



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Fraccionamiento bioguiado de *Baccharis usterii* en

búsqueda de los principios activos anti-

Trypanosoma cruzi

Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica

Tiago Pérez

Tutores: *Dr. Javier Varela; Dra. Mercedes González.*



Grupo de Química Medicinal, Laboratorio Química Orgánica.

Facultad de Ciencias - Universidad de la República

Montevideo, Uruguay.

Junio 2017

“sola dosis facit venenum”

La dosis hace al veneno,

Paracelsus.

Resumen

La Enfermedad de Chagas, causada por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es una endemia ampliamente difundida en América Central y del Sur (expandida a todos los continentes por falta de controles de rutina y migraciones humanas), de graves consecuencias a nivel sanitario, económico y social en los países afectados. Esta patología afecta la salud de más de 6 millones de personas a nivel mundial, siendo una enfermedad de carácter crónico difícil de detectar. A más de un siglo de su descubrimiento aun resulta un desafío para la humanidad el hallazgo de fármacos completamente efectivos para su tratamiento. Esta investigación busca posibles nuevos agentes anti-*T. cruzi*, provenientes de una planta medicinal, que puedan proveer tratamientos eficaces y seguros para la enfermedad. Durante este proyecto de investigación se realizó el estudio de la bioactividad frente a *Trypanosoma cruzi* de las partes aéreas de la planta nativa *Baccharis usterii* ("carqueja", denominación que engloba otras especies del genero *Baccharis*). Mediante extracción con gradiente de polaridad de solvente, varias técnicas cromatográficas y obtención de aceite esencial de la droga vegetal *B. usterii* se obtuvieron distintas fracciones de componentes químicos. Los ensayos de actividad antiproliferativa de *Trypanosoma cruzi* permitieron determinar las fracciones con actividad biológica relevante. Con respecto a las fracciones de extractos enteros se obtuvieron valores de CI50 tres veces menores para las fracciones enriquecidas en los componentes activos anti-*T.cruzi*. Aplicando técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (¹H-RMN) fue posible inferir la naturaleza química de los componentes activos siendo estos diterpenos con presencia de grupos aldehídos en su estructura. Los resultados obtenidos fueron acorde a lo esperado según los antecedentes del grupo de investigación donde ya han sido descritos otros diterpenos con grupos aldehídos en su estructura, aislados de plantas del género *Baccharis*, como responsables de la actividad anti-*T.cruzi*.



1. Introducción.....	7
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1.2. Plantas Medicinales	18
1.3. <i>Baccharis usterii</i> (Carqueja).....	22
1.4. Antecedentes	28
2. Objetivos	31
2.1. Objetivo general	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. Procedimientos experimentales	32
3.1. Recolección del material vegetal e identificación botánica.	32
3.2. Preparación de los extractos	32
3.2.1 Extracción con disolvente	32
3.2.2. Obtención de aceite esencial	33
3.3. Fraccionamiento cromatográfico bioguiado.....	34
3.3.1 Técnicas cromatográficas	34
3.3.1.1 Análisis cromatográfico en capa fina	34
3.3.1.1.1 Reactivo de Vainillina.....	35
3.3.1.1.2 Reactivo de Brady	35
3.3.1.1.3 Revelado con UV	35
3.3.1.2 Columna cromatográfica	35
3.3.1.3 Cromatografía preparativa en capa fina	36
3.3.3 Ensayo biológico de actividad antiproliferativa anti-T.cruzi	37
3.4 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	38
4. Resultados y discusión	39
4.1. Extracción con solventes por gradiente de polaridad	39
4.2. Fraccionamiento con cromatografía en columna.....	49
4.3. Fraccionamiento con cromatografía preparativa	54
4.4. Estudio del aceite esencial de <i>Baccharis usterii</i>.....	63
5. Conclusiones y perspectivas	67



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

6. Agradecimientos	71
7. Bibliografía.....	72
8. Anexo	81

1. Introducción

1.1. *Trypanosoma cruzi*

Distintas enfermedades son producidas por protozoarios del genero *Trypanosoma*, en particular, la Enfermedad de Chagas es causada por el *Trypanosoma Cruzi*. A modo de comprender el contexto biológico sobre el cual tiene efecto el principio activo buscado, se estudian las características generales del *Trypanosoma cruzi*.

El género *Trypanosoma* incluye protozoos flagelados pertenecientes al Phylum *Kinetoplastida*. Éstos poseen además del núcleo, un cinetoplasto el cual se integra de aproximadamente un 25% del ADN del parásito (kADN, de kinetoplast en inglés). El cinetoplasto es una red fibrosa de ADN compacto, que en el *Trypanosoma cruzi* está ubicado en el mitocondrion, la única mitocondria que posee y de forma tubular [1].

El cinetoplasto se encuentra en la matriz mitocondrial, presenta interacciones con la membrana interna cercana al cuerpo basal, al cual también se mantiene unido por estructuras filamentosas. Con forma de disco, tiene 1 μm de diámetro y 0,1 μm de espesor. En esta región se ubica el axonema y se origina el flagelo, el cual se extiende en el polo posterior del parásito mientras que el blefaroplasto (corpúsculo basal que forma parte del cinetoplasto, de donde nace el axonema del flagelo) está en el polo anterior [1].

El *T. cruzi* evoluciona durante su ciclo vital adoptando entonces diferentes tipos morfológicos, que se identifican por la posición relativa del cinetoplasto en relación con el flagelo y el núcleo. La forma tripomastigota, forma infectiva del *T. cruzi*, posee el cinetoplasto y el flagelo en situación postnuclear. Además, el flagelo se ve

parcialmente unido a una membrana ondulante y termina en un extremo libre (Figura 1). En la forma conocida como epimastigota el cinetoplasto y la cavidad de donde surge el flagelo están en una posición anterior respecto al núcleo, prenuclear [2].

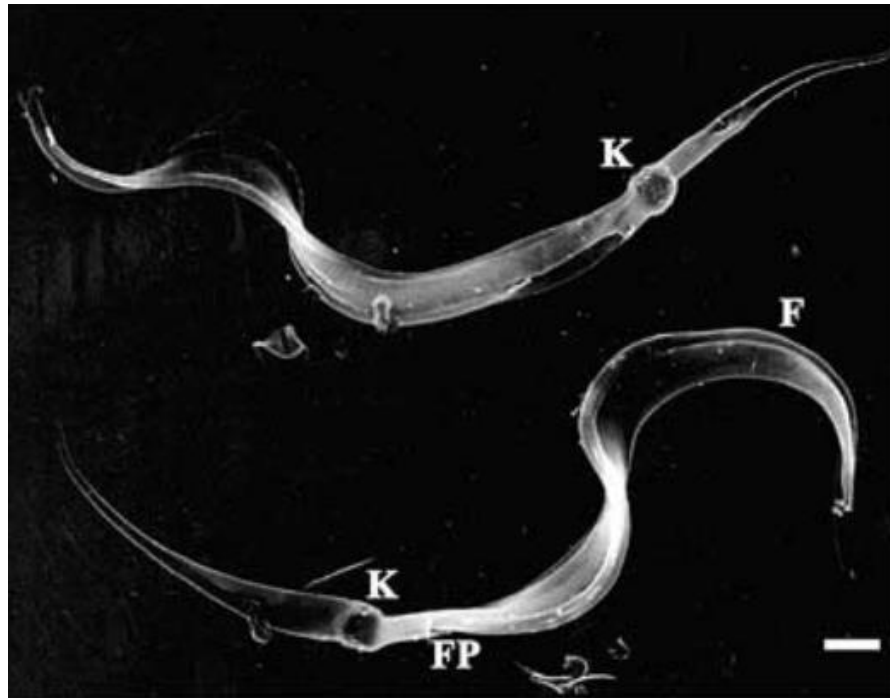


Figura 1. Imagen tomada del artículo “*Visualization of the cytostome in Trypanosoma cruzi by high resolution field emission scanning electron microscopy using secondary and backscattered electron imaging*” donde se observan parásitos de *Trypanosoma cruzi* en estadio tripomastigota. Las letras indican: K - cinetoplasto, F - Flagelo y FP- Bolsillo Flagelar [3].

La forma amastigota es redondeada o subesférica, de pequeño tamaño comparado con los otros estadios y se distingue de éstos por la ausencia de un flagelo externo (o presenta uno muy corto, como se ha observado mediante microscopías electrónicas de contraste de fase), ya que el axonema no emerge por la cisterna flagelar. Los esferomastigotas, similares a los amastigotas, se diferencian de estos por tener un flagelo libre pequeño que se pliega sobre su cuerpo. Algunos autores, definen a la forma amastigota como un tipo de esferomastigota que se multiplican

intracelularmente [2, 4]. En la Figura 2 se puede apreciar una representación esquemática de los distintas formas del *T. cruzi*.

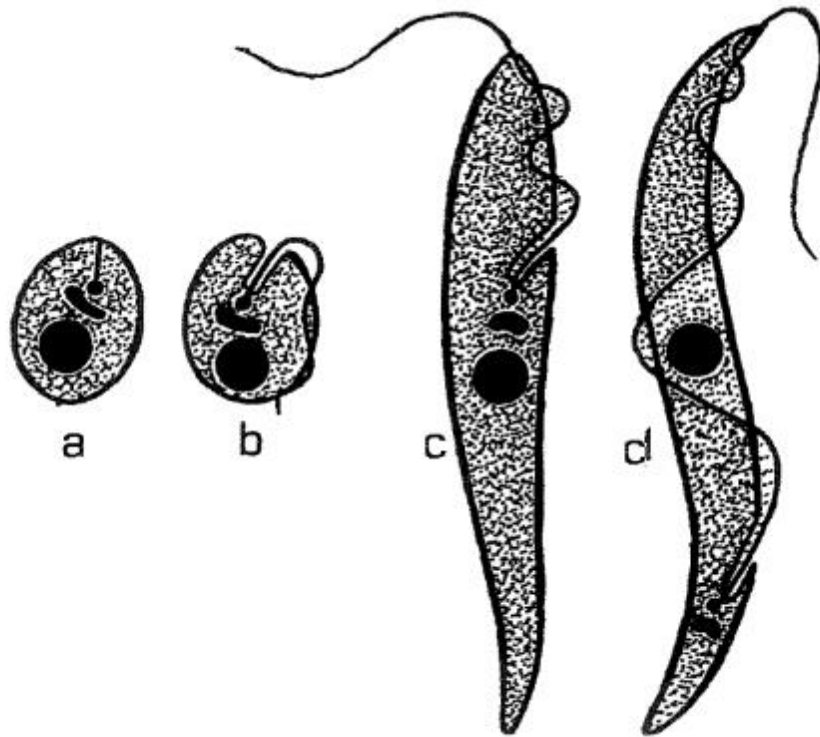


Figura 2 Representación esquemática tomada del libro: "Manual de parasitología: morfolología y biología de los parásitos de interés sanitario" [4]. Se observan las diferentes morfologías de los estadios del ciclo de vida de un *Trypanosoma*: **a** esferomastigota, **b** amastigota, **c** epimastigota y **d** tripomastigota. Se puede apreciar la variación y disposición diferente que adquiere el sistema flagelar del parásito en las distintas etapas de vida.

El *T. cruzi* es el causante de la parasitosis zoonótica llamada "enfermedad de Chagas", la cual está íntimamente relacionada con el ciclo de vida y los portadores del parásito. Esta enfermedad fue descubierta en 1909 por el físico y médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Chagas. El parásito flagelado se transmite de un

sujeto parasitado a otro principalmente por transmisión vectorial aunque puede ocurrir por otras rutas de transmisión como son la transfusional, lactancia, congénita, oral y por trasplante de órganos [5].

Insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (Orden Hemiptera, Familia Reduviidae), género *Triatoma*, son los principales vectores biológicos de esta enfermedad. *Triatoma infestans* (conocido como vinchuca) es el principal ejemplo en América del sur, existiendo también otras especies como *Triatoma rubrovaria* o *Rhodnius prolixus* (principal vector en América central) capaces de transmitir el *T. cruzi* [6].

En el tubo digestivo de la vinchuca los parásitos que ingresan con la toma de sangre contaminada reconocen el cambio de entorno y en el estómago ocurre la fase denominada esferomastigota. Los parásitos que avanzan al intestino medio del hemíptero se ven inducidos a transformarse en epimastigotas, donde se reproducen bajo fisión binaria. En el intestino posterior del insecto pasan al estadio infeccioso tripomastigota metacíclico, mediante el proceso conocido como metaciclogénesis [4, 5]. Se sabe que el estrés nutricional en esta región y posibles interacciones con lectinas de la superficie intestinal desencadenan este proceso adaptativo que permite al parásito ser infeccioso [7]. En la Figura 3 se ve representado el ciclo de vida del parásito incluyendo su etapa dentro del vector como del huésped [8].

Esta etapa del ciclo de vida dura entre 10 a 20 días, tiempo que debe pasar el parásito en el vector para poder transmitir la enfermedad. Debido al factor de que el intestino de la vinchuca es de corto recorrido, es común que defecue durante la ingesta de alimento (sangre), siendo posible que los parásitos liberados con las heces ingresen por la herida que puede ocasionar la picadura o por mucosas

cercanas al sitio de la mordida. Esto se conoce como contaminación a estación posterior y por eso se clasifica al *T. cruzi* en la sección Stercoraria [4].

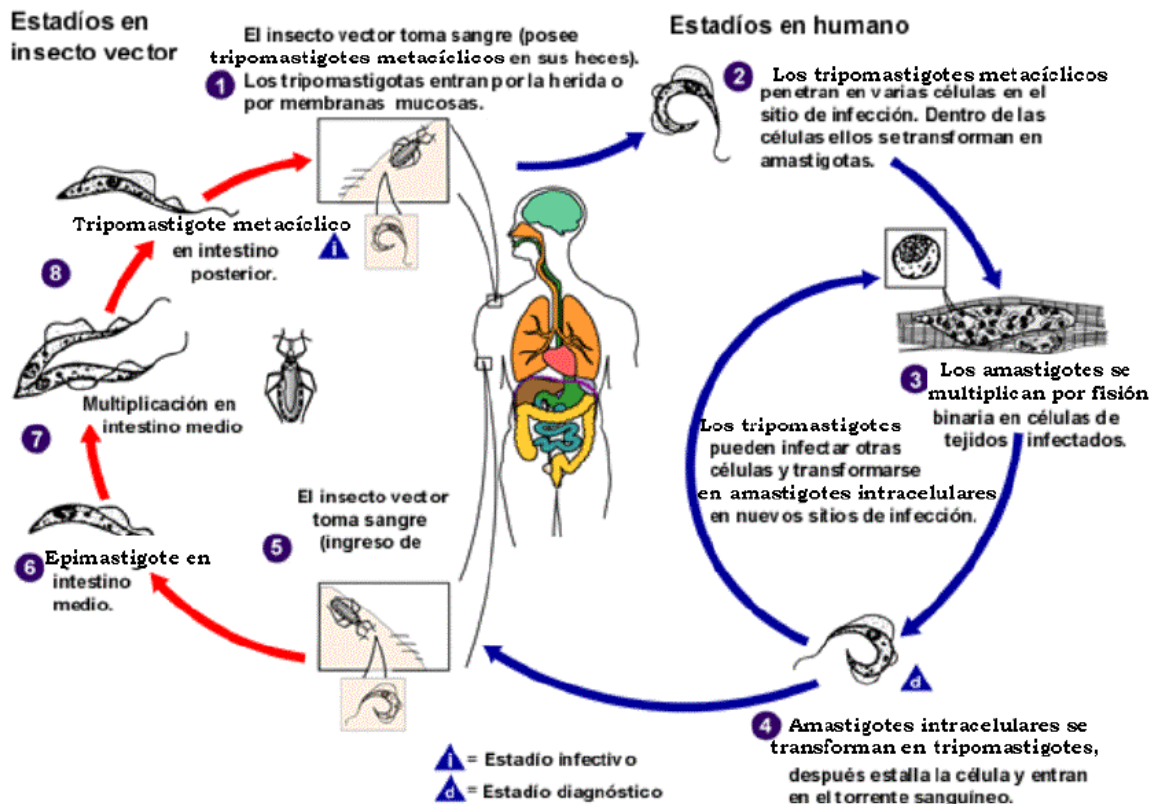


Figura 3 Imagen representativa del ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi*. Se puede observar las etapas del ciclo dentro del vector como dentro del huésped. Tomada de la página del Centro para el control y prevención de enfermedades (Center for Disease control and prevention) del gobierno de Estados Unidos de America (<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>) [9].

