestos diferentes con tiempos de retención como siguen: 14.75, 15.78, 17.32, 18.03, 28.07. Ver espectro 13

4.4. Efecto de los compuestos en dos líneas celulares RKO y D384

Se probó los dos compuestos a 50 μM . Como se puede observar en la figura 12. El compuesto **1** presentó baja actividad con 14% de inhibición celular en la línea RKO y 6% para la línea D384. Mientras que **2** a la concentración probada tuvo actividad moderada

en la línea D384 con 41.3% de inhibición del crecimiento celular y 2% en la línea celular RKO.

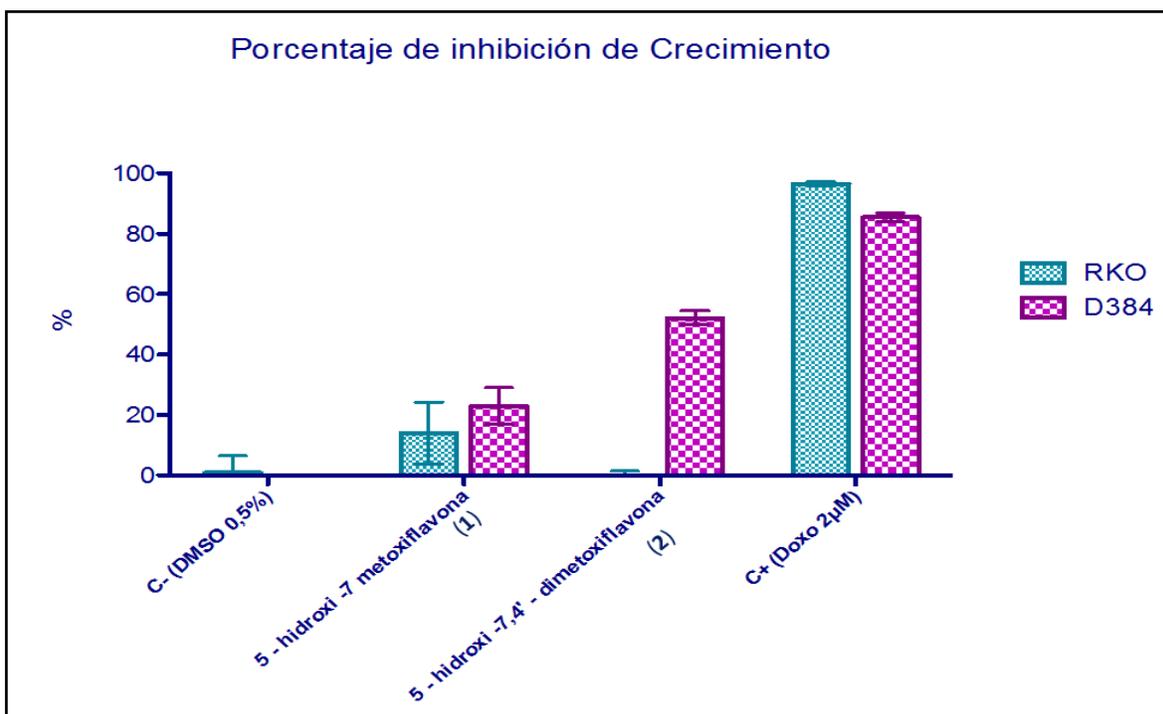


Figura 12. Porcentaje de inhibición de crecimiento en las líneas celulares RKO y D384 de los compuestos 1 y 2.

Fuente: Autor.

Existen diferentes reportes en los que se presentan estudios de diferentes clases de flavonoides respecto a su estructura química y su actividad biológica. Por ejemplo Zhang y Col., estudió la Relación Estructura-Actividad Biológica (REA) entre varios flavonoides y el cáncer de seno. Estos autores encontraron que el enlace doble entre C-2 y C-3, el anillo B ligado al C-2, el grupo hidroxilo en C-5, la no hidroxilación en C-3 y la presencia de sustituyentes apolares en C-6, C-7, C-8 ó C-4', son características estructurales importantes para la interacción entre los flavonoides y la BCRP (*breast cancer resistance protein*) (Zhang et al, 2005).

Como podemos observar en la estructura de la 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona (Ver figura 10) presenta características estructurales importantes como son el doble enlace entre C-2 y C-3, la presencia de un grupo OH en la posición 5 además del grupo carbonilo en la posición 4. Estas propiedades estructurales se han observado en ensayos de citotoxicidad

para Melanoma murino (Martínez et al, 2001) y supresión de ciclooxigenasa – 2 para cáncer de colon (Michihiro et al, 2000) lo que podría explicar la acción citotóxica de la 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona en células de astrocitoma cerebral (D384). Al igual se ha demostrado que la presencia de grupos metoxi en la molécula aumenta su capacidad antiproliferativa. En contraste la flavona, sakuranetin (Ver figura 10) no presenta el doble enlace en C-2 y C-3 lo que en flavonas mono o dihidroxiladas provoca la pérdida de actividad inhibitoria del crecimiento celular (Martínez et al. 2001).

Las numerosas aplicaciones que se le atribuyen a las flavonas sugieren que los compuestos obtenidos de *Baccharis obtusifolia*, pueden incluirse en diferentes tipos de ensayo para comprobar su actividad biológica. Así el sakuranetin (**1**) ha demostrado potente actividad antibacteriana contra *Helicobacter pylori*, adjudicando al grupo metoxi como un factor influyente de unión con el inhibidor HpFabZ (Proteína transportadora b-hidroxiacil-acilo deshidratasa). También es importante mencionar que no hay reportes de ensayos de citotoxicidad en células cancerígenas con el compuesto 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona (**2**).

Como hemos observado la relación entre estructura y actividad biológica se encuentran estrechamente ligadas. Modificaciones químicas en la estructura de las flavonas encontradas podrían aumentar su acción biológica y contribuir a la cura de numerosas enfermedades.

CONCLUSIONES

- ✓ A partir del extracto metanólico de *Baccharis obtusifolia*, se aislaron e identificaron dos flavonas: 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona (Sakuranetin) (**1**) y 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona (**2**). Las dos estructuras difieren en el grupo químico de sustitución en la posición 4' del anillo B de las flavonas. Para la identificación y caracterización de los dos compuestos se utilizaron RMN de ^1H y ^{13}C junto GC/MS. Es la primera vez que se reportan estos dos compuestos especie *Baccharis obtusifolia*.
- ✓ La 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxi flavona (**2**) presentó actividad moderada en la línea celular D384 (41.3%) y baja actividad (2%) en la línea celular RKO. Mientras que sakuranetin (**1**) presentó escasa actividad biológica (14% y 16%) en las líneas celulares D384 y RKO respectivamente.

RECOMENDACIONES.

- ✓ Posteriores estudios fitoquímicos y de actividad biológica de la especie *Baccharis obtusifolia* podrán ser valiosas herramientas de conocimiento y aporte en la búsqueda de nuevos mecanismos de acción contra las enfermedades
- ✓ Un estudio fitoquímico y de actividad biológica dirigido de la especie estudiada aportaría con un mayor número de compuestos biológicamente activos.
- ✓ Es importante destacar que trabajar con una cantidad mayor de extracto mejoraría el rendimiento de los compuestos obtenidos durante el fraccionamiento. De manera que al obtener mayor cantidad de compuesto se podría trabajar con experimentos espectrales necesarios para elucidar un determinado compuesto.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, M. J., Bermejo, P. (2007). "Baccharis (Compositae): a review update". *Arkivoc*, Vol. 7, 76-96.
- Ansaloni R.I., Wilches, F. L., Orellana, E. P., Tobar, V., De Witte, P. (2010). Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, Vol. 23, N. 1, 89-97.
- Bringmann, G y Col. (2000). *Journal of Chromatography*. A 904, 243-249.
- Brown, T. L., Brown, T. E., LeMay Jr., H. E., Escalona y García H. J., Bursten, B. E., Burdige J. R., Escalona y García, R. (2004). *Química: La ciencia central*: Ed. Pearson Educación.
- Calatayud, G.H, García V.L, Martín, P.M, Sierra, N.C, Vélez A.M. 2010. Recuperado de http://www.rncalliance.org/WebRoot/rncalliance/Shops/rncalliance/4C41/439A/88BF/FFF9/D056/C0A8/D218/D26A/Paramo_Villonaco.pdf.
- De la Torre, L., Navarrete, H. P., Muriel, M., Macía, M. J. & H. Balslev. (2008). *La etnobotánica en el Ecuador*. Herbario QCA& Herbario AAU. Quito & Aarhus, 13–27.
- Ellemann, L. (1991). *El uso de la madera del bosque montano por los Saraguros*. Herbario QCA, PUCE, Abya-Yala, Quito, 139-148.
- Emerenciano, V. P., Militão, J. S., Campos, C. C., Romofe, P., Kaplan, M. A. C., Zambon, M., Brant A. J. C. (2001). *Biochemistry. Systematic. Ecology*, 29-947.
- Feresin, G. E., Tapia, A., Giménez, A., Ravelo, A. G., Zacchino, S., Sortino, M., Schmeda-Hirschmann, G. J. (2003). *Ethnopharmacology*, 89-73.
- Freire, F.A. 2004. *Botánica Sistemática Ecuatoriana*. Missouri Botanical Garden, Fundacyt, Qcne, Rlb y Funbotanica. Murray Print, St. Louis, Missouri, 122-123.
- Freitas, M.O., Ponte, A.F., Lima, M.S., and Silveira, E.R. (2008). "Flavonoids and Triterpenes from the Nest of the Stingless Bee *Trigona Spinipes*", *19* (3), 532–535.

- Fox, M. A, Whitesell, J. K. 2000. Química Orgánica. México: Adisson Wesley Logman.
- Grases, F., Costa B. A., Söhnel, O. (2000). Cristalización en disolución: Conceptos básicos: Ed. Reverté.
- Gazak, R., Walterova, D., Kren, V. (2007) Silybin and silymarin – new and emerging applications in medicine. *Curr. Med. Chem.* 14 (3), 315-338.
- Gehm, B.D., McAndrews, J.M., Chien, P.Y., Jameson, L.J. (1997). Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and vine, is an agonist of the estrogen receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 94(25), 14138-14143.
- Giuliano, D. (2000). Subtribu Baccharinae: Baccharis, Editorial Flora Anerogámica Argentina. ProFlora CONICET, 66, 6-6.
- Guiochon, G. (2001). Basic principles of chromatography in: Handbook of *Anal. Tech.*
- Eds. Günzler, H. and Williams, A.1, 173-198.
- Gonzaga, L., Costa, B.I., Pizzolatti, M. (2005). The Baccharis genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina. São Paulo. Brazil
- Guzmán, A.J. (2008). “FLAVONOIDES DE Chromolaena Subscandens (Hieron.) R.M. King & H. Rob.” *Revista Productos Naturales*. 2–5. doi:10.3407/rpn.v2i1.15.
- Harborne, J. B., Willians, C. A. (2000). *Phytochemistry*. 55, 481.
- Herrera, J.C., Rosas, O.E., Crescente, A. M and Pekera, S. (1996). “Analysis of 5 hydroxy-7-methoxyflavones by Normal-phase High-performance Liquid Chromatography.” *Journal of Chromatography A*. 201–206. doi: 10.1016/0021-9673(96)00108-2.
- Heywood, V. H.(1993). Flowering plants of the world, Oxford University Press: New York.
- Jørgensen, P. M. & S. León-Yáñez (Eds.). (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Monogr. in Syst. Bot. Missouri Bot. Garden* 75: 1-1181.

Korkina, L., Kostyuk V. (2012). Biotechnologically Produced Secondary Plant Metabolites for Cancer Treatment and Prevention. *Rev. Current Pharmaceutical Biotechnology*, Vol. 13. 265-275.

Korkina, L., Pastore, S., De Luca, C., Kostyuk, V. (2008). Metabolism of plant polyphenols in the skin: beneficial versus deleterious effects. *Curr. Drug Metab.*, 9(8), 710-729.

Korkina, L. (2007). Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell. Mol. Biol.* 53(1), 15-25.

Kunth, K, Humboldt, F, Bonpland, A. *Nova Genera et Species Plantarum*. Recuperado de <http://tropicos.org/NamePublicationDetail.aspx?nameid=2704790>.

Liu, G., Ding, L., Luo, C., Yang, D., Liang, G., Wang, L. (2006). Protection against DNA damage and inhibition of lipid peroxidation by flavones from *Eremosparton songoricum* (Litv) Vass. *Research on chemical intermediates*. 32(2) ,145-152.

McNAIR, H.M. and J.M. MILLER. 1997. *Basic Gas Chromatography*: ed. I. JOHN WILEY & SONS.

Martínez A., (2005). *Flavonoides*. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia Medellín. Colombia

Martínez, J., Yáñez, J., Rodríguez, M., Canteras, M., Alcaraz y V. Vicente. (2001). Inhibición del crecimiento de la línea de melanoma murino B16F10 por diferentes compuestos polifenólicos. *Revista Española de Patología*, 34(4), 317-324

Martini, ND., Katerere, D. R., Eloff, JN. (2004). Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae) *Ethnopharmacology*, 93(2-3): 207-212.

Michihiro, M., Takahashi, M., Kazunori Fukuda, H. K., Takeji, E., Yuko M. H., Hiroshi, M., Takashi, S and Keiji, W. (2000). Suppression by Flavonoids of Cyclooxygenase-2 Promoter-dependent Transcriptional Activity in Colon Cancer Cells: Structure-Activity Relationship. *Jpn. J. Cancer Res*, 91, 686–691

Müller, J. (2007). A new small-leaved species of *Baccharis* (Compositae-Astereae) from Ecuador. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* Vol, 64(2), 191-194

Ordóñez, V. P., Vega, E. M., Malagón, A. O. (2006). Estudio Fitoquímico de Especies Vegetales Nativas utilizadas en la Medicina Tradicional de la Provincia de Loja. *Lyonia Ecology and Application Journal*, (10), 65-71.

Pretsch, E. and Clerc, J.T. 1997. *Spectra Interpretation of Organic Compounds*, Weinheim, VCH. Schmidt, B.M., Ribnicky, D.M., Lipsky, P.E., Raskin, I. (2007). Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. *Nat. Chem. Biol.*, 3(7), 360-366.

Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Colombia: Convenio Andrés Bello.

Schmidt, B.M., Ribnicky, D.M., Lipsky, P.E., Raskin, I. (2007). Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. *Nat. Chem. Biol.*, 3(7), 360-366.

Tene, V., Malagón, O., Finzi, P.V., Vidari, G., Armijos, C., and Zaragoza, T. (2007). "An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador." *Journal of ethnopharmacology*, 63-81.

Tesso, H. (2005). *Isolation and Structure Elucidation of Natural Products from Plants*. (University of Hamburg Institute of Organic Chemistry). Recuperado de <http://www.chemie.uni-hamburg.de/bibliothek/2005/DissertationTesso.PDF>.

Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., Kummee, S., (2008). Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferiaparviflor*. *Journal Ethnopharmacology*. 116(1):191-193

Vasconcelos, M.J., Silva, M.S., and Cavaleiro, J.S. (1998). "Chromones and Flavanones from *Artemisia Campestris* Subsp. *Maritima*." *Phytochemistry*. 1421-1424.