Entonces, los tripomastigotas metacíclicos son capaces de penetrar a través de la herida en la piel o mucosas, pasar a las células del sistema fagocítico mononuclear, al torrente circulatorio o linfático y alcanzar los tejidos. Cuando los parásitos ingresan a las células se transforman en amastigotas, se multiplican por fisión binaria hasta que invaden completamente la célula. Se transforman en epimastigota y luego en tripomastigota y se produce el rompimiento de la célula y liberación de los mismos al torrente circulatorio. En esta fase del ciclo, los tripomastigotas pueden ser detectados

mediante un examen en fresco.

Posteriormente, los tripomastigotas pueden infectar otras células y transformarse en amastigotas, con lo cual se cierra el ciclo. Así se producen nuevos tripomastigotas infectivos que pueden invadir nuevas células y viajar por el torrente sanguíneo, estableciéndose ciclos del parásito que caracterizan la fase aguda de la enfermedad y poco presentes en la fase crónica [10].

Debido a la respuesta inmune y producción de anticuerpos, la infección pasa del estado agudo a un estado crónico donde la persona infectada puede llegar a vivir de forma asintomática durante espacios de 10 a 20 años o más, apareciendo signos y síntomas patogénicos en 30% de los infectados. Esta etapa postaguda, se divide entonces en una etapa crónica asintomática, o latente y una etapa sintomática o crónica, específicamente [11].

Los síntomas más graves y frecuentes en la fase crónica afectan a varios órganos y tejidos internos, principalmente el corazón, esófago, colon y sistema nervioso periférico; este último suele afectarse por el daño tisular. La Cardiopatía Crónica Chagásica (CCC), que implica cambios en el electrocardiograma, ruptura de tejidos y consecuencias asociadas a fenómenos de autoinmunidad, es de las causas de muerte más frecuentes en los pacientes afectados. Megaesófago y/o megacolon también son consecuencias graves y comunes de esta enfermedad [12].

Hoy en día se reconoce que para controlar la evolución de la enfermedad es necesaria la eliminación del *Trypanosoma cruzi* del individuo, en contraste con las creencias anteriores donde se consideraba que el origen de las manifestaciones clínicas se debía únicamente a un fenómeno de autoinmunidad [8].

Este tipo de conclusiones son aún poco claras pero derivan de la evidencia de la presencia de parásitos en los órganos afectados, como en el corazón de un paciente que sufre CCC. Si bien el mecanismo por el cual se desarrollan estos síntomas sigue siendo controversial, es al mismo tiempo reconocido el rol de una respuesta autoinmune para el desarrollo de estas patologías, propias de la enfermedad de Chagas [5, 11, 12].

La respuesta inmune desarrollada contra antígenos derivados del parásito puede generar reactividad cruzada de ciertos anticuerpos generados durante la respuesta inmune, mimetismo molecular, contra epítopes presentes en moléculas propias del huésped. La producción de superantígenos; la presencia de entidades moleculares intracelulares reconocidas como DAMPs (miosina, proteínas ribosomales y receptores adrenérgicos son algunos ejemplos) y liberadas al medio celular por la ruptura celular generada en la infección son otras hipótesis que explican la autoinmunidad desarrollada durante esta parasitosis [13].

Actualmente la quimioterapia de la enfermedad de Chagas se basa en la utilización de 2 fármacos, utilizados ya durante 50 años, Nifurtimox (Nfx, N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil) metanimina, Lampit®) y Benznidazol (Bnz, N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida, Rochagan®, Roche, actualmente producido por LAFEPE en Brasil) (Figura 4). Estos fármacos afectan el metabolismo redox del parásito reduciendo las concentraciones de glutatión, tripanotión y glutationil espermidina, debilitando al parásito y provocando su muerte [14].

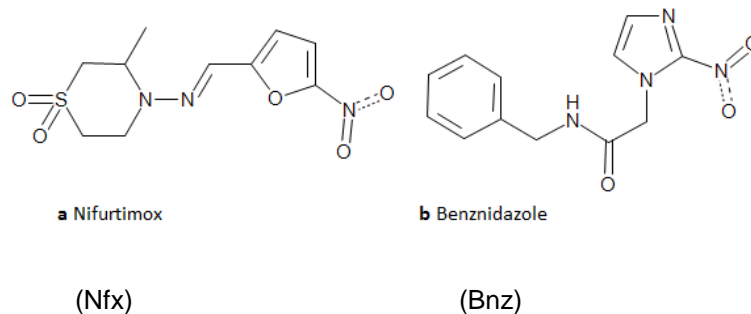


Figura 4 Estructura química de los principios activos de los fármacos comerciales utilizados para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas, en **a** Nifurtimox y en **b** Benznidazol.

Éstos resultan eficaces sólo en la fase aguda de la enfermedad, difícil muchas veces de detectar a tiempo debido a complejidades a la hora de diagnosticar (los síntomas asociados a esta fase son similares a otras enfermedades, de no presentarse un chagoma) o por la falta de facilidades y disponibilidades médicas que asistan y asesoren a la poblaciones más vulnerables [15].

La eficacia de estos compuestos es mayor en los casos de niños, alcanzando cerca de un 100% de efectividad el Nifurtimox en pacientes menores a los 5 años de edad. Para pacientes en fase crónica, hoy en día se recetan los mismos medicamentos obteniéndose resultados positivos mucho más bajo, un 30% de casos curados en pacientes menores de 50 años [5, 14, 15].

Además de no existir actualmente tratamientos y fármacos aprobadas para la fase crónica y completa cura de esta parasitosis, estos fármacos utilizados presentan varias contraindicaciones. Efectos secundarios que puede causar Nfx son pérdida de peso, erupción cutánea, psicosis, leucopenia, neurotoxicidad, neuropatía periférica, alteraciones del tejido, náuseas y vómitos. Por otra lado, Bnz puede provocar edema, fiebre, neuropatía periférica, linfadenopatía, agranulocitosis, púrpura trombocitopénica, erupción cutánea, dolor articular y muscular [14,16].

Para la búsqueda de nuevos fármacos, el desafío se basa en la localización de medicamentos con actividad específica sobre el parásito, ya que la mayoría de las entidades químicas presentan actividad no selectiva y dañan las células del huésped. Debido a esto varias líneas de investigación se han iniciado para entender la biología y metabolismo del parásito, buscando particularidades como enzimas específicas y puntos de control en distintas rutas metabólicas u organelos y estructuras celulares solo presentes en los tripanosomatídeos; que puedan servir de blanco para distintos fármacos [17].

Vale mencionar que el *T. cruzi* presenta seis zimodemas (conjunto de cepas de microorganismos, que comparten el mismo perfil isoenzimático) que se corresponden con los linajes del parásito (TcI-TcVI), actualmente diferenciados por múltiples marcadores genéticos [18]. Esto puede producir que ciertos fármacos y principios activos útiles contra un zimodema no lo sean con otro, al igual que el desarrollo de la enfermedad y las interacciones con el huésped y vector.

El riesgo de transmisión se ha reducido gracias a medidas de control tanto vectorial como en bancos de sangre de América Latina. Desde 1953 se utiliza cristal violeta para la eliminación del parásito en muestras de sangre. Sin embargo, la enfermedad se ha presentado en otras regiones donde no es endémica, debido a las migraciones poblacionales y a que los controles transfusionales no se realizaban antes a nivel mundial. Se han reportado en 17 países no endémicos, más de 100 casos por país. La organización mundial de la Salud (OMS) recomienda controlar todas las rutas de transmisión e integrar a los programas de atención primaria de la salud a los afectados (Figura 5). Se estima, actualmente, que el número de infectados a nivel mundial supera los 6 millones de personas (Mayo 2017) [19, 20].

La domiciliación de los triatóminos, como la vinchuca, es el principal fenómeno de la incorporación del hombre al ciclo de transmisión de la enfermedad. El desplazamiento de los triatóminos a las viviendas desde sus ecotopos naturales (selvas y bosques), ocurre debido a la invasión y acción antrópica en el medio selvático, lo cual redujo las fuentes de alimentos naturales para los triatominos, como mamíferos silvestres. De esta forma, los reservorios domésticos y peridomésticos ubicados en zonas endémicas del vector, generalmente rurales o periurbanas, sirven como fuentes de alimentación, favoreciendo la formación de colonias de triatominos generalmente en casas precarias donde grietas y espacios del hogar poco higienizados pueden servir de nicho [21].

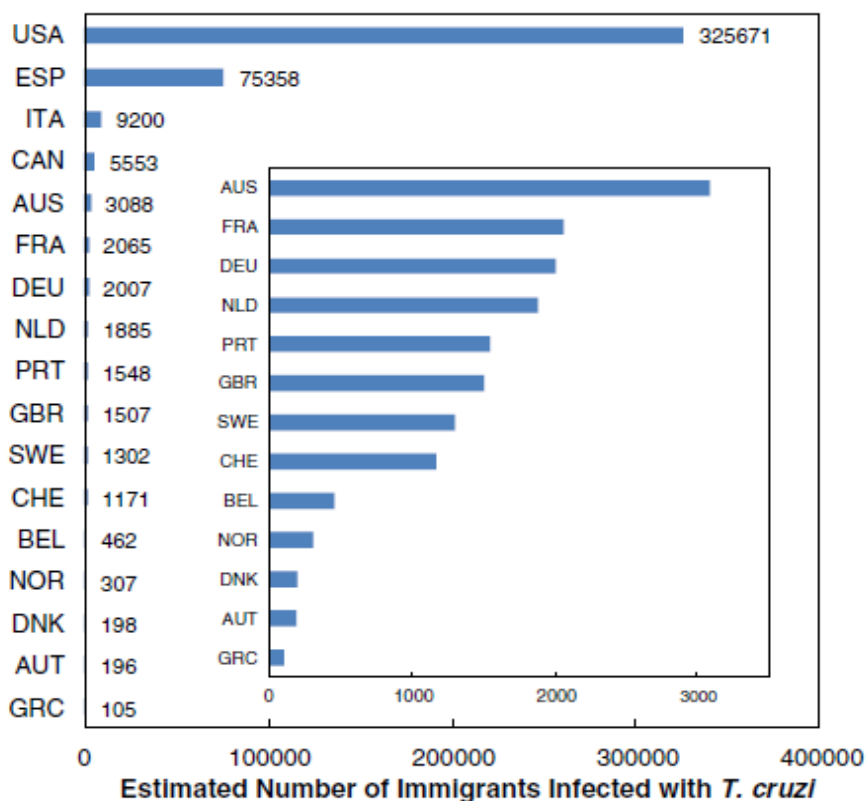


Figura 5 Gráfico tomado del artículo “The History of Chagas Disease” (“La Historia de la Enfermedad de Chagas”). Se muestran los países con más de 100 casos reportados de inmigrantes infectados por *T. cruzi*. En la grafica insertada se observan los países con menos de 5000 casos reportados. Datos anteriores al 2014 [5].

A la enfermedad de Chagas, la leishmaniasis y la tripanosomiasis africana (las tres enfermedades causadas por protozoos tripanosomicos), se las considera enfermedades olvidadas, debido a que los individuos más afectados son de poblaciones pobres de países en desarrollo, estando socioeconómicamente excluidos y, por ende, sin capacidad de pertenecer a los mercados farmacéuticos. Estos datos deberían servir de argumentos sólidos para la inversión y desarrollo de investigaciones y emprendimientos en busca de soluciones para esta parasitosis. En este sentido, la búsqueda de fármacos de origen natural y productos naturales con actividad anti-*Trypanosoma cruzi* puede ser una alternativa económica e interesante para combatir esta zoonosis.

1.2. Plantas Medicinales

Las plantas comparten con el resto de los seres vivos un conjunto de reacciones y ciclos metabólicos, que pueden agruparse bajo el nombre de metabolismo primario. En este se incluyen mecanismos similares para la síntesis y modificación de carbohidratos, proteínas y aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos, con pequeñas variaciones y limitaciones entre todos los seres vivos [22].

A su vez, las diferencias propias y fenotípicas que existe entre los distintos organismos pueden entenderse por la presencia de procesos y rutas metabólicas particulares o menos compartidas. En este sentido se define el concepto de metabolismo secundario que incluyen un extenso mundo de metabolitos secundarios, con muchos de ellos poco distribuidos en la naturaleza y que expresan la individualidad de una especie [22].

Las plantas en particular son muy eficientes en la síntesis de compuestos orgánicos a partir de la fotosíntesis y compuestos inorgánicos presentes en su entorno. En contraste, organismos heterótrofos destinan energía y tiempo en la obtención y degradación de materia orgánica, por ejemplo consumiendo plantas. Esto implica que entre los productos químicos sintetizados por las plantas, muchos de ellos sean con fines defensivos para evitar y protegerse de depredadores [22].

En este sentido, las toxinas resultan ser compuestos biodinámicos que afectan o intentan afectar a determinado ser vivo. Por esta razón, muchos compuestos logran tener una actividad antibiótica, antimicótica, antiparasitaria una vez estudiada la dosis y naturaleza de los principios activos. Otras logran generar efectos que reducen la toxicidad o daño de patógenos, por ser fabricados por la planta para resistir diversos ataques y situaciones de estrés, resaltándose la capacidad antioxidante de muchos

extractos, por ejemplo. Otras funciones de los diversos compuestos químicos presentes en el reino vegetal, son la zoofilia, comunicación inter e intraespecies, adaptaciones ecosistémicas, entre otros [23].

Se denomina principio activo a la entidad/es molecular responsable de determinadas acciones y efectos farmacológicos que posee un medicamento. Entendiéndose por droga vegetal, las plantas medicinales o sus partes, que contengan las sustancias o clases de sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos, preventivos, o como precursores de semisíntesis; luego de los procesos de recolección, estabilización y secado en una forma entera o procesada física y/o químicamente. El reino vegetal, entonces, representa una fuente extensa para la búsqueda de moléculas orgánicas complejas, junto a maquinarias extremadamente eficientes de biosíntesis. Alcaloides, terpenos, esteroides, compuestos fenólicos son ejemplos de estos productos naturales, que integran un recurso renovable, por ejemplo, para la obtención de nuevas moléculas bioactivas con aplicaciones medicinales [22].