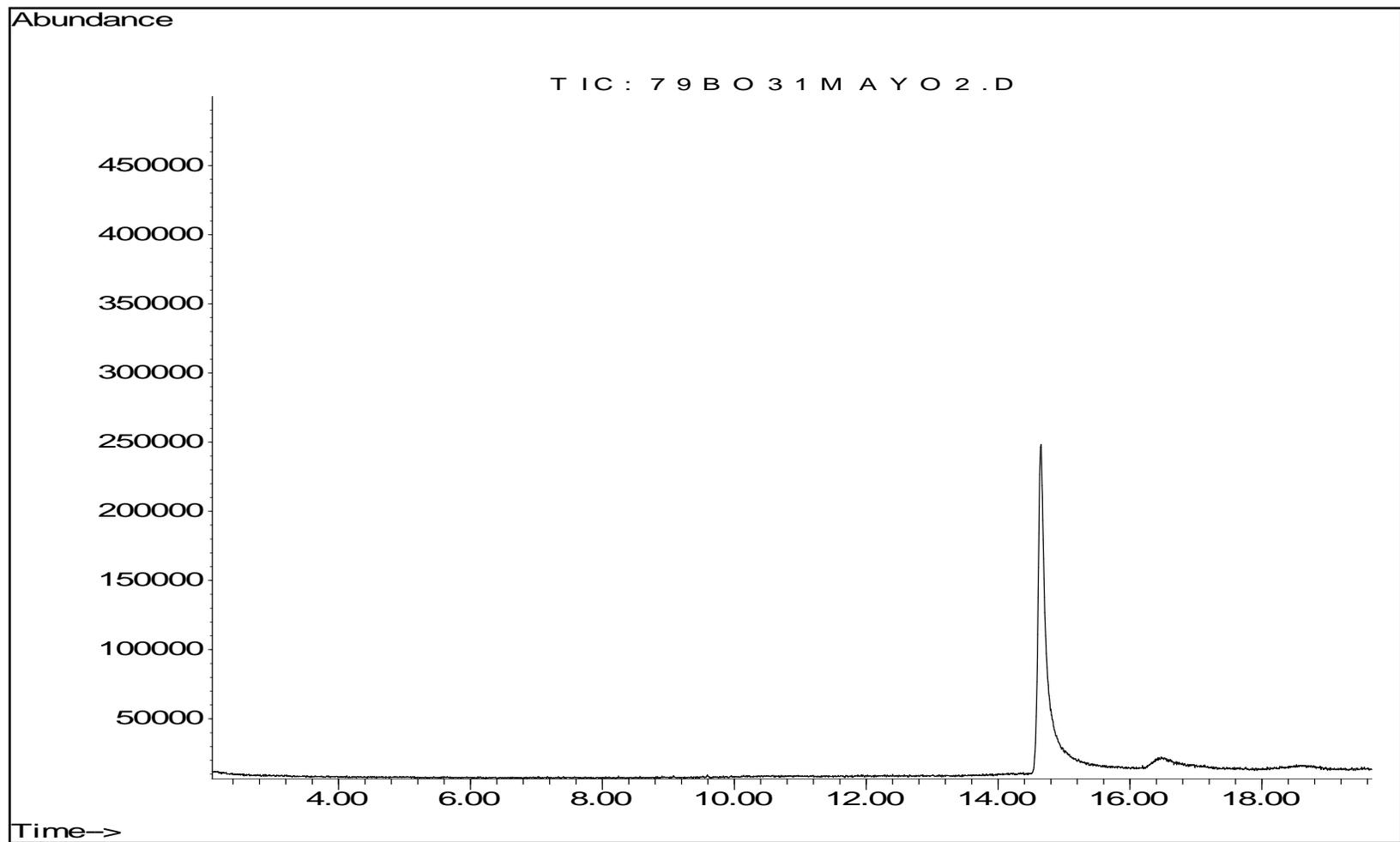
Verdi, L.G., Costa, M.B., Pizzolatti, G. (2005). Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 1, 85-94, 200528 (1): 85-94.

Waterhouse, D.N.; Gelmon, K.A.; Klas, R.; Chi, K.; Huntsman, D.; Ramsay, E.; Wasan, E.; Edwards, L.; Tucker, C.; Zastre, J.; Wang, Y.Z.; Yapp, D.; Dragowska, W.; Dunn, S.; Dedhar, S.; Bally, M.B. (2006). Development and assessment of conventional and targeted drug combinations for use in the treatment of aggressive breast cancers. *Curr. Cancer Drug Targets*, 6(6), 455-489.

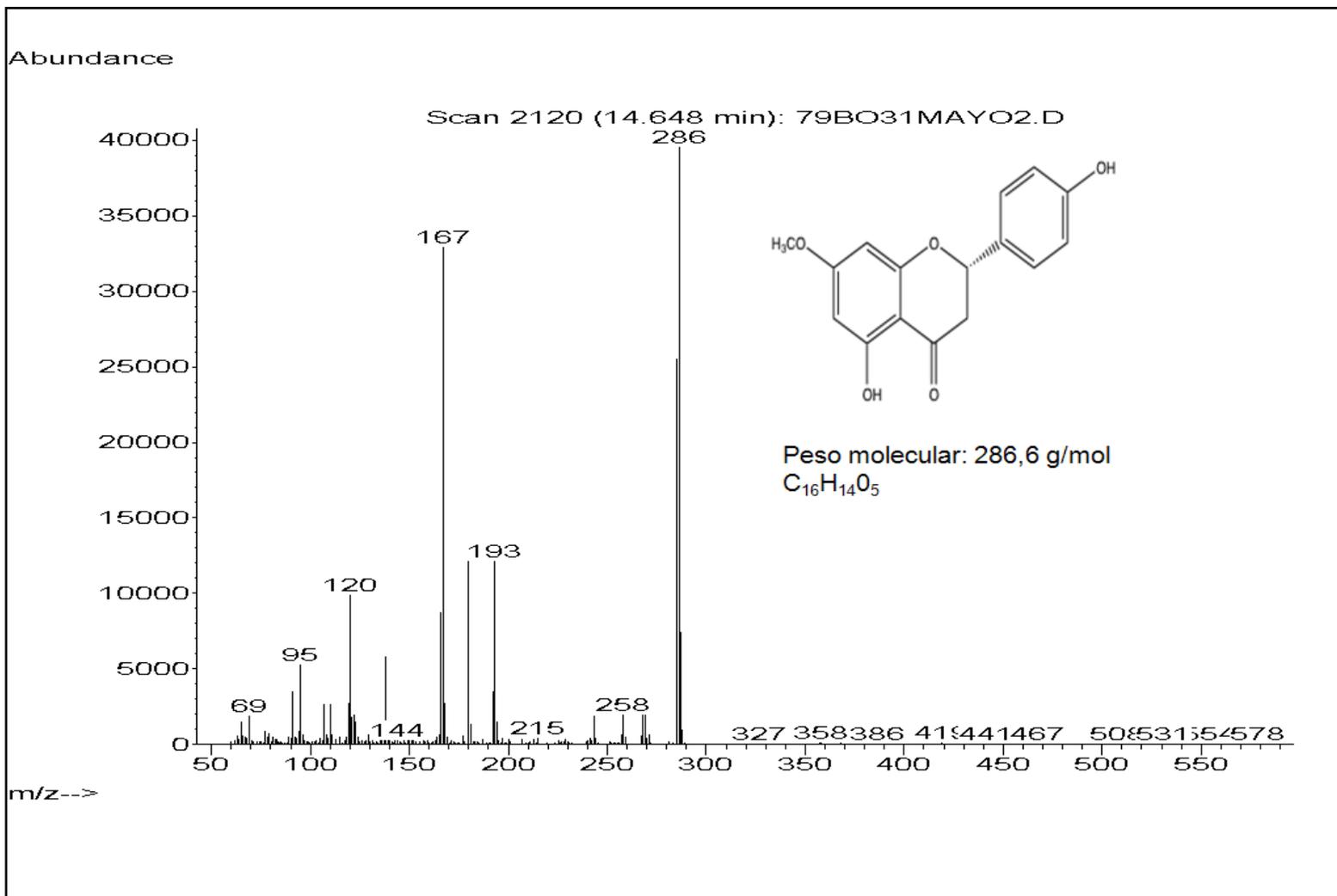
Zhang, L., Yunhua, K., Dalei, W., Haitao, Z., Jian, W., Jing, C., Jianping, D., Lihong, H., Hualiang, J., and X U Shen. (2008). "Three Flavonoids Targeting the B-hydroxyacyl-acyl Carrier Protein Dehydratase from Helicobacter Pylori: Crystal Structure Characterization with Enzymatic Inhibition Assay". *Protein Science*: 1971–1978.

Zhang, S y Col. (2005). *Biochemical Pharmacology* 70 627–639.

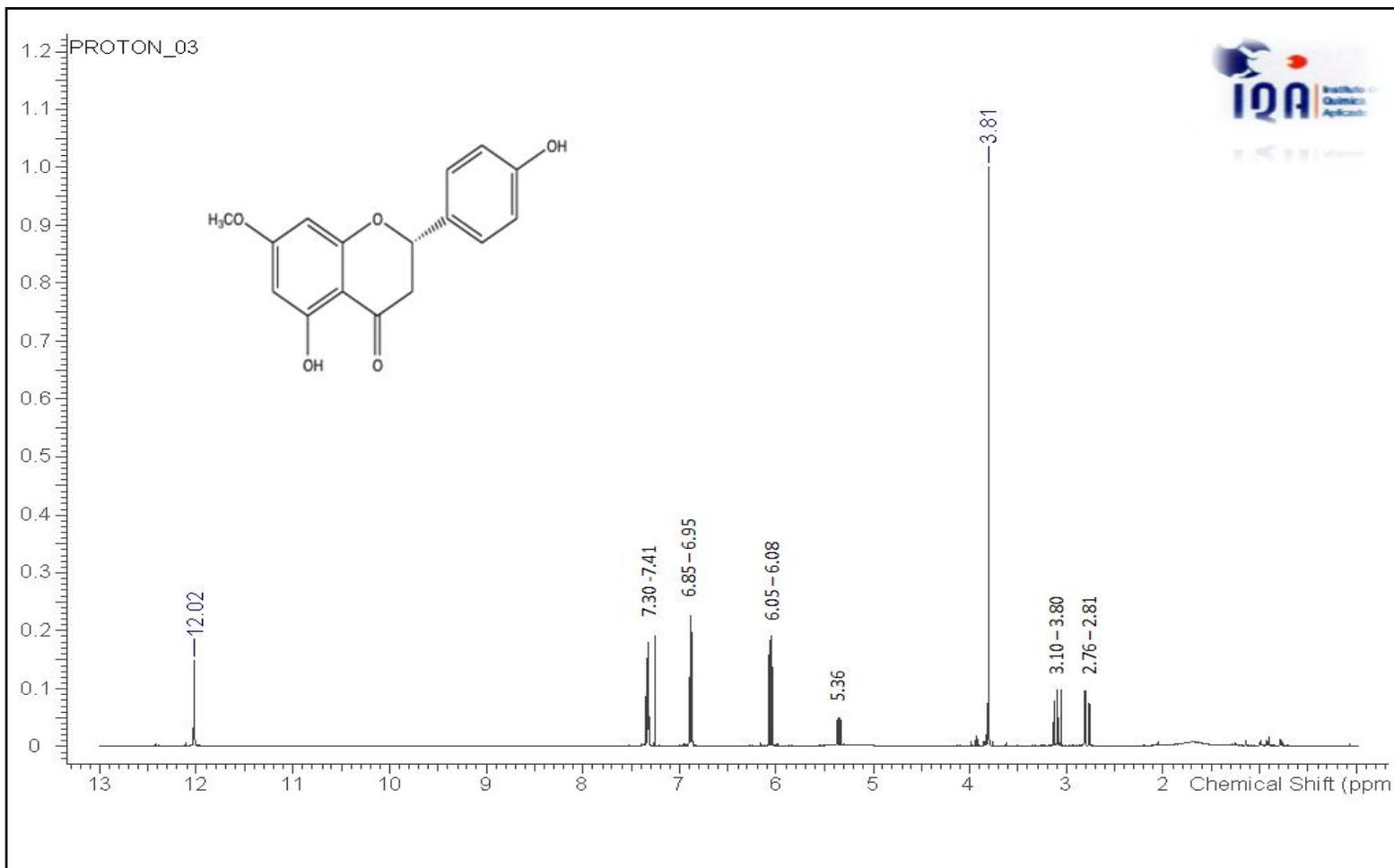
ANEXOS



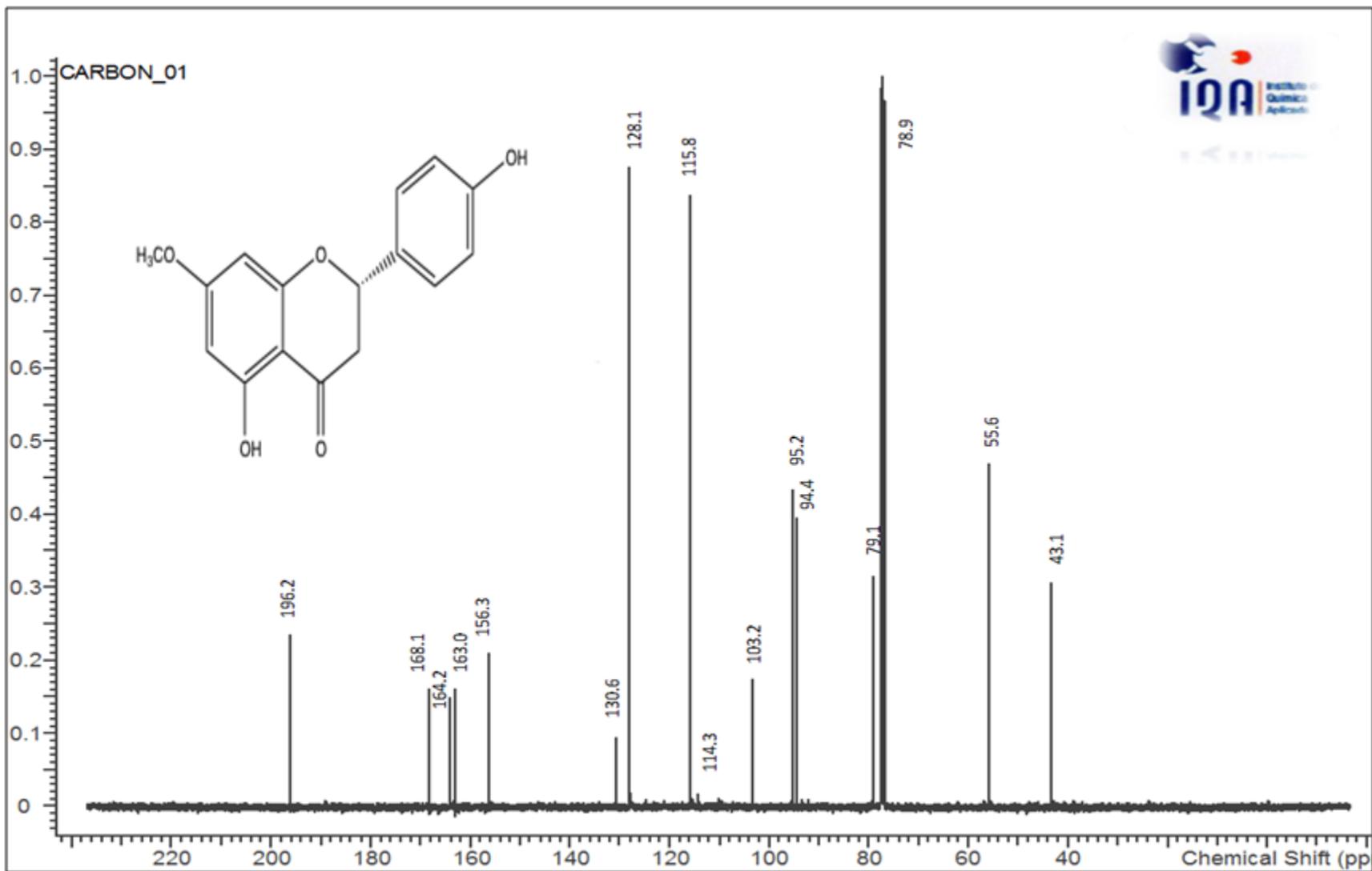
Espectro 1. Espectro GC de 5,4 '-dihidroxi-7-metoxiflavona (C₁₆H₁₄O₅) (1)