El estudio e investigación de las plantas medicinales es un trabajo multidisciplinario que integra a profesionales de áreas como la botánica, biología, bioquímica, toxicología, farmacognosia, fitoquímica, farmacología, química medicinal y medicina. Es un proceso complejo que se inicia en la identificación, selección y extracción del material vegetal; continua con la búsqueda de bioactividad; aislamiento y purificación de los compuestos; elucidación estructural; ensayos preclínicos y clínicos; siendo este un proceso de optimización por el cual el compuesto debe pasar para obtenerse un fármaco eficaz y con buenas propiedades farmacéuticas [10, 24, 25].

Para esto resulta crucial la elección de la especie vegetal a estudiar, existiendo diferentes criterios de selección. Recurrir a la información de los usos etnomédicos

de las plantas y de los tratamientos tradicionales contra distintas patologías, medicina tradicional, es uno de los criterios más útiles e importantes. La utilización de plantas y sus derivados es una de las prácticas culturales más antiguas y se puede acceder a ellas por distintas fuentes bibliográficas o entrevistas durante la investigación [24, 25].

Otros criterios de selección incluyen los conocimientos quimiotaxonómicos de las especies, siendo esta la rama de la taxonomía que estudia las relaciones evolutivas y clasifica las especies biológicas en base a su perfil químico. Trabajos de observación de campo y la recolección aleatoria de especies son también técnicas útiles a la hora de buscar plantas como candidatos medicinales [25].

En este sentido diversas investigaciones y proyectos de I+D por ejemplo se han iniciado en distintos centros de investigación, principalmente en Latinoamérica, buscando productos naturales con actividad tripanosomicida. Respecto a plantas medicinales utilizadas por distintas culturas latinas donde la Enfermedad de Chagas es endémica, cabe resaltar que la mayoría de las prácticas suelen estar dirigidas a mitigar los síntomas de la enfermedad y no la eliminación del parásito. De todas formas varios principios activos han sido detectados en drogas vegetales usadas en base a conocimientos culturales [25, 26].

Se han identificado ciertos tipos de compuestos naturales pertenecientes a familias químicas con distintos niveles de toxicidad. Dentro de las quinonas, naftoquinonas como lapachol, β -lapachona han demostrado actividad tripanosomicida probablemente debido a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) al ser éstas blanco de la tripanotión reductasa (TR, análogo tripanosómico de la glutatión reductasa). Diterpenos como el ICTX (5-epi-icetexona) muestran una buena

actividad, también debido a un mecanismo oxidativo. Esto se debe a que el sistema Tripanotion-Tripanotion reductasa es menos eficiente que el sistema glutatión de eucariotas superiores (equivalente biológico), presentando poca resistencia al estrés oxidativo por parte del parásito [26, 27].

Varios sesquiterpenos (lactonas sesquiterpénicas como dehydrocostus Lactona, zaluzanin D, 10 α -hidroperoxi-guaia-dienos), flavonoides (7,8-dihidroxi-flavona, 3-hidroxi-flavona, rhamnetina, 7,8,30,40-tetrahidroxi-flavona), alcaloides, derivados fenólicos, entre otros, también han sido reportados, afectando otros blancos específicos de *T. cruzi*, como la ruta de incorporación de purinas, cadena respiratoria, bombas ATPasa de membrana, interacciones con el material genético [28, 29].

El estudio de las ciencias en general y de la química medicinal en particular, representa una ventaja evolutiva de nuestra especie, refleja un acto de adaptación y supervivencia procurando aumentar nuestro tiempo y calidad de vida. Desde un punto de vista de ciencia aplicada, el estudio de la química medicinal, farmacognosia y fitoquímica, significa la búsqueda de cómo extraer, purificar, evaluar y utilizar distintos principios activos, presentes en otros seres vivos, capaces de modular efectos fisiológicos, patológicos, psiquiátricos, bioquímicos, etc. Pero además, al considerar el perfil de ciencia básica que este tipo de investigaciones tiene, se puede entender a estas áreas de estudios como una interpretación más de la realidad, observando al entorno como un mundo molecular donde los distintos perfiles químicos y compuestos producidos por las distintas especies y organismos representa una forma más de comprender lo que nos rodea. Resulta un campo de estudio interdisciplinario, integrando conocimientos de distintas disciplinas y áreas del conocimiento humano.

1.3. *Baccharis usterii* (Carqueja).

La especie *Baccharis usterii* (Figura 6) pertenece a la familia de las Asteráceae, que incluye a 1.600 géneros y 23.600 especies diferentes, siendo de los grupos sistemáticos más grandes dentro de las Angiospermas, Eudicotiledoneas. Se la ubica dentro del género más grande dentro de la subtribu *Baccharidinae*, con más de 360 especies diferentes [30, 31].



Figura 6. Fotografía de *Baccharis usterii* ubicada en la localidad de Villa Serrana, Lavalleja (Fotografía tomada por Helena González).

El género *Baccharis* se distribuye desde Estados Unidos al sur de Argentina (90% de las especies en América del Sur), predominando la diversidad de especies en las regiones montañosas de los Andes, principalmente en Colombia y norte de Chile; pero también en el Sureste de Brasil y Uruguay, lo que plantea la hipótesis de que una de estas regiones es donde se originó el género [32, 33].

Las plantas dentro de la Sección *Caulopterae* DC., clasificación infragenérica del género *Baccharis*, se las identifican vulgarmente en distintas regiones de latinoamérica y por distintas culturas, bajo el nombre de “carqueja” [34]. Entre estas se incluyen *B. articulata*, *B. crispa*, *B. gaudichaudiana*, *B. genistifolia*, *B. microcephala*, *B. pennigtonii*, *B. phyteuma*, *B. phyteumoides*, *B. sagittalis*, *B. stenocephala*, *B. trimera*, *B. usterii*. Comparten la característica de ser arbustos o subarbustos pubérulos, glutinosos, con tallos provistos de 2 ó 3 alas longitudinales (*B. genistifolia* no presenta tallos alados, pero sí características florales compartidas) [35].

Las hojas pueden ser normales, tri o penninervadas, o estar reducidas a brácteas pequeñas, cumpliendo las alas la función fotosintética. El género *Baccharis* incluye plantas perennes y dioicas; a excepción de *Baccharis monoica* una especie de México. Las inflorescencias se ubican en capítulos sésiles, dispuestos en glomérulos, que a su vez se reúnen en espigas o racimos; presentando de 10 a 50 flores estaminadas o 25 a 80 flores carpeladas [35].

Baccharis usterii es un subarbusto ramificado de 0,5-1 m de alto, tallos trialados, con alas planas, glabras, continuas y con 0,5-1,5 cm de largo. Dentro de las trialadas (*B. crispa*, *B. gaudichaudiana*, *B. mycriccephala*, *B. trimera*, *B. usterii* y *B. stenocephala* que presenta dos y tres alas), *B. usterii* es la única que posee hojas. Estas tienen

forma ovalada, ápice agudo y cortamente pecioladas, midiendo entre 1,5 a 3 cm de largo. Son trinervadas, siendo la vena media más prominente en la cara abaxial. De todas formas la función fotosintética es realizada tanto por el clorénquima de las hojas y alas del tallo (cladode), que presentan aspectos microscópicos similares [36].

Los estomas son particularmente del tipo anomocíticos, se encuentran en ambos lados de la lámina y no hay estomas anisocíticos o tetracíticos presentes en otras carquejas. Los tricomas son glandulares, se hallan en depresiones epidérmicas y son multicelulares capitados y no capitados. Otra característica diferencial de *B. usterii* es una distribución isobilateral de tejido mesófilo y la presencia de ductos secretorios en la dirección del floema [36].

Los capítulos están dispuestos en ramos especiformes, ordenados en panículas amplias; los involucros de los capítulos poseen 5-6 mm de altura y 3-4 mm de diámetro, con brácteas glabras, agudas [37]. El fruto, denominado Cypselae, es un fruto seco de una sola semilla y en el caso de *B. usterii* presenta pliegues longitudinales [38].

Vale mencionar que ciertos autores han descrito con otros nombres esta misma especie, reconociéndose actualmente a; *B. junciformis* como nombre oficial y *B. trimeroide*; *B. cordata* y *B. usterii* Heering como sinónimos oficiales. Dado que en el área de la química existen más datos reportados para *B. usterii* que para *B. junciformis*, se decide utilizar *B. usterii* para referirnos a la planta [31].

Las plantas de carqueja son usadas en medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, desórdenes hepáticos, anemia, diabetes, diarrea, infecciones, cáncer, gota, reumatismo, úlceras, problemas de la piel entre otros [35,

39]. Así mismo se han reportado actividad antioxidante, similares al Trolox, para *B. usterii*, pudiendo esto explicar sus beneficios contra las afecciones gástricas, probablemente relacionadas a estrés oxidativo del tracto gastrointestinal y sus mucosas [40].

Entre algunos compuestos reportados en el género *Baccharis* se encuentran flavonoides como santonina, absintina, quercetina, genkwanina, luteolina, acacetina, 7,4-dimetil-apigenina, circimartina, salvigenina, jaceidina, jaceosidina, chondrillasterol; diterpenos: de tipo neoclerodano (aticulina I y acetato de articulina) y triterpenos: óxido de baccharis y ácido oleanólico. Este último junto con el ácido ursólico se encuentran formando parte de las ceras epicuticulares, las cuales tienen una importantes función de barrera fisicoquímica que impide la pérdida de agua y el ataque de numerosos agentes agresores [41, 42]. Este último es un componente habitual en la composición de las ceras de varias plantas y ha sido reportada su actividad anti-*Trypanosoma* [30].

Actualmente existen pocas descripciones respecto al perfil químico de *B. usterii*. Se ha reportado un análisis quimiotaxonómico en base al análisis cromatográfico por Cromatografía de gases (CG) y CG/espectrometría de masas del aceite esencial, compuesto de: limoneno, β -elemeno, β -caryophylleno, espatulenol, globulol, epiglobulol y α -cadinol [43]. En otro trabajo se logró la elucidación de seis derivados del ácido quínico (ácidos 3-O-[E]-cafeoilquinico, 5-O-[E]-cafeoilquinico, 4-O-[E]-cafeoil-1-metil-quinico, 4,5-O-[E]-di-cafeoilquinico, 3,4-O-[E]-di-cafeoilquinico y 3,5-O-[E]-di-cafeoilquinico; figura 7), a partir de los extractos acuosos obtenidos de las partes aéreas de *B. usterii* y purificados mediante HPLC-UV-MS/MS (se asocia a estos compuestos una alta actividad antioxidante) [44].

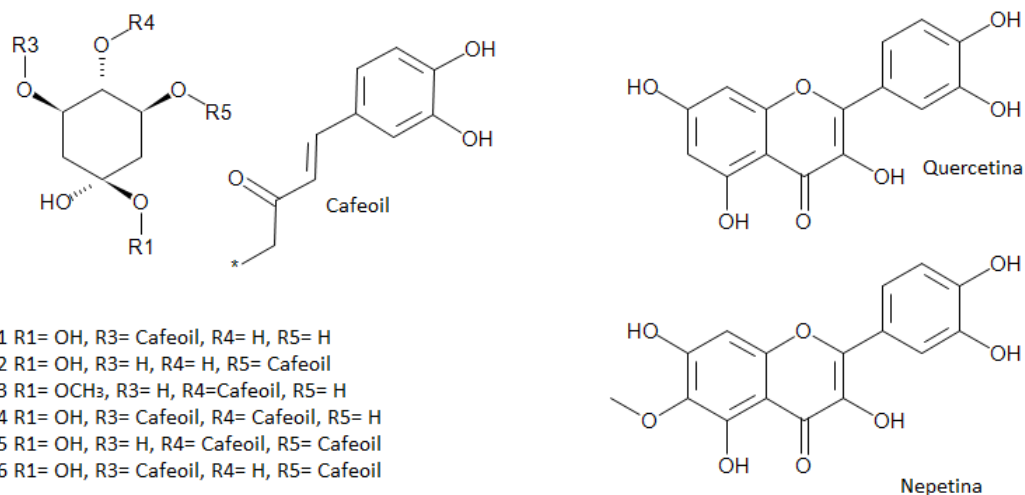


Figura 7 Compuestos fitoquímicos reportados en bibliografía aislados a partir de material vegetal de *Baccharis usterii* [44].

La tesis presentada por el PhD Simone De Oliveira [41] para la obtención de su Doctorado en Ciencias Farmacéuticas, hace un análisis y recopilación de la composición química de especies del género *Baccharis* y resulta ser uno de los pocos trabajos que hace foco en *Baccharis usterii*. En este trabajo se citan diversos artículos donde se reporta información sobre *B. usterii* como una actividad antimicrobiana de la fracción *n*-butanólica frente a cepas gram positivas de las bacterias *S. aureus*, *E. faecium* and *E. faecalis*; en concentraciones de 1000, 200 y 100 µg/ml (con una zona de inhibición del crecimiento similar al control que usaron de ampicilina para el de mayor concentración).

Se plantea una relación de dicha actividad con la presencia de flavonoides y terpenos. En este trabajo también se presenta una comparación de los perfiles

químicos de los extractos acuosos de varias especies de *Baccharis*, resueltos en TLC (placas silicagel 60 GF254, con fase móvil CHCl₃:EtOH:AcOEt (60:40:6, v/v)) y utilizando distintos reveladores. Se destaca una gran cantidad de compuestos fenólicos con distintos R_f y la presencia de tres compuestos terpenoides de carácter polar en *B. usterii*, no detectados en las otras especies estudiadas [39]. El mismo autor logra la purificación de 2 compuestos (Figura 8) con importante actividad antioxidante, de *B. usterii* denominados BuF1 y BuF2 [41]:

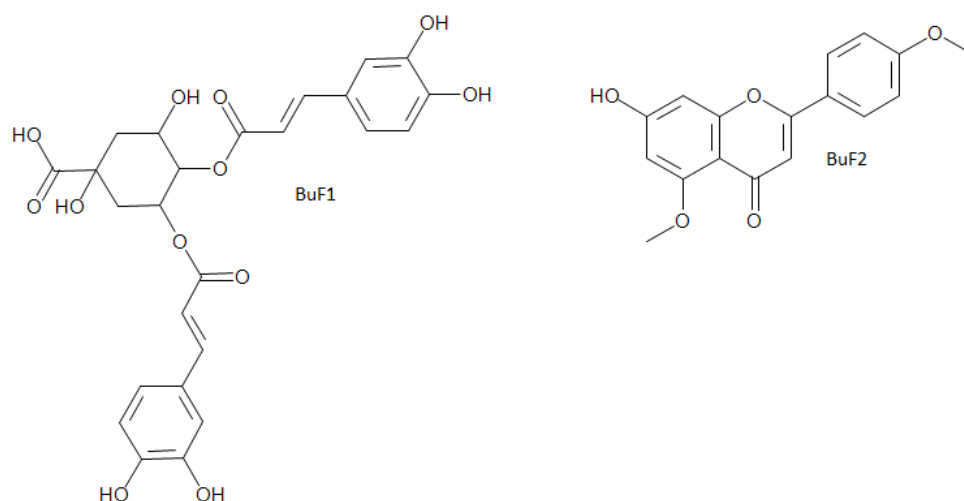


Figura 8 Compuestos fitoquímicos BuF1 y BuF2 reportados en bibliografía aislados a partir de material vegetal de *Baccharis usterii* [41].

Además vale resaltar que ha sido reportada la actividad anti-*T. cruzi* de extractos de los especímenes *Baccharis spicata* y *Baccharis retusa* dentro; siendo una propiedad repetida en el género [45, 46].