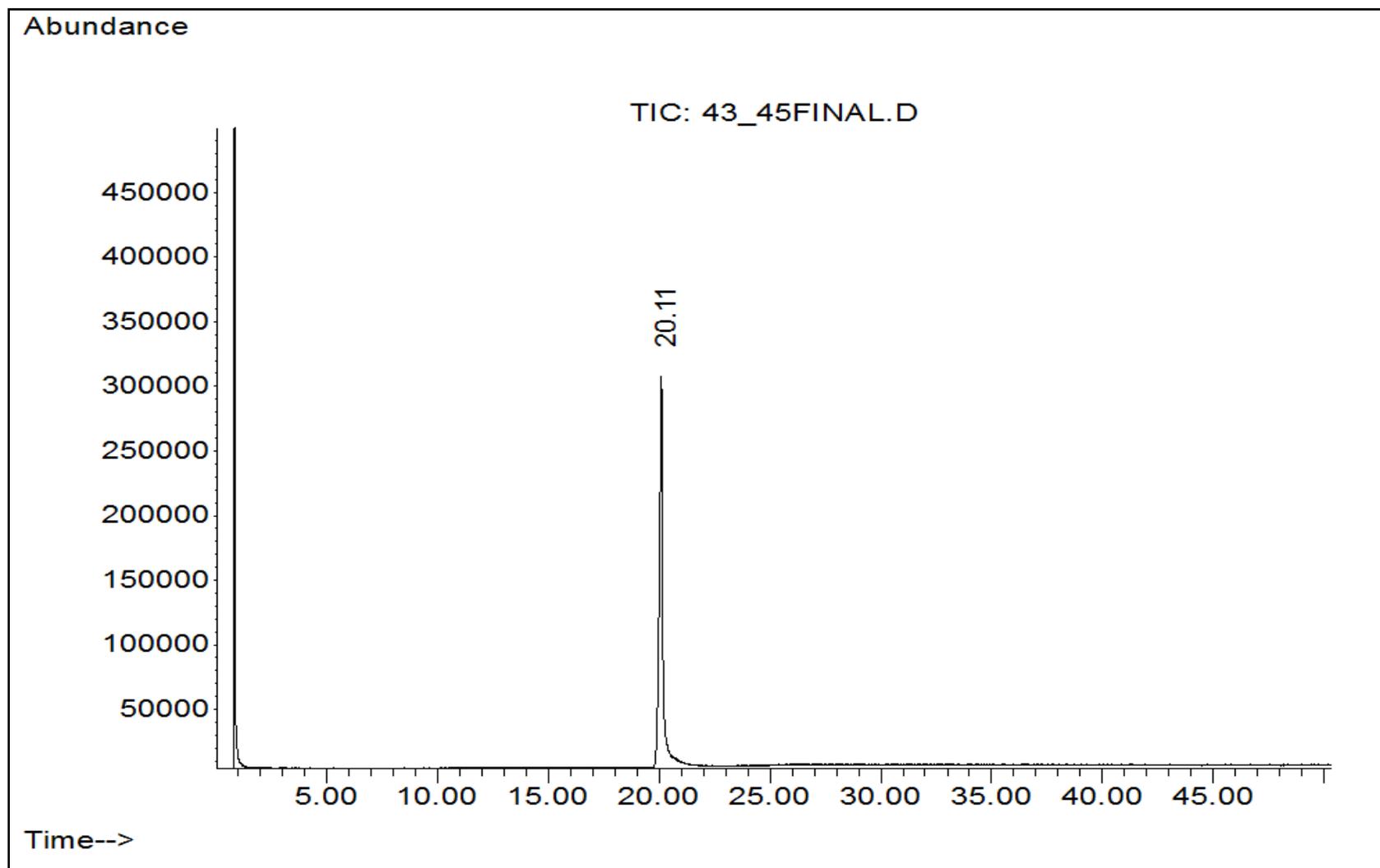
Espectro 2. Espectro de masa de 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona ($C_{16}H_{14}O_5$) (1)



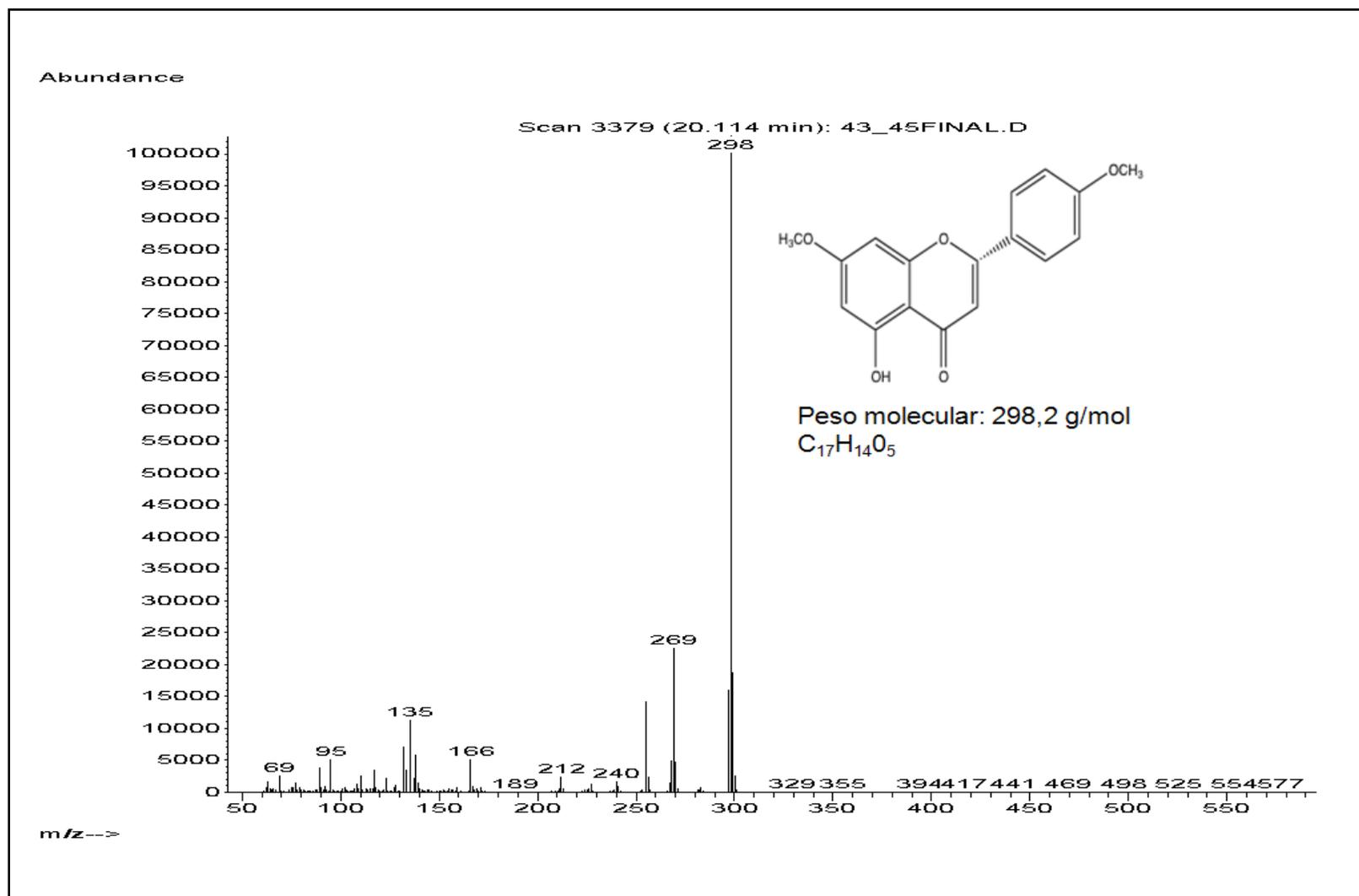
Espectro 3. Espectro de RMN ^1H de 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$)



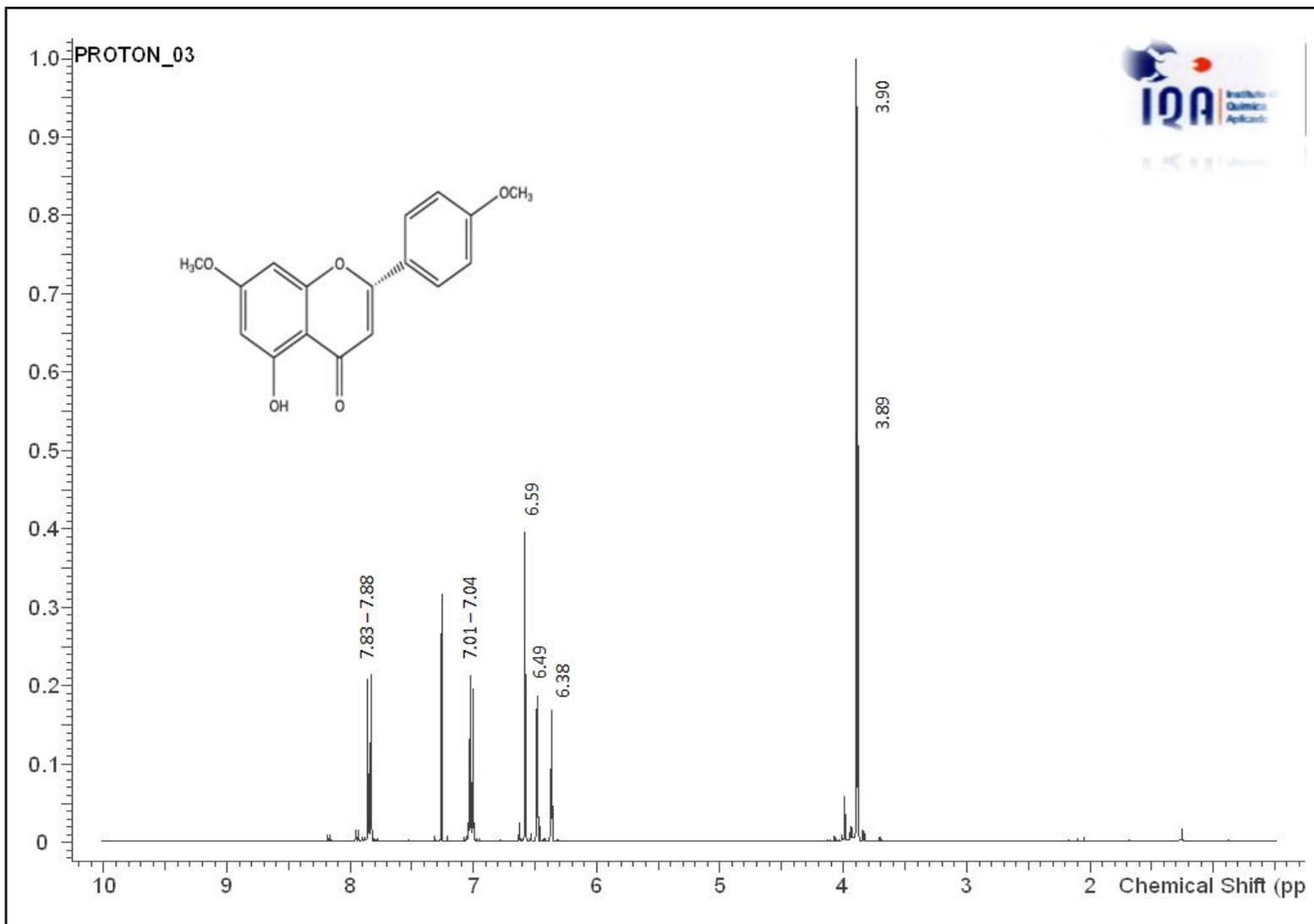
Espectro 4. Espectro de RMN ^{13}C de 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$) (1)



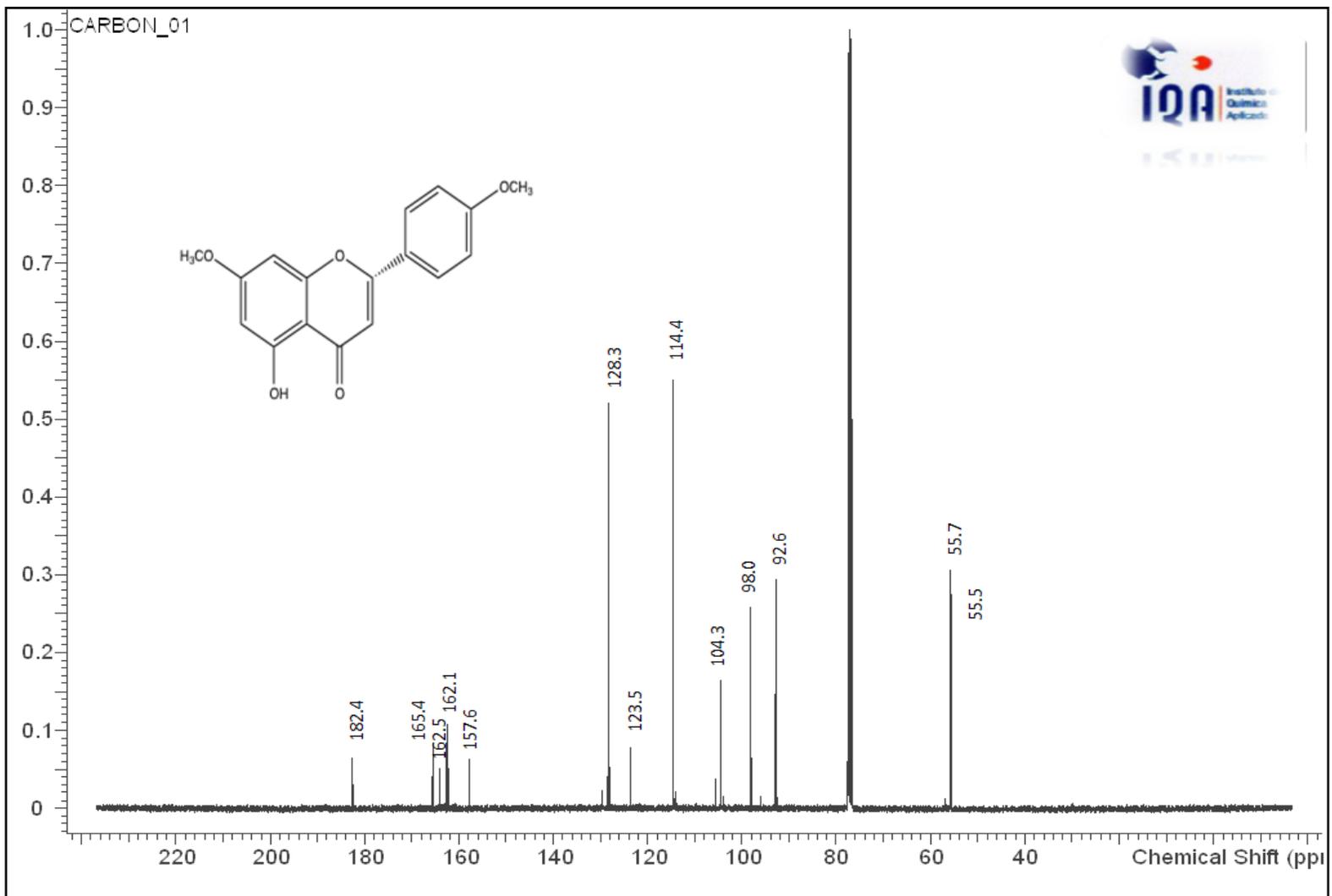
Espectro 5. Espectro GC de 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona (C₁₇H₁₄O₅) (2)



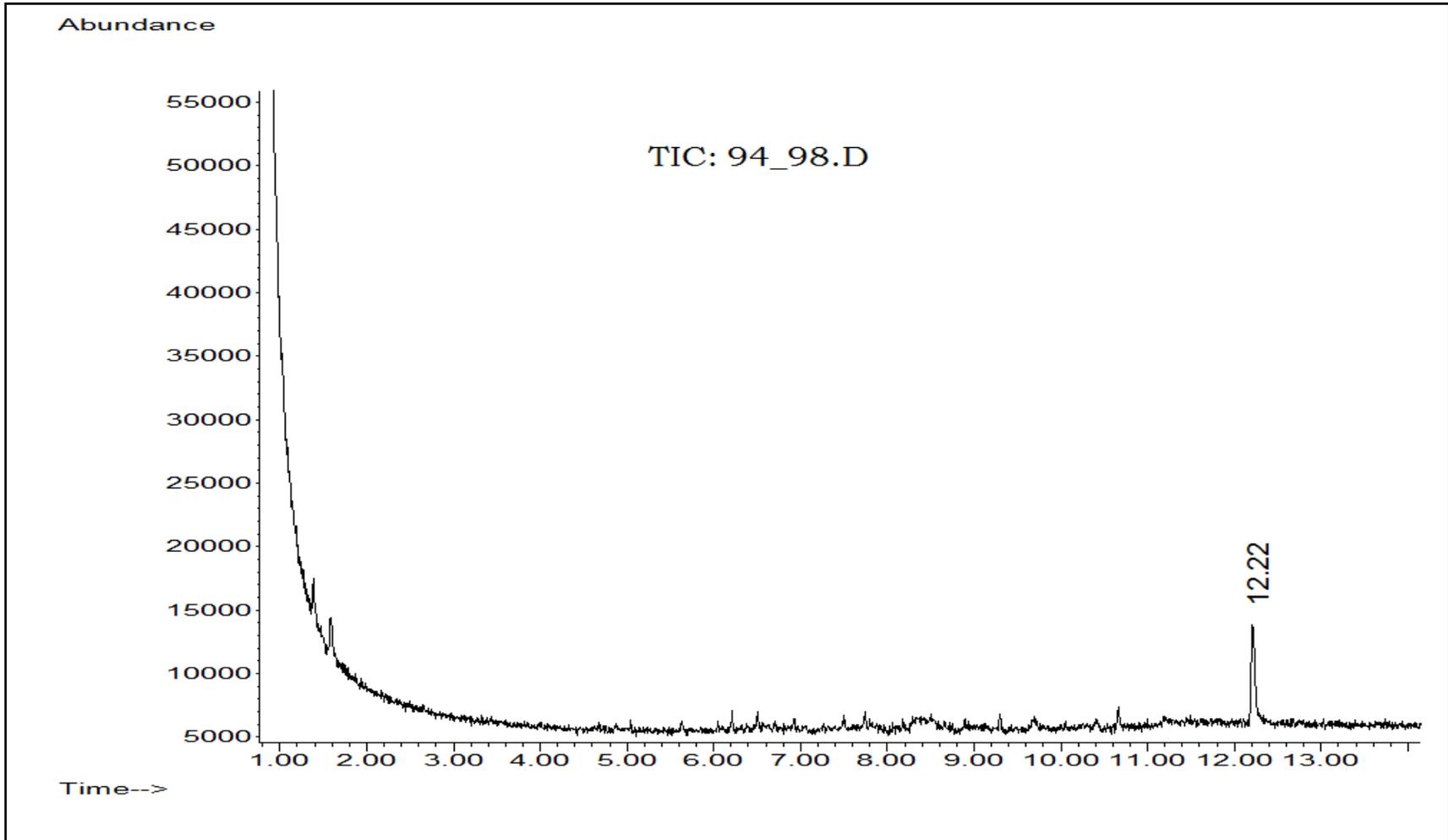
Espectro 6. Espectro de masa de 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona (C₁₇H₁₄O₅) (2)