1.4. Antecedentes

Este proyecto de tesis se enmarca en el proyecto de investigación y desarrollo (I+D) de agentes anti-*Trypanosoma cruzi* del Grupo de Química Medicinal, Laboratorio de Química Orgánica, de la Facultad de Ciencias. Desde el 2010 se trabaja en la búsqueda, purificación y elucidación estructural de productos naturales con actividad anti-*Trypanosoma cruzi* [16].

Se comenzó con el estudio de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi* del extracto hidro-etanólico de la planta ecuatoriana *Aristeguietia glutinosa* Lam. (Matico). En dicho trabajo se obtuvieron compuestos del tipo diterpeno labdanos eran responsables de dicha actividad [47]. A partir de estos resultados se iniciaron líneas de investigación buscando plantas autóctonas y locales con un perfil farmacológico similar, es decir con propiedades antifúngicas, antibacterial y metabolitos secundarios provenientes de la familia de los labdanos [48, 49].

En este sentido se ha encontrado que las muestras de *Baccharis trimera*, *Baccharis articulata* y *Baccharis usterii* presentan significativa actividad anti-proliferativa de *Trypanosoma cruzi* en más de 80 extractos analizados de plantas autóctonas uruguayas. Se demostró que la actividad citotóxica en células mamíferas de los extractos con relevante actividad biológica era menor que para los parásitos lo que implicaba una selectividad hacia los mismos. Mediante metabolómica por Resonancia Magnética Nuclear se analizaron los cambios en el perfil químico de las plantas y su relación con la actividad biológica o citotóxica encontrándose que aldehídos diterpénicos estaban relacionados con su actividad biológica [49,50].

Para el caso de *B. trimera* se trabajó con el aislamiento de gradiente de polaridad encontrándose que las fracciones de acetato etilo eran las que poseían una mayor bioactividad y selectividad frente a la forma epimastigota de *T. cruzi* [51].

De este trabajo se concluyen puntos importantes de partida para la investigación asociada a esta tesina. Se dedujo que la actividad tripanosomicida y la citotoxicidad se vinculan a distintos componentes químicos, existiendo la posibilidad de separarlos y aumentar el índice de selectividad de una fracción purificada a partir de *B. usterii* [50].

Se encontró que la muestra de mayor actividad biológica se relaciona con señales de ¹H-RMN en 9,32-9,12 ppm [52], por lo que se infiere que son aldehídos diterpenos los principios activos (Figura 8). En las plantas del género *Baccharis* se identificó a diterpenos de tipo ent-clerodano con grupos aldehídos en su estructura como los responsables de la actividad biológica deseada. En cuanto a la citotoxicidad frente a células mamíferas en *Baccharis* spp. se atribuyen los bajos niveles de citotoxicidad a otros diterpenos de tipo ent-clerodano. En el género *Baccharis* se observó una relación directa entre el período de floración y la acumulación de diterpenos aldehídos en las plantas. Otro resultado relevante del trabajo de Javier Varela fue la estandarización del cultivo de *Baccharis usterii*, siendo esto una ventaja para el escalado farmacéutico del principio activo de ser necesario [50].

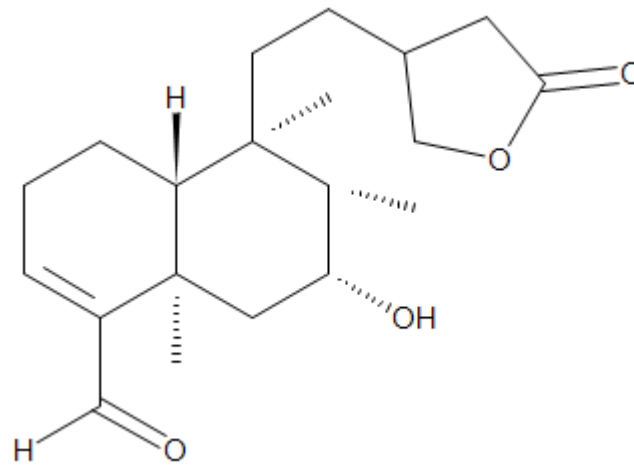


Figura 9 Probable estructura del principio activo presente en *Baccharis articulata* elucidado a partir de técnicas de espectroscopia RMN. Se considera la posibilidad de que el compuesto en búsqueda sea de estructura similar o misma familia química [50].

Estos son los datos que promueven y dan inicio a esta tesina de grado donde se plantea la purificación de los principios activos presentes en *B. usterii* responsables de la actividad tripanosomicida reportada.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Realizar el fraccionamiento bioguiado de *Baccharis usterii* en búsqueda de agentes anti-*Trypanosoma cruzi*.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar el fraccionamiento bioguiado de *Baccharis usterii* utilizando disolventes con gradiente de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo y metanol) y técnicas cromatográficas.
- Evaluar la actividad biológica de las fracciones obtenidas frente a la forma epimastigota de *T. cruzi*.
- Realizar un acercamiento a la caracterización fitoquímica de los principios activos mediante cromatografía en capa fina (TLC) y ¹H-RMN.

3. Procedimientos experimentales

3.1. Recolección del material vegetal e identificación botánica.

La especie estudiada fue colectada por el Dr. Javier Varela en la localidad de Villa Serrana, Minas, Uruguay en 2012 en los meses de Febrero (período de floración), Junio y Diciembre. Las muestras fueron identificadas por el Lic. Eduardo Alonso Paz, profesor de la Cátedra de Botánica de la Facultad de Química. Un ejemplar fue depositado en el Herbario de la Facultad de Química (*Baccharis usterii* – N° 4404).

3.2. Preparación de los extractos

3.2.1 Extracción con disolvente

Para la preparación de los extractos se utilizan las partes aéreas de la planta de dos muestras diferentes, correspondiendo una a la planta en estado vegetativo (hojas y tallos) y la otra a la planta en floración (flores, hojas y tallos). En base a su estado fisiológico se etiquetan las muestras como Hojas (H) para el material en estado vegetativo y Flores (F) en floración.

El material vegetal se lava con H₂O destilada y se realiza el secado en estufa a 50 °C sin contacto con la luz para detener la acción de diversas enzimas, garantizando así la conservación de los componentes de la planta. Una vez seca se somete a molienda, utilizando una tijera y mortero. Posteriormente, se procede a realizar maceraciones sucesivas de 48 h a modo de realizar una extracción por gradiente de polaridad.

Para esto se parte de 50 g del material vegetal seco de Hojas y Flores por separado.

Se realiza una primera extracción con Hexano (500 mL, 48 h, temperatura ambiente) y luego de las 48 h se filtra el material vegetal. Las fracciones obtenidas se conservan y el material vegetal es sometido a una siguiente extracción con Acetato de Etilo (500 ml, 48 h, temperatura ambiente).

Transcurridas las 48 h se filtran las fracciones de acetato (BuH AcOEt, BuF AcOEt) y se realiza una última extracción en MeOH (500 ml, 48 h, temperatura ambiente) del material vegetal. Se nombran las muestras indicando las iniciales de la planta *Baccharis usterii* (Bu), el material vegetal (Hojas o en Floración, H o F) y el disolvente usado (Hexano, AcOEt o MeOH). Los seis extractos (BuH Hex, BuF Hex, BuH AcOEt, BuF AcOEt, BuH MeOH y BuF MeOH) son llevados a sequedad mediante evaporador rotatorio a vacío a una temperatura no mayor a 40 °C.

3.2.2. Obtención de aceite esencial

Para la obtención de aceite esencial de las partes aéreas de *Baccharis usterii* se lleva a cabo una destilación por arrastre con vapor. El mismo consta de un balón de destilación, un cabezal de destilación (al cual se le coloca un termómetro), un refrigerante, un codo de destilación, un recipiente colector y una fuente de calor.

En el balón de destilación se colocaron 10 g de material vegetal en estado de Floración de *Baccharis usterii*, con agua (300mL) y unas piedras de ebullición para asegurar una ebullición controlada. Se coloca el balón con el cabezal de destilación asegurándose de colocar el termómetro a una altura tal que se mida la temperatura del vapor a la salida del cabezal. Cuando el líquido entra en ebullición (aproximadamente 100 °C) se recoge el destilado en el recipiente colector, dejando destilar durante cuatro horas.

Posteriormente se procede a realizar una repartición del destilado agregando en un embudo de decantación el mismo (100mL) y una fase inmiscible en agua de Dietil Éter (30 mL). Se agita y deja decantar los líquidos en el embudo. Se procede a separar la fase orgánica de la acuosa y se repite el procedimiento otras 3 veces más. De esta forma se realiza un reparto de los compuestos orgánicos presentes en el destilado, pudiendo recolectarlos en la fase orgánica.

Finalmente se descarta la fase acuosa del reparto realizado y la fase orgánica es llevada a sequedad mediante evaporador rotatorio a vacío a una temperatura no mayor a 40 °C. Se obtiene así el aceite esencial de *Baccharis usterii*, formada por los compuestos volátiles de ésta.

3.3. Fraccionamiento cromatográfico bioguiado

3.3.1 Técnicas cromatográficas

3.3.1.1 Análisis cromatográfico en capa fina

Para la caracterización fitoquímica de las fracciones obtenidas se procede a la utilización de cromatografía en capa fina (TLC, del inglés, Thin Layer Chromatography). Para la preparación de las muestras a sembrar se utilizó siempre una concentración aproximada de 1 mg/mL, disolviendo la muestra en Acetona. La fase estacionaria se trató de una de marca comercial (de Marcherey-Nagel, TLC POLYGRAM® Alox N/UV 254) a base de sílica y como fase móvil se usaron mezclas de distintas proporciones de los disolventes Hexano:CHCl₃:AcOEt (1:1:1, 1:2:1, 1:4:1, 4:1:1). Se utilizaron como reveladores: luz UV 254 nm, revelador Vainillina para

detectar componentes terpenoides y el revelador Brady que permite identificar aldehídos y cetonas.

3.3.1.1.1 Reactivo de Vainillina

Para la preparación del reactivo se mezcla 1 g. de Vainillina en 4 mL de HCl y en 5 mL de H₂SO₄. Se lleva a un volumen final de 100 mL con metanol. Se tiñen las placas y posteriormente se calienta en la estufa a 110 °C durante 15 minutos. Vainillina revela en tonos violáceos y rojos en presencia de terpenoides.

3.3.1.1.2 Reactivo de Brady

El reactivo de Brady se prepara disolviendo 3 g de 2,4-dinitrofenilhidrazina en 15mL de ácido sulfúrico concentrado. Se añade esta solución a 20mL de agua y 70mL de etanol al 95%, agitando continuamente; finalmente se filtra. Para su utilización se aplica el reactivo sobre la capa cromatográfica y se deja reaccionar por 15 min aprox.

3.3.1.1.3 Revelado con UV

Se utiliza luz UV 254 nm como método de revelado para la identificación de grupos enona o dienos en las moléculas de interés. Esta técnica se basa en la fluorescencia de ciertos grupos orgánicos (vinculados a estructuras con dobles enlaces, grupos aromáticos, compuestos α y β conjugados, entre otros) presentes en las moléculas al incidir sobre ellas una onda electromagnética perteneciente a la región del UV del espectro electromagnético.

3.3.1.2 Columna cromatográfica

Para la preparación de la columna cromatográfica se procede a empaquetar una columna de vidrio con sílica gel. Por otro lado se realiza la preparación de la muestra disolviendo está en CHCl₃ y agregando 1/20 de sílica de columna. Dicha mezcla se procede a evaporar a vacío hasta sequedad de forma que todo el compuesto se encuentre adsorbido a la sílica y en textura seca.

Se agrega la muestra con sílica por la parte superior de la columna y se compacta la muestra. Manteniendo la llave de flujo cerrada de la columna se usa el disolvente más apolar a utilizar en la corrida para el empaquetamiento. Para esto se coloca el disolvente y se deja sedimentar la sílica. Pasado al menos media hora se procede a realizar la separación cromatográfica propiamente dicho.

Se decide realizar la cromatografía en columna utilizando un gradiente de polaridad creciente de mezcla de disolventes (9:1; 4:1; 4:1:1; 1:1:1; 1:1:4; Hex:AcOEt:CH₃Cl; y EtOH). Se hacen pasar las distintas fases móviles de forma consecutiva separando las diferentes fracciones eluidas con cada fase móvil. Finalmente se seleccionan las fracciones a conservar sílica y son llevadas a sequedad mediante evaporador rotatorio a vacío a una temperatura no mayor a 40 °C. Se logran separar 9 fracciones de interés. Estas son analizadas mediante TLC y evaluadas en el ensayo biológico con *T. cruzi*.

3.3.1.3 Cromatografía preparativa en capa fina

Aquellas fracciones que presentan la mayor actividad biológica son sometidas a cromatografía en capa fina preparativa de sílica gel (Merck, 60-230 mesh) 20 x 20 cm para la purificación de los principios activos. La utilización de esta técnica requiere la previa preparación de las placas. Para esto se debe disolver la sílica en polvo (como se comercializa) en agua agitando bien la mezcla y una vez homogénea esparcirla sobre la placa de vidrio limpia. A partir de esta práctica, se llegó a encontrar una proporción óptima de 100 mL de agua cada 130 g de sílica, alcanzando para la preparación de 4 a 6 placas, dependiendo del grosor deseado. La placa se deja secar por al menos 24 hs, siendo útil secarlo en estufa a más de 60 °C por 15 min.

Se utiliza como fase móvil mezclas de distintas proporciones de los disolventes Hexano:AcOEt:CHCl₃ (1:1:1, 1:1:1, 0:1:4:, 4:1:1). Las bandas de interés a separar se raspan de la placa cromatográfica de forma selectiva. Se utilizan los mismos reveladores que para TLC (Vainillina, Brady y luz UV). Una vez aisladas las bandas se debe lavar la fase estacionaria de forma de liberar el compuesto adsorbido. La forma más efectiva para dicho proceso resultó utilizar embudos Buchner y Kitazato para filtrar a vacío.

3.3.3 Ensayo biológico de actividad antiproliferativa anti-*T.cruzi*

Cultivos de *T. cruzi*: Epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2, se cultivan a 28 °C en medio axénico constituido por una infusión cerebro-corazón (33 g/L), triptosa (3 g/L), hemina (0,02 g/L), *D*-(+)-glucosa (0,3 g/L), estreptomycin (0,2 g/L) y penicilina (200000 U/L) complementado con 10 % de suero bovino fetal. Todos los cultivos, así como todos los ensayos se realizan en condiciones de aerobiosis. En todos los ensayos se trabaja con parásitos en fase exponencial de crecimiento (se utilizan cultivos de 5-7 días de crecimiento, partiendo al día 0 de un repique de 5 millones de parásitos/mL). Ensayo: Se prepara una suspensión de parásitos a una concentración de 4 millones de células/mL y se inocula 0,6 mL/pocillo en una placa de 24 pocillos. Las fracciones a evaluar se preparan en una solución stock de DMSO (solución madre de 12 mg/mL) y se agregan inmediatamente a cada pocillo para dar concentraciones decrecientes (100, 50, 25 µg/mL). Los parásitos son incubados con las fracciones a 28 °C por 5 días.