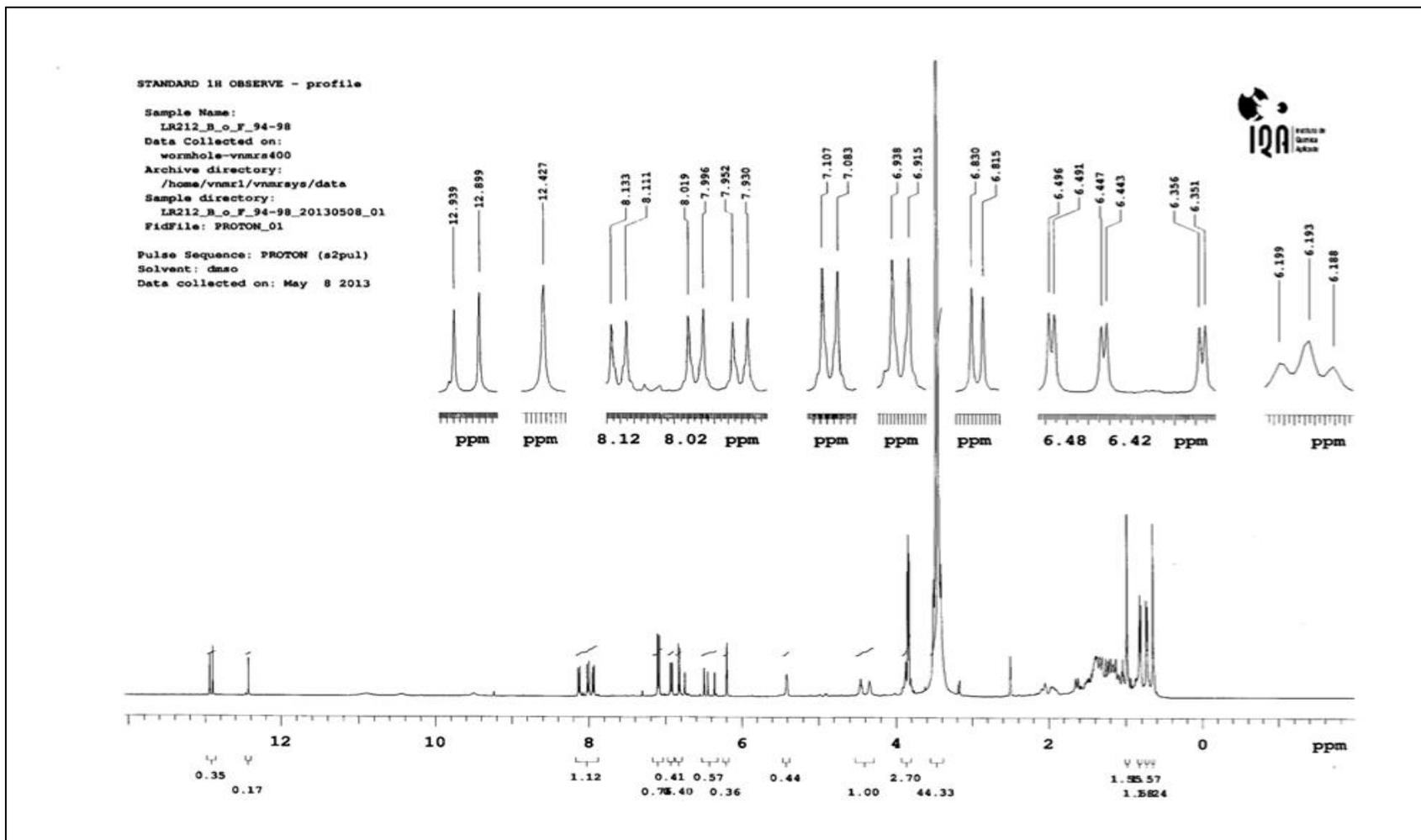
Espectro 7. Espectro de RMN ¹H de 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona (C₁₇H₁₄O₅) (2)



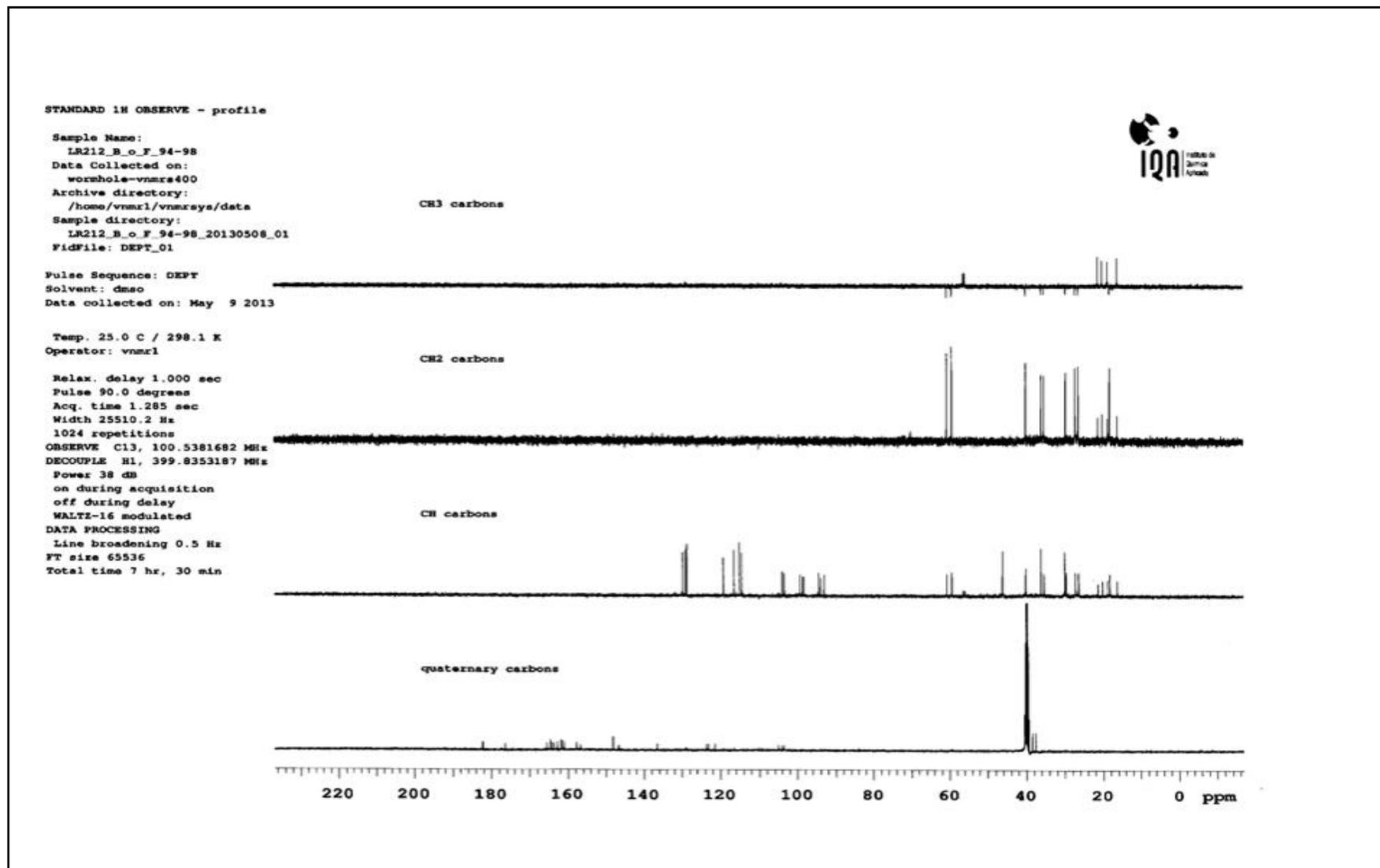
Espectro 8. Espectro de RMN ^{13}C de 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$) (2)



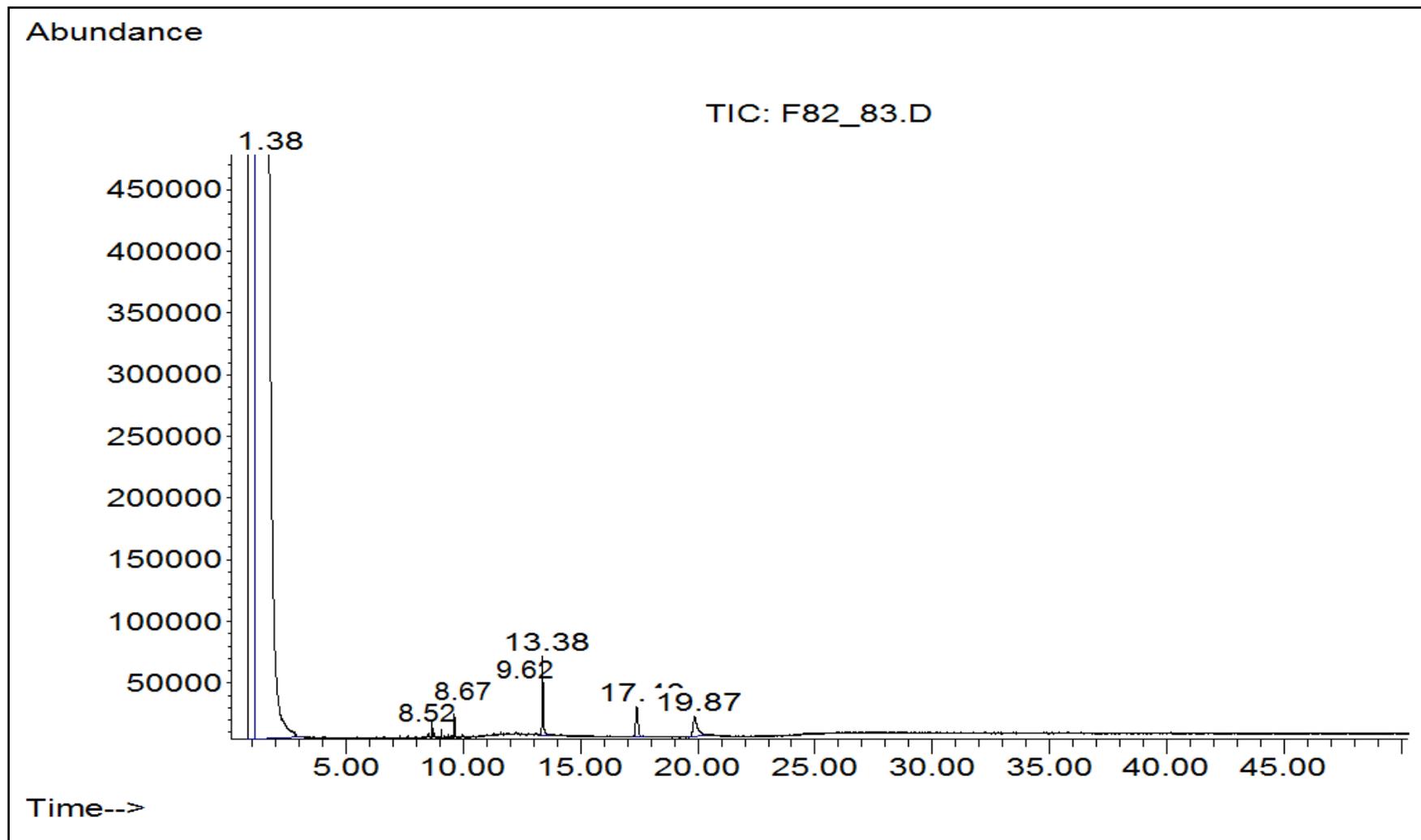
Espectro 9. Espectro GC de la fracción 94-98



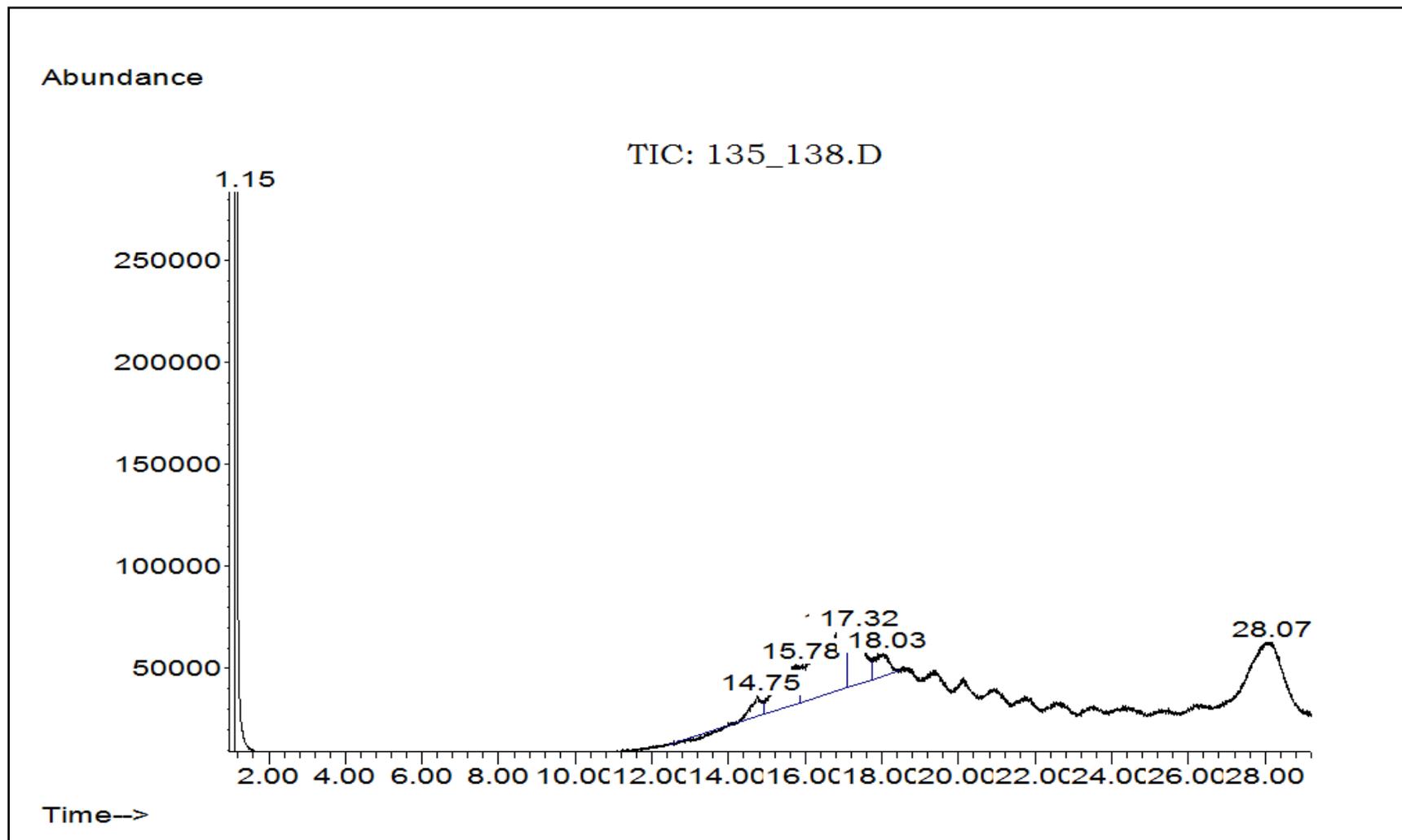
Espectro 10. Espectro de RMN ¹H de la fracción 94-98



Espectro 11. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción 94-98



Espectro 12. Espectro GC de la fracción 82-83



Espectro 13. Espectro de la fracción 135-138