El crecimiento de los parásitos se sigue midiendo el incremento de absorbancia a 610 nm, la cual es proporcional al número de células [53]. El porcentaje de inhibición

del crecimiento del parásito se calcula de acuerdo a: $\% = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} \times 100$, donde A_p es A610 del cultivo conteniendo el compuesto al día 5; A_{0p} es A610 del cultivo conteniendo el compuesto inmediatamente luego de la adición del compuesto (día 0); A_c es A610 del cultivo en ausencia de compuesto (control negativo) al día 5; A_{0c} es A610 en ausencia del compuesto al día 0.

La CI_{50} corresponde a la concentración de extracto o fracción capaz de provocar un 50 % de inhibición de crecimiento. Esta se determina al graficar log (concentración) vs. % Inhibición de crecimiento, ajustando los puntos a una curva Sigmoidea de Boltzmann. Todos los resultados obtenidos son la media de por lo menos tres experimentos independientes.

3.4 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se realizan a 22,16 °C en un equipo Bruker DPX-400 que trabaja con el programa Topspin® 1.3. Las muestras se preparan en 0,6 mL de $CDCl_3$ (0,05 % de TMS como referencia interna) principalmente, trabajando con MeOD como disolvente en algunos casos (Metanol deuterado con TMS). Los espectros son procesados usando el programa MestRe-C NMR. Cada espectro 1H-NMR consiste de 64 escanes que requieren 10 min y 26 s de tiempo de adquisición con los siguientes parámetros: 0,16 Hz/punto, ancho de pulso (PW) = 30° (11,3 ms), y tiempo de relajación (RD) = 1,5 s. Una secuencia de pre-saturación se utiliza para suprimir la señal de H_2O residual con baja potencia de irradiación selectiva a la frecuencia de H_2O durante el retardo de reciclaje. Se aplica transformada de Fourier sobre FIDs con LB = 0,3 Hz. Se realiza corrección de fase y línea de base de forma manual sobre los espectros resultantes, y se hace referencia a TMS estándar interno a 0,0 ppm, utilizando el software MestreNova versión 6.0.

4. Resultados y discusión

4.1. Extracción con solventes por gradiente de polaridad

Se realizó el fraccionamiento bioguiado de los extractos preparados a partir del material vegetal de *Baccharis usterii* (material aéreo en estado vegetativo “Hojas” y en estado de floración “Flores”), utilizando disolventes de polaridad creciente (Figura 10), Hexano (Hex), Acetato de Etilo (AcOEt) y Metanol (MeOH). Se aprecia que el rendimiento de extracción (Tabla 1) es superior en las fracciones de polaridad media a alta, fracciones Acetato de Etilo (cerca al 12 %), seguida por las fracciones Metanol (cerca al 10 %) y por último las fracciones Hexano (cerca al 0,5 %).

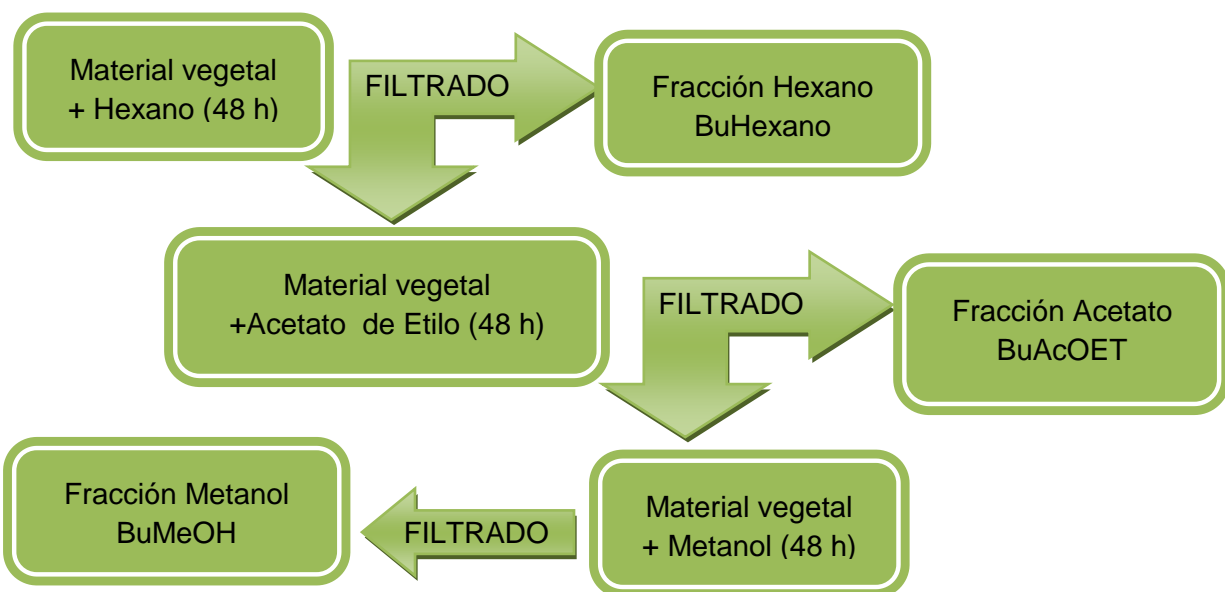


Figura 10 Esquema del procedimiento de extracción utilizado para la purificación de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi* en *Baccharis usterii*.

Se nombraron las muestras indicando las iniciales de la planta *Baccharis usterii* (Bu), el material vegetal (Hojas o en Floración, H o F) y el disolvente usado (Hex, AcOEt o MeOH); ejemplo, la fracción obtenida de Hojas con Metanol corresponde a BuHMeOH.

Tras perder toda traza de disolvente los extractos de Hexano tienen un aspecto pálido de color marrón claro translúcido y con textura grasosa, debido a la extracción de compuestos apolares posiblemente en su mayoría de origen lipídico. Los extractos realizados con Acetato de Etilo resultaron más oscuros y con presencia de estructuras cristalinas, coherente con la extracción de polaridad media donde posiblemente se encuentren compuestos ácidos o con presencia de oxígenos que les permita interacciones intermoleculares más favorables y así alcanzar un orden de carácter cristalino y no amorfo. Específicamente, el extracto BuHAcOEt resultó de un color marrón ambar poco translucido mientras que el extracto BuFAcOEt es de una tonalidad amarillenta oscura, indicio de posible presencia de flavonoides (del latín *flavus*, "amarillo", sintetizados por la planta generalmente para reducir el daño por exceso de radiación UV), también poco translúcida y casi sólida. Por otro lado los extractos de Metanol resultaron opacos de color verde oscuro y consistencia fluida y aceitosa, siendo un solvente de carácter general la diversidad de compuestos presentes presumiblemente sea mayor lo que dhh76r4

Tabla 1. Datos de los extractos de *Baccharis usterii* y de su actividad antiproliferativa frente a epimastigotas de *T. cruzi*.

Muestra	Masa extracto (g)	Rendimiento de extracción (%)	CI ₅₀ ^a (µg/ml)	σ ^b
BuHHex	0.27	0.47	40.4	2.1
BuFHex	0.24	0.49	34.1	1.8
BuHAcOEt	5.27	9.19	85.2	1.6
BuF AcOEt	7.29	14.62	80.9	3.2
BuH MeOH	6.33	11.05	>100	-
BuF MeOH	4.02	8.06	>100	-

^a IC₅₀ concentración que inhibe el 50% de crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi* cepa Tulahuen 2 ^b. s desviación standard del promedio de tres repeticiones

Las fracciones obtenidas fueron evaluadas frente a la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*, con el fin de evaluar en qué extracto se encuentra la mayor actividad biológica y por ende la mayor acumulación del principio activo. Se apunta a la utilización del bioensayo como guía para la purificación del compuesto responsable de la actividad de inhibición. Se toma como referencia la clasificación, utilizada en la tesis de Doctorado de Javier Varela, de las concentraciones que inhiben el 50 % de crecimiento de *T. cruzi* (CI₅₀ (µg/mL)) para referir a la calidad de la actividad anti-*T. cruzi* de las muestras; como se muestra en la Tabla 2 [50].

Tabla 2 - Categorización según capacidad de inhibición del crecimiento de *T. cruzi*.

Actividad anti- <i>T. cruzi</i>	CI ₅₀ (µg/mL) ^a
Excelente	< 10
Relevante	10 < CI ₅₀ < 40
Buena	40 < CI ₅₀ < 100
No interesante	> 100

^a Concentración que inhibe el 50 % de crecimiento de *T. cruzi*

Se observó que los extractos que presentan mayor actividad son los Hexánicos, que reúne los componentes más apolares (CI₅₀ “Relevante”, cercana a los 40µg/ml). Por el contrario, los extractos metanólicos, enriquecidos en componentes más polares, no presentaron actividad antiproliferativa en las concentraciones de trabajo, (dosis máxima evaluada: 100 µg/mL). Los extractos de Acetato de Etilo presentaron una actividad “Buena” de un CI₅₀ mayor a los hexánicos, próxima a los 80 µg/mL. Estos resultados sugieren que los compuestos responsables de la actividad biológica sean de naturaleza apolar (lípidos, compuestos volátiles, ceras, entre otros), como los terpenos y sesquiterpenos a los cuales se les han atribuido relevante actividad tripanosomicida [26-30].

Es posible considerar una repartición del principio activo, entre los extractos hexánicos y de Acetato de Etilo, debido a una polaridad muy baja de este pero no nula y/o considerar la presencia de distintos compuestos como responsables de la bioactividad tripanosomicida. En consecuencia se descartan todos los compuestos de polaridad alta que se encuentran en *Baccharis usterii* como responsables de la actividad biológica observada.

Comparando los extractos de los distintos materiales vegetales de partida, “Hojas y Flores”, es posible distinguir una mayor actividad en los hechos con las flores de *Baccharis usterii*. Además es interesante resaltar que el rendimiento de extracción del extracto con Acetato de Etilo es mayor que el metanólico para la droga en floración pero no así para el material en estado vegetativo (Tabla 1). Esto puede indicar una mayor concentración del principio activo en las partes aéreas de la planta cuando se encuentra en estado de floración, no necesariamente en las flores. Cabe destacar que en el trabajo previo se hacía referencia a este hecho para especies del género *Baccharis* [50].

Para observar el perfil fitoquímico de los extractos, éstos se sembraron y corrieron en cromatografías de capa fina (Figura 11 y 12) con una fase móvil 1:1:1 Hexano:AcOEt:CHCl₃. El revelado con Vainillina es poco específico pero permite la identificación de la presencia de diversos compuestos al darles diferentes tonalidades de colores. El revelado en tonos violáceos sugiere la presencia de compuestos terpenoides de variada naturaleza química, motivo por el cual se lo utilizó. Por otro lado la reacción con el revelador Brady, indica la presencia de grupos cetónicos (en tonos anaranjados) y/o aldehídos (en tonos amarillo intenso).

Basado en los antecedentes del trabajo mencionados, el principio activo es un compuesto con al menos un grupo funcional aldehído en su estructura y naturaleza terpenoide. Es de esperar que el compuesto de interés revele en tonos violáceos al usar Vainillina y amarillo intenso con Brady. También se utiliza luz UV 254 nm como método de revelado para la identificación de grupos enona o dienos en las moléculas de interés.

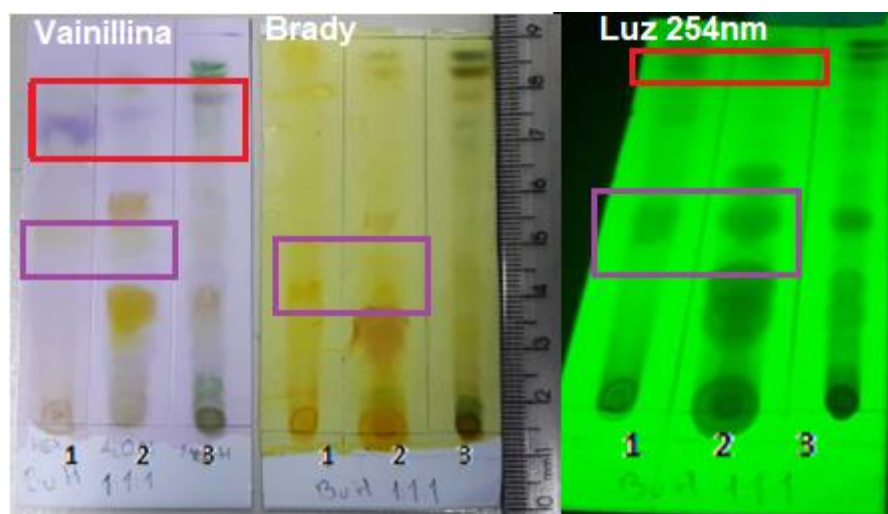


Figura 11. Fotografías de TLC (fase móvil Hex:AcOEt:CHCl₃ (1:1:1)) de la fracciones Hexano(1), AcOEt (2) y MeOH (3) de la muestra de *B. ustarii* en estado vegetativo. Se observan las TLC revelada con vainillina (izquierda), Brady (medio), bajo luz UV 254 nm (derecha). En violeta se marca una zona de polaridad media con revelado positivo según el criterio planteado, además en rojo se marcan otros posibles candidatos en base al revelado positivo y la distribución de las bandas en los distintos extractos.

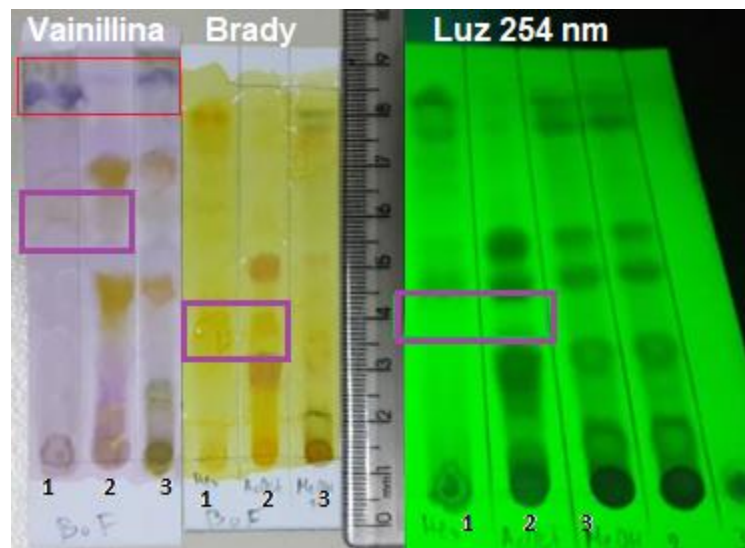


Figura 12. Fotografías de TLC (fase móvil Hex: AcOEt: CHCl₃ (1:1:1)) de la fracciones Hexano(1), AcOEt (2) y MeOH (3) de la muestra de *B. ustarii* en estado de floración (lado inferior). Se observan las TLC revelada con vainillina (izquierda), Brady (medio), bajo luz UV 254 nm (derecha). En UV se muestra una placa sembrada con con las extracciones sucesivas de MeOH sin acumular, lo que permite observar que se logro una extracción de la gran mayoría de los compuestos presentes en la droga vegetal (ausencia de bandas en el ultimo carril, con presencia de compuestos polares que avanzan poco en la corrida cromatografica). A su vez se indica en violeta y rojo posibles candidatos en base al revelado positivo buscado.

Al observar las TLC de las figuras 11 y 12, resulta interesante la similitud entre los extractos preparados con el material vegetal “Hojas y Flores” salvo pequeñas diferencias. Esto permite agrupar, para un análisis general, los extractos de igual polaridad. Por otro lado son claras las diferencias en la cantidad y tipo de bandas entre los extractos realizados con los diferentes disolventes.

Los carriles correspondientes a las fracciones metanólicas (carriles 3) resultaron ser los más cargado al presentar mayor cantidad de bandas. Esto se puede explicar a la mayor capacidad de penetración a los tejidos del metanol, en contraste al Hexano y Acetato de Etilo y por tanto la capacidad de acceder a compuestos polares internos de la células. A su vez son los carriles con mayor presencia de bandas de bajo valor

de R_f (menores a 0,4) lo que refleja la naturaleza polar de los extractos metanólicos. El hecho de ser esta hipótesis cierta sugiere la disponibilidad de los principios activos en la droga vegetal.

En el mismo sentido los carriles de las fracciones de Acetato de Etilo (carriles 2) muestran mayor cantidad de bandas en la zona media (R_f entre 0,3 y 0,8) y en los extractos hexánicos (carriles 3) predominan bandas de valores de R_f superiores a 0,5. Esto permite asumir que se logró realizar una correcta extracción por gradiente de polaridad.

Considerando la bioactividad de los extractos se hace foco en las bandas que aparecen en los carriles donde se sembraron los extractos hexánicos y de Acetato de Etilo. En particular se observa la banda que se indica en la figura 12 (señaladas en violeta), que aparece en ambos carriles con R_f de 0,53 (en aparente mayor intensidad en el extracto con Acetato de Etilo) y que revelan amarillo intenso con Brady, entre las bandas que revelan naranja con el mismo revelador y con fluorescencia bajo luz UV de 254 nm. Por su polaridad media, presencia en los dos extractos con actividad biológica y revelado positivo acorde a los antecedentes, resulta un buen candidato para el principio activo.

También es de interés la zona del frente de corrida que presenta bandas que revelan en tonalidades violáceas con Vainillina, amarillo intenso con Brady y fluorescencia en el UV, predominante en el extracto hexánico. Sin embargo la presencia de esta en el extracto metanólico descarta esta banda como vinculada al principio activo o la existencia de compuestos de similar R_f pero distinta naturaleza química (Figuras 11 y 12, señalado en rojo).

Cabe destacar que se asocian las bandas que revelan naranja intenso con reactivo de Brady en los carriles de los extractos de Acetato de Etilo y son de color amarillo sin revelador, a la presencia de flavonoides. Es interesante la falta de bandas que revelan en los tonos buscados (colores violáceos con Vainillina y amarillo intenso con Brady) en los carriles de los extractos metanólicos, lo que coincide con la falta de bioactividad de estos.

Para entender mejor la composición química de los extractos se estudia el espectro de ^1H -RMN de los extractos. Como ya se mencionó, se espera encontrar señales en el espectro vinculadas al grupo funcional aldehído como indicio del principio activo en búsqueda. Los resultados de ^1H -RMN (Figura 13) de los extractos con Hexano y Acetato de Etilo muestran por un lado, señales entre 9 y 10 ppm, (9,3; 9,7 y 9,8 ppm), característicos de grupos aldehído.

Se aprecia que la señal es de mayor intensidad y definición en los extractos de Acetato de Etilo (prácticamente nula en los Hexánicos, con muy baja intensidad en el pico cercano a 9,3 ppm). Esto sugiere la idea de considerar que la actividad del extracto Hexánico se debe a una entidad química diferente a la buscada asociada a un grupo funcional aldehído, como se mencionó en la sección Antecedentes.

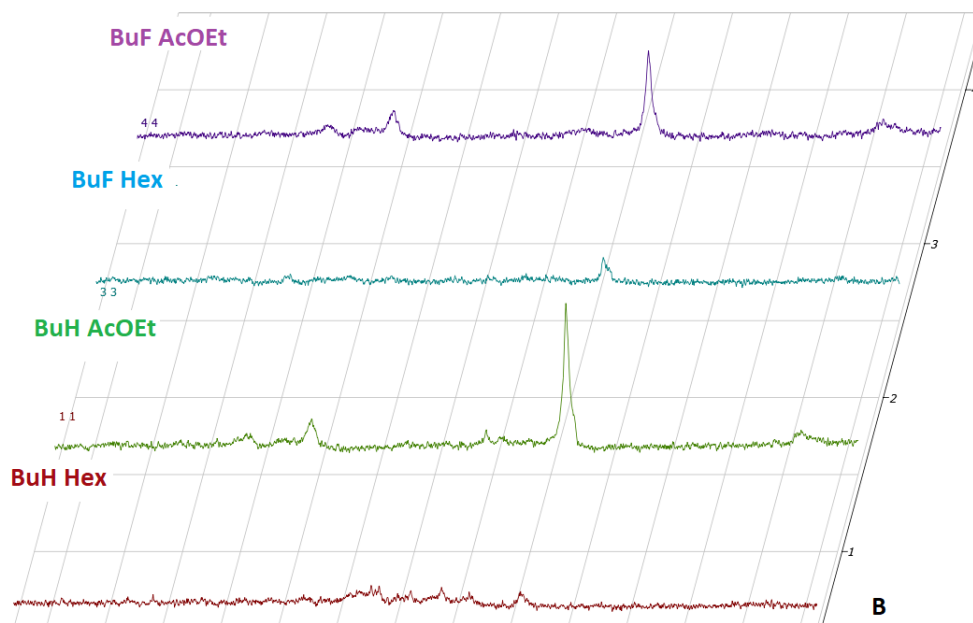
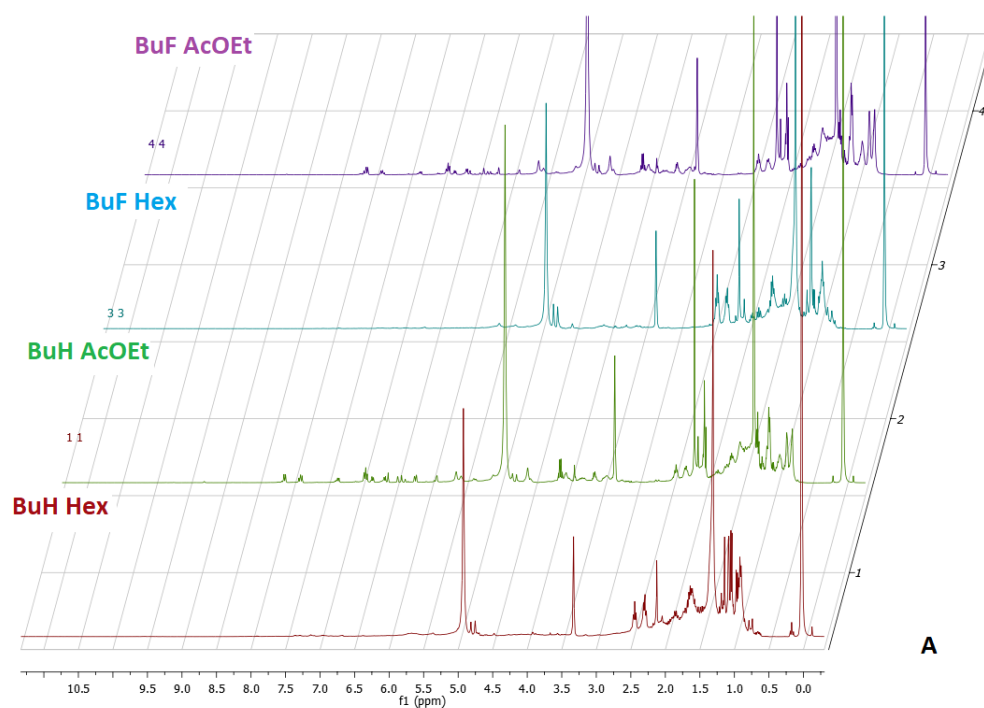


Figura 13 Espectros ^1H -RMN realizados en MeOD con TMS como referencia interna, apilados de los extractos BuHHex; BuHAcOEt; BuFHex y BuFACOEt. En la imagen **A** se observan los espectros enteros (de 0 a 11 ppm) de las muestras en el siguiente orden de arriba hacia abajo: BuHAcOEt, BuHHex, BuFACOEt y BuFHex. En la parte inferior (**B**) se muestra la zona de 9-10 ppm expandida para los mismos espectros.

Por otro lado se puede observar que los extractos con Acetato de Etilo presentan mayor cantidad de picos que los extractos con Hexano, los cuales tienen señales más anchas (que pueden estar englobando picos menores). Esto podría indicar que el extracto con AcOEt tiene una mayor diversidad de compuestos químicos, lo que coincide con lo observado en TLC. Se omiten los espectros metanólicos debido a la irrelevante actividad biológica de estos.

Al comparar los resultados del bioensayo y el análisis fitoquímico de las fracciones enteras es posible plantearse ciertas hipótesis. Por un lado se puede apreciar que las fracciones hexánicas, pese a presentar una menor CI_{50} de inhibición de crecimiento de *T. cruzi*, sus espectros de 1H -RMN no presentan señales en la región del aldehído relevantes. A su vez son las de menor porcentaje de rendimiento de extracción, lo que hace al extracto hexánico poco productivo, en cuanto a cantidad, para la purificación del presunto principio activo con señal de aldehído. Esto no descarta posibles investigaciones de la bioactividad del extracto hexánico, sin embargo no resulta parecer un buen candidato para la purificación del principio activo vinculado a un grupo aldehído (resultado obtenido en antecedentes).

Por otro lado se puede observar que los extractos con Acetato de Etilo presentan mayor diversidad de compuestos, al presentar los espectros de 1H -RMN mayor variedad de picos y las TLC más cantidad de bandas con distintos R_f . Los picos en la región entre 9 y 10 ppm sugieren la presencia de compuestos con grupos aldehídos. Además al resultar mayores los rendimientos de extracción los extractos con Acetato de Etilo son buen material de partida para la purificación del principio activo.

Finalmente se puede considerar que en los extractos de Acetato de Etilo hay una mayor intensidad de los picos vinculado a grupos aldehídos (espectros de 1H -RMN),

menor valor de Cl_{50} y mayor rendimiento de extracción de los extractos hechos a partir del material en estado de floración comparado con los hechos con el material en estado vegetativo. En base a estos resultados se decidió continuar la purificación del principio activo a partir del extracto de Acetato de Etilo preparado con el material vegetal en estado de floración (BuFAcOEt).

4.2. Fraccionamiento con cromatografía en columna

En base a los antecedentes que reporta la actividad tripanosomicida a un compuesto de origen terpénico con al menos un grupo aldehído, se analizan las fracciones en busca de este compuesto. Se procede a realizar un fraccionamiento en columna cromatográfica (cc) del extracto con Acetato de Etilo del material vegetal "Flores", con el fin de realizar un fraccionamiento del extracto y analizar la distribución del principio activo. Se obtuvieron 9 fracciones (cc) diferentes que se corrieron en TLC usando distintas fases móviles, resultando interesante los resultados con la fase móvil 1:1:2 (Figura 14) y 0:1:1 (Figura 15) de Hex:AcOEt:CHCl₃.

El revelado de éstas con Brady indica la presencia de compuestos con grupo aldehído y/o cetona principalmente en las fracciones (cc) elucidadas con fase móvil 4:1:1 y 1:1:1. Al usar luz UV se observa la presencia de compuestos que no se revelan claramente con los reveladores utilizados, destacando los presentes en la fracción 4:1:1b. La fracción (cc) 4:1:1b presenta en TLC (1:1:2) al revelar en Brady, una tonalidad naranja de la mitad del carril (R_f 0,42) hacia la base y dos bandas de amarillo intenso con R_f 0,53 y 0,85 (Figura 14, carril 5 señaladas en verde). Al revelar con Vainillina estas bandas presentan tonalidades violáceas, señalando naturaleza terpénica de los compuestos (Figura 14, carril 5 señaladas en verde).

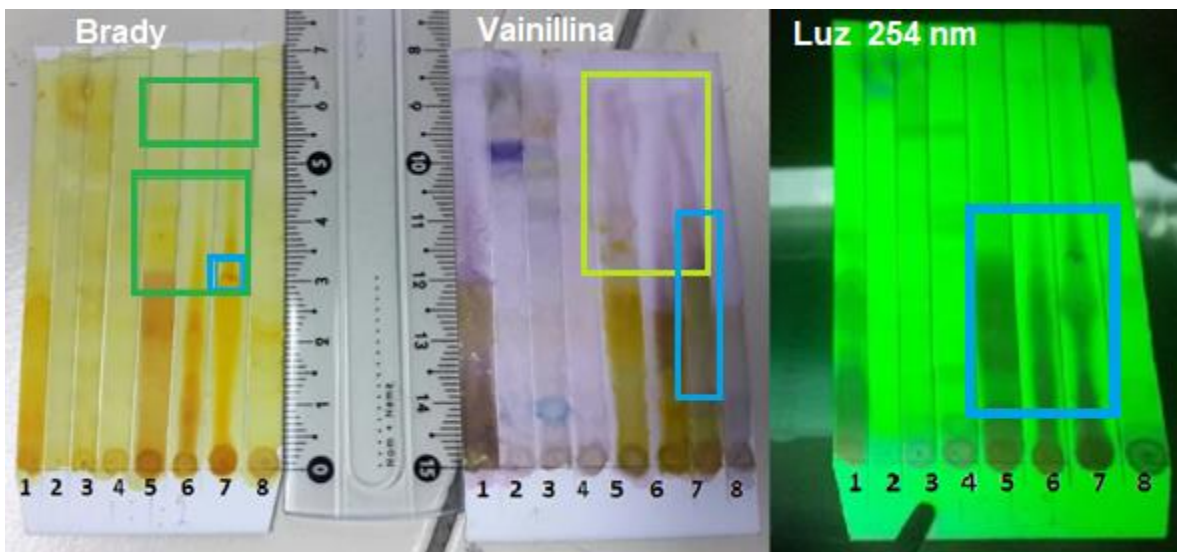


Figura 14. Fotografía de TLC (Hex: AcOEt: CHCl₃ (1:1:2)) de las fracciones de la columna cromatográfica, del extracto con AcOEt de la muestra de *B. ustarii* en estado de floración (F); revelada con Brady (izquierda), con Vainillina (medio) y una de las placas reveladas bajo luz UV 254 nm. De izquierda a derecha están sembradas las fracciones de la columna cromatográfica en el siguiente orden: (1)EtOH; (2) 9:1:0; (3) 4:1:0; (4) 4:1:1a; (5) 4:1:1b; (6) 1:1:1a; (7) 1:1:1b; (8) 1:1:4 (Hex:AcOEt:CHCl₃).

Se observa la misma situación en los carriles 6 y 7, de las fracciones 1:1:1 a y b en la TLC (1:1:2); definiéndose en el carril 1:1:1b un perfil fitoquímico buscado. En este carril se observa un revelado amarillo intenso y limpio, con revelador Brady y tonos violáceos tenues al utilizar vainillina (Figura 14, carril 7 señalado en azul), especialmente la zona de $R_f = 0,55$ pero sin presentar bandas definidas y separadas.

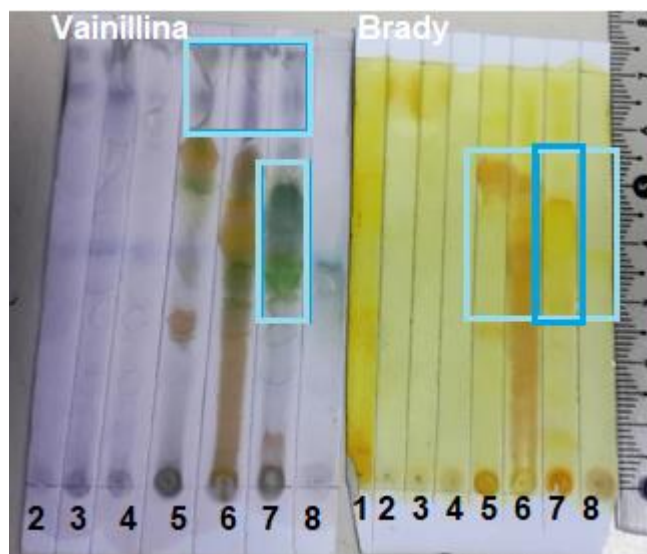


Figura 15. Fotografía de TLC (AcOEt:CHCl₃ (1:1)) de las fracciones de la columna cromatográfica, del extracto con AcOEt de la muestra de *B. ustarii* "Flores"; revelada con vainillina (izquierda) y Brady (derecha). De izquierda a derecha están sembradas las fracciones de la columna cromatográfica en el siguiente orden: **(1)** EtOH; **(2)** 9:1:0; **(3)** 4:1:0; **(4)** 4:1:1a; **(5)** 4:1:1b; **(6)** 1:1:1a; **(7)** 1:1:1b; **(8)** 1:1:4 (Hex:AcOEt:CHCl₃).

Al correr la TLC (fase móvil 1:1) se puede apreciar una separación más ordenada (con bandas diferenciadas) de los compuestos de cada eluido (Figura 15). Nuevamente resultan de interés los carriles 5, 6 y 7 (4:1:1b, 1:1:1 a y b), al presentar estos una variedad de bandas con distintos colores al usar los reveladores. Se aprecia en estas fracciones una diversidad de compuestos de polaridad media a baja ($R_f > 0,35$) que revelan en distintos colores con Vainillina y varios compuestos que se tiñen en colores violáceos (posiblemente relacionados a naturaleza terpénica).

Los carriles 5, 6 y 7 revelan en colores verdes, marrones, amarillos azules y violetas al emplear Vainillina, lo que refleja la variedad de compuestos que coexisten en las fracciones. Revelando con Brady a la TLC (1:1) se ve en los 5,6 y 7 bandas de color naranja oscuro a amarillo intenso. Dado que con Brady se vinculan los colores

oscuros a grupos cetónicos y los amarillos a aldehídos, vuelve a llamar la atención el carril 7, como se indica en las Figuras 14 y 15.

Es posible asumir que dichas fracciones presentan la mayor variedad de los compuestos del extracto BuFACOEt y la mayor cantidad de bandas con revelado positivo según los criterios de interés. En base a los perfiles químicos observados se decide realizar con las fracciones 4:1:1b, 1:1:1a y 1:1:1b el bioensayo para estudiar la actividad antiproliferativa de *T. cruzi* (tabla 3). También se realizó el espectro de RMN, en busca de la señal del grupo aldehído (Figura 16).

Tabla 3. Valores de CI₅₀ (µg/ml) de la actividad inhibitoria del crecimiento de *T. cruzi* para las fracciones de interés obtenidas por columna cromatográfica.

Muestra	CI ₅₀ ^a (µg/ml)	σ ^b
411 cc	25.1	1.1
111 a cc	26.8	3.4
111 b cc	26.7	3.8

^a IC₅₀ concentración que inhibe el 50% de crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi* cepa Tulahuen 2. ^b desviación estándar del promedio de tres repeticiones

Se observa una relevante actividad biológica en las fracciones 4:1:1b, 1:1:1a y 1:1:1b, aproximadamente 3 veces menor al extracto de partida (BuFACOEt) y de similar valor entre ellas. Resulta llamativa la dispersión del principio activo en fracciones de distinta polaridad, lo que vuelve a sugerir la presencia de varios compuestos como responsables de la actividad buscada.

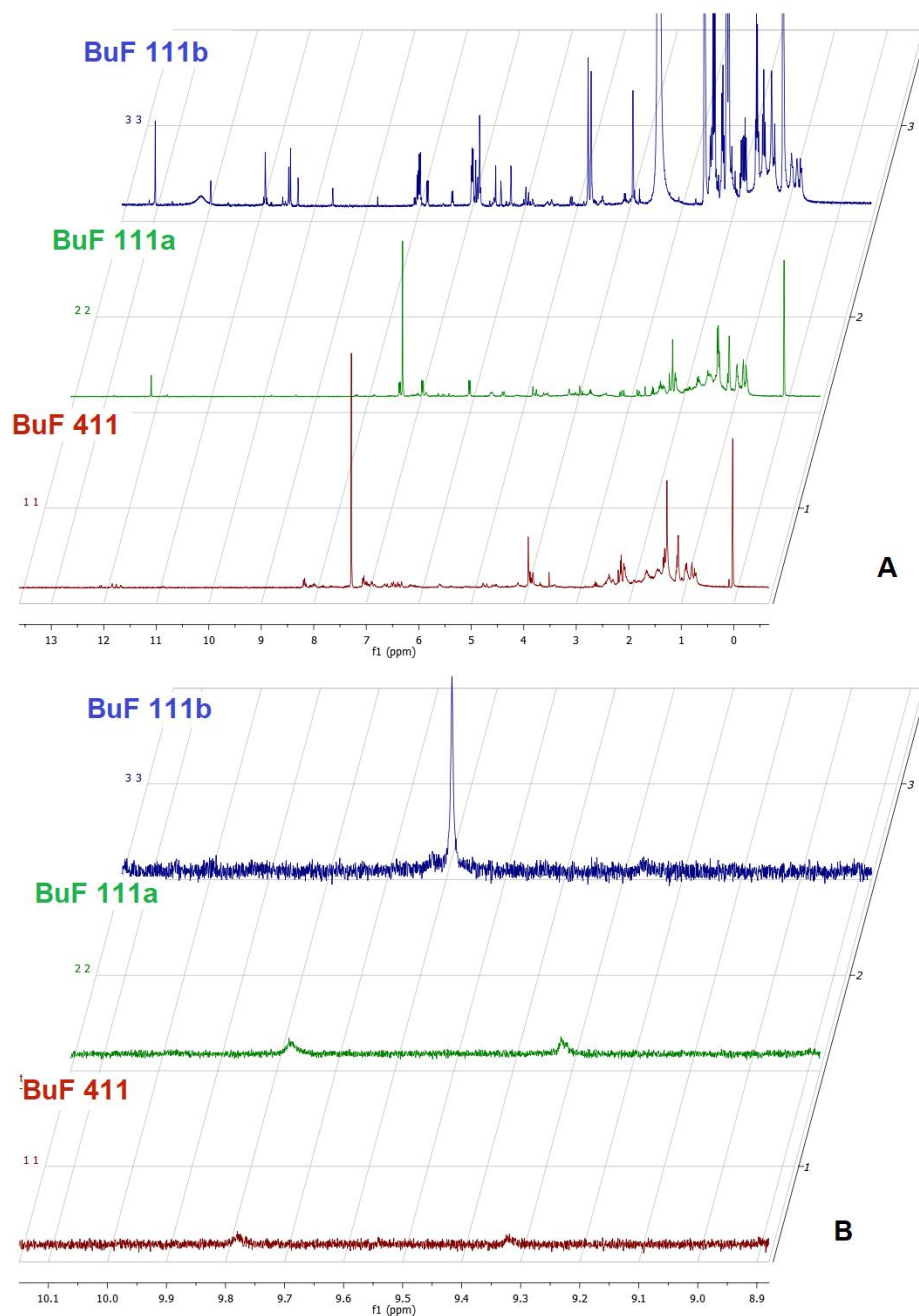


Figura 16 Espectros ^1H -RMN realizados en CDCl_3 , con TMS como referencia interna, apilados de las fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna a partir del extracto BuFAcOEt. Se analizaron las fracciones elucidadas 4:1:1b, 1:1:1a y 1:1:1b (presentadas en este orden). En **A** se observa el espectro entero de RMN mientras que en **B** se muestra la zona de 9-10 ppm expandida.

Los espectros de ^1H -RMN indican que las tres eluciones con actividad tripanosomicida presentan señal de aldehído. La mayor intensidad de los picos se aprecia en la fracción 1:1:1b sugiriendo que se concentra el principio activo de interés en esta fracción. Vale destacar que el aspecto de la fracción 1:1:1a es de un color amarillo poco verdoso, que en suma al perfil fitoquímico observado probablemente concentre flavonoides. Si bien estos resultados permiten afirmar una concentración del principio activo, la pureza de las fracciones no permite la elucidación y correlación del principio activo y el grupo funcional aldehído.

4.3 Fraccionamiento con cromatografía preparativa

Las fracciones obtenidas en la columna no muestran ser de una pureza muy alta y la relación tiempo rendimiento es baja. Debido a esto se plantea proseguir con un paso nuevo de purificación, como cromatografía preparativa, en miras de acercarse a la estructura y naturaleza química del principio activo de interés. Se aborda entonces seguir la purificación del principio activo utilizando solo la cromatografía preparativa como técnica y el extracto con Acetato de Etilo (BuFAcOEt) como material de partida.

Repitiendo esta técnica (cromatografía preparativa) se acumula masa de los compuestos identificados como bandas aisladas y se procede al análisis de las distintas muestras. Para acumular suficiente masa de cada banda, se realiza un mínimo de 15 placas, sumando la experiencia de esta tesina la realización de más de 120 placas preparativas (incluyendo producción, corrida y aislamiento).

En este sentido se plantea la utilización de las cromatografías preparativas con el fin de separar más definidamente los distintos compuestos de la fracción BuFAcOEt. A

partir de los resultados anteriores, se decide desarrollar las placas cromatográficas en las fases móviles 1:1:1 y 4:1:1 (Hex:AcOEt:CHCl₃), por ser en estas fases móviles que se mantiene la actividad anti tripanosomicida y la señal del aldehído en las fracciones de la columna.

En un principio se plantearon las siguientes hipótesis:

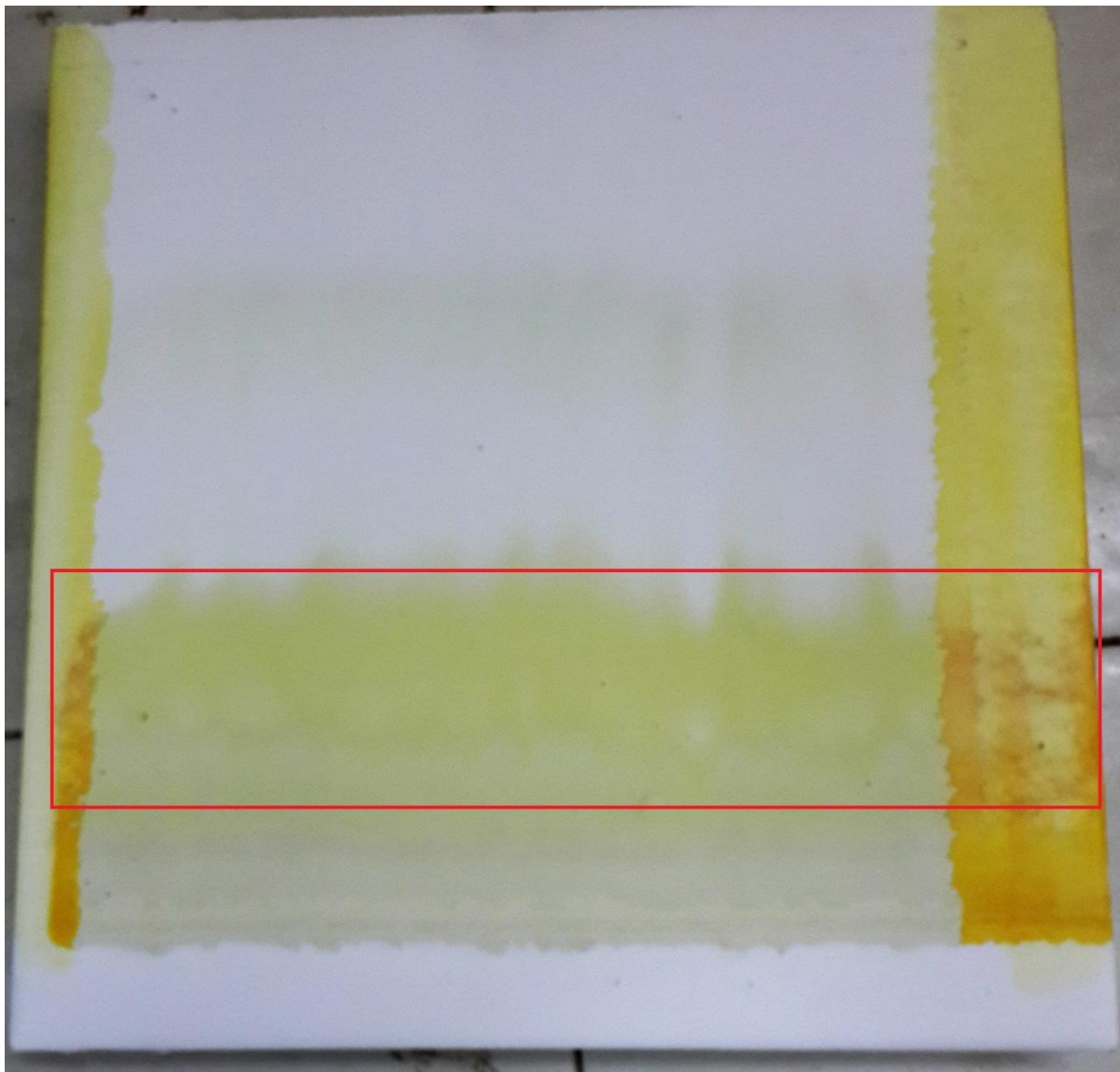
- el principio activo se encuentra entre los tantos componentes de polaridad media (los que avanzan hasta la mitad en la TLC) que se eluyen en la columna con la fase móvil 1:1:1 (Hex:AcOEt:CHCl₃) y es necesario buscar la fase que los separe mejor.
- el principio activo es de carácter relativamente apolar y eluye principalmente en la fase móvil 4:1:1 (Hex:AcOEt:CHCl₃), esperando encontrarlo con un buen desplazamiento en fase móvil poco polar y fase estacionaria polar (como la utilizada).

En base a estas hipótesis se prosiguió con la purificación, realizando las cromatografías preparativas en capa fina utilizando distintas fases móviles. Se usaron los mismos reveladores que para las TLC, revelador Brady, Vainillina y luz UV 254 nm.

Las distintas bandas con revelado positivo (amarillo intenso en Brady y colores violetas en Vainillina, con posible fluorescencia en UV) se separaron y estudiaron en busca de la presencia de la señal de aldehído en los distintos espectros de RMN, con el fin de buscar buenos candidatos para el estudio de la bioactividad tripanosomicida.

Se realizaron las cromatografías preparativas en capa fina (Figura 17) primero en fase móvil 1:1:1 (Hex:AcOEt:CHCl₃). Debido a que se aprecia una poca separación de los compuestos presentes en el extracto y que la señal del aldehído aparece en varias bandas aisladas, en los espectros de ¹H-RMN, se probó realizar una segunda

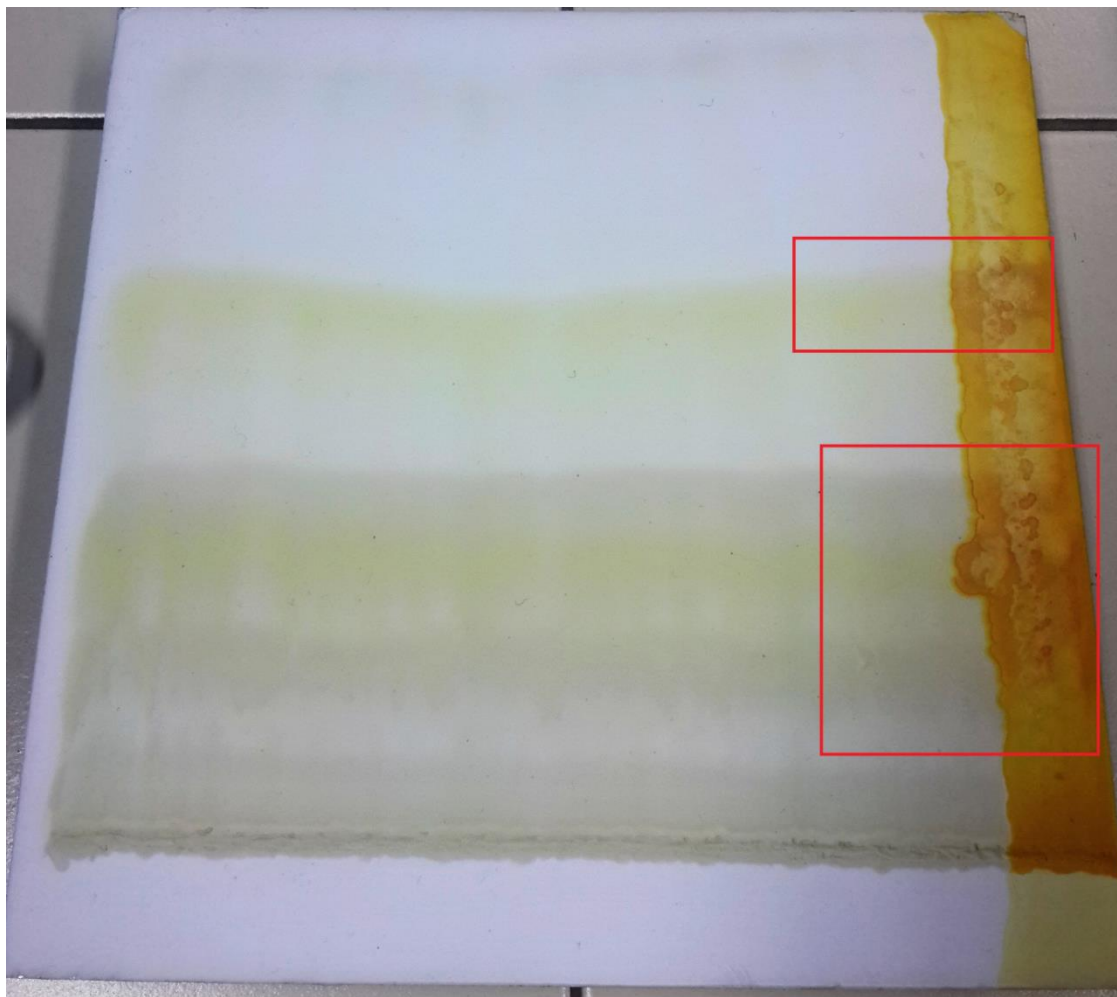
corrida en una fase móvil más apolar para separar los compuestos que quedan concentrados cerca de la línea de siembra.



Preparativa en 1:1:1 (Hexano:AcOEt:CHCl₃)

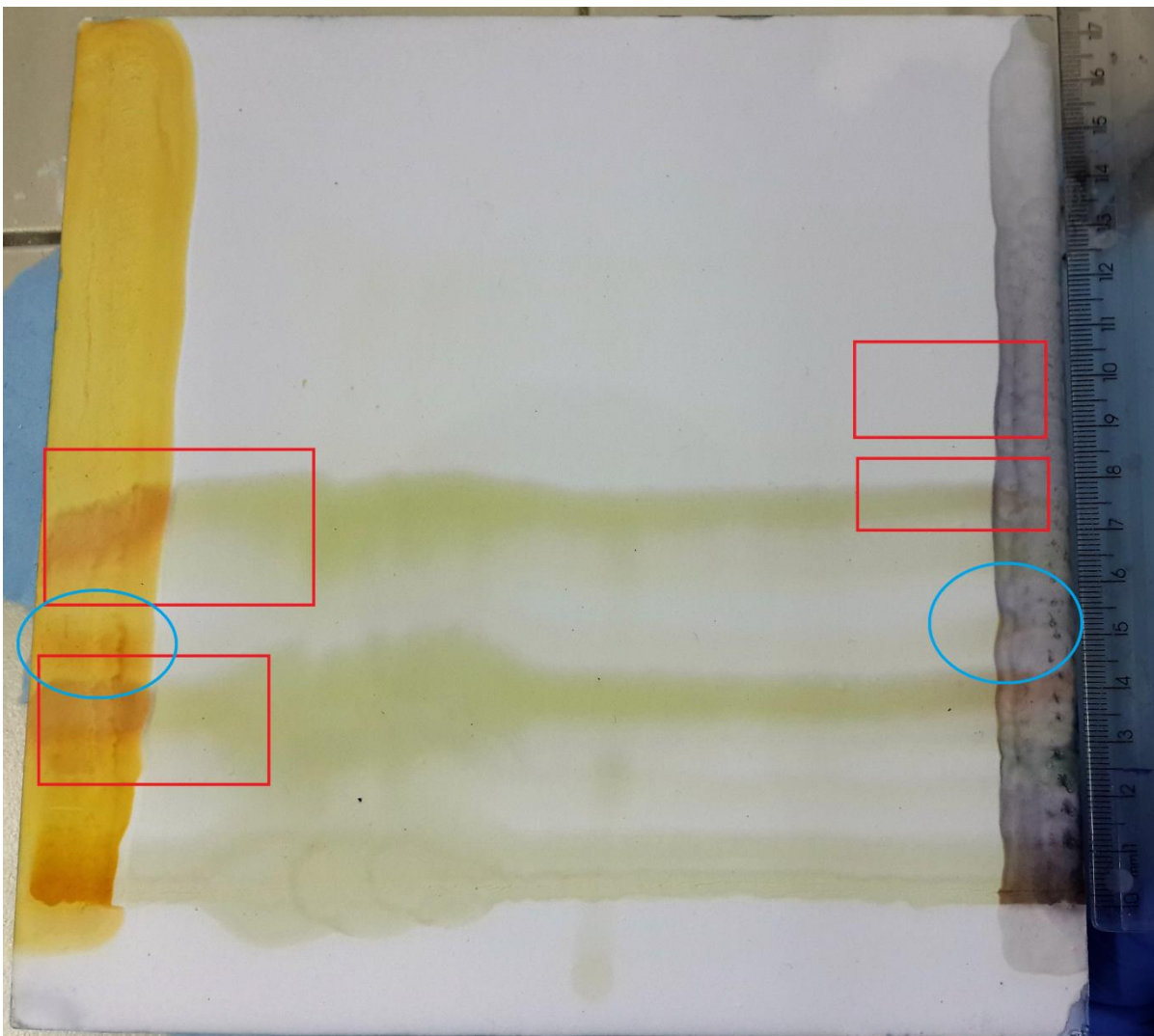
Figura 17. Fotografía de la placa de cromatografía preparativa (20 x 20 cm) sembrada con BuFAcOEt y corrida en fase móvil 1:1:1 (Hex:AcOEt:CHCl₃). Se muestran la placa revelada con Brady. En rojo se indica la zona donde se encuentran bandas con un revelado de interés (colores amarillo intenso).

Se decidió correr las placas en dos fases móviles consecutivas, primero en 1:1:1 y luego de dejar evaporar el disolvente se corrieron en 1:1:4 (Hex:AcOEt:CHCl₃, Figura 18). Se obtuvieron buenos resultados, logrando separar mayor cantidad de bandas de la línea de siembra. Sin embargo los espectros de ¹H-RMN fueron poco definidos y con señales repetidas indicando una mala separación química de los compuestos. Resulta interesante observar dos zonas de la placa con revelado positivo con Brady.



Preparativa 1:1:1 y 1:1:4 (Hexano:AcOEt:CHCl₃)

Figura 18. Fotografía de la placa de cromatografía preparativa (20 x 20 cm) sembrada con BuFAcOEt y corrida en fase móvil 1:1:1 + 1:1:4 (Hex:AcOEt:CHCl₃). Se muestra la placa revelada con Brady. En rojo se indican los distintos revelados de interés, que se utilizaron como criterio para la selección de bandas (colores en tonos altos de amarillo y naranja brillante).



Preparativa en 1:4 (AcOEt:CHCl₃)

Figura 19. Fotografía de la placa de cromatografía preparativa (20 x 20 cm) sembrada con BuFAcOEt y corrida en fase móvil 1:4 (AcOEt:CHCl₃). En rojo se indican distintos revelados positivos bajo el criterio considerado para la selección de bandas. En azul se destaca la banda de mayor interés (Amarillo oscuro en Brady y violeta azulado).

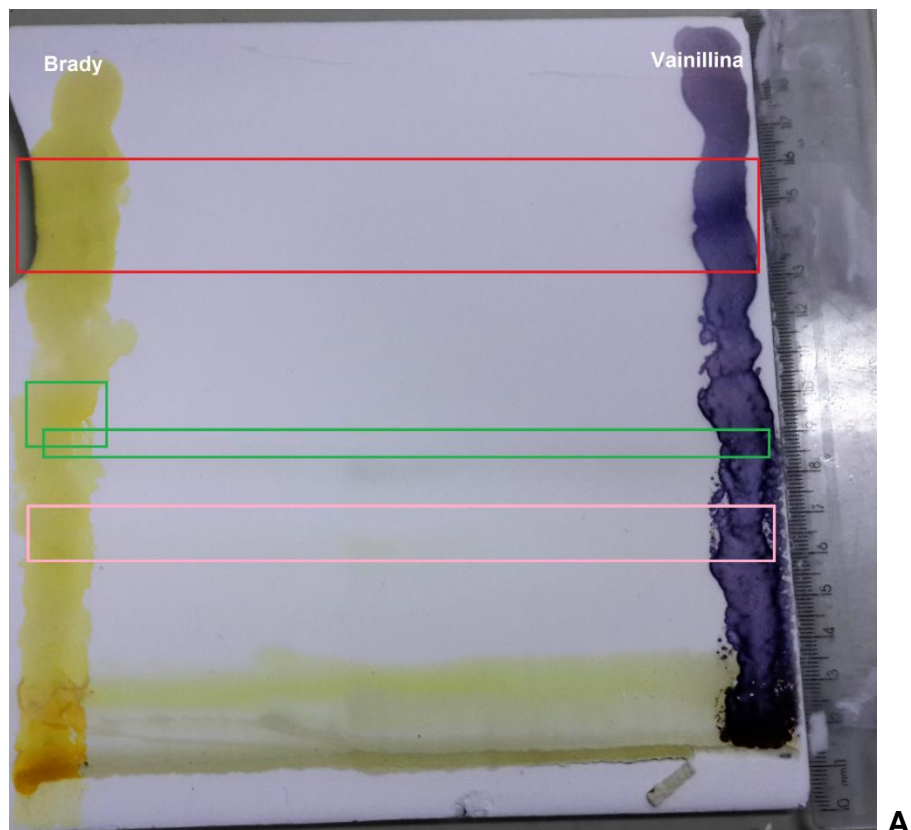
Se decidió utilizar la fase 1:4 (AcOEt:CHCl₃) con mayor cantidad de cloroformo, intentando aumentar la solubilidad de los compuestos en la fase móvil (Figura 19).

Las bandas con revelado positivo con los reveladores empleados, son separadas

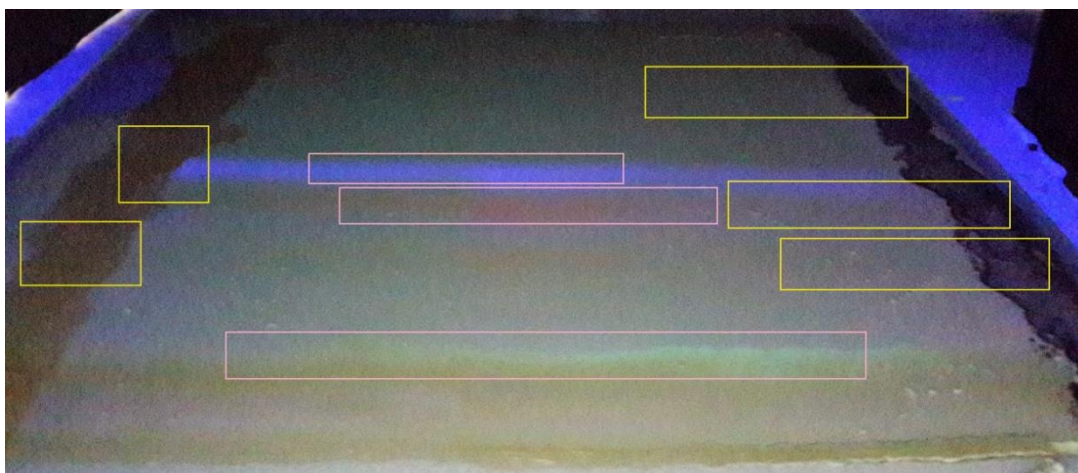
para medir la actividad tripanosomicida. Para las placas 1:4 se obtuvieron resultados “relevantes” de bioactividad, principalmente en una banda de bajo R_f (0,32) marcada con círculos azules en la Figura 19, obteniendo una CI_{50} menor para la banda que el extracto BuFAcOEt. En la figura 19 se indicaron en colores bandas que revelan positivamente.

A partir de los resultados obtenidos se observa que es posible mejorar la pureza del principio activo mediante las fases móviles utilizadas pero no fue posible obtener una banda suficientemente limpia para realizar una elucidación estructural. Esto se observa al realizar los ensayos de RMN de COSY, HMQC, HSQC y HMBC donde no es posible encontrar relación entre la señal de aldehído y otras del espectro, posiblemente por la baja concentración del principio activo en las fracciones aisladas (espectro de 1H -RMN en Anexo 1). Además, en los espectros de 1H -RMN se vuelve a observar que la señal del aldehído resulta aparecer en varias bandas. En este sentido es posible interpretar que existen varios compuestos vinculados a un grupo aldehído similar o el mismo (se repiten pocos picos con misma forma y valor en la zona entre 9 y 10 ppm del espectro de 1H -RMN). Se prosiguió, entonces, a probar la fase móvil 4:1:1 Hex:AcOEt: $CHCl_3$ (Figura 20).

De estas preparativas (4:1:1) se logra una separación definida y ordenada de los compuestos del extracto de BuFAcOEt. El logro más relevante con esta fase móvil fue aislar varias bandas sin señal de aldehído (señal que no resultaba intensa pero sí presente y reiterada en los espectros de las bandas aisladas con otras fases móviles, Anexo 1) intercaladas con bandas que sí presentan señal, reflejando una buena resolución cromatográfica.



A



B

Figura 20. Fotografías de la placa preparativa corrida en fase móvil 4:1:1 (Hex:AcOEt:CHCl₃) con la fracción BuFAcOEt. En **A** se muestra la placa reveladas con Brady y Vainillina, siendo la misma placa en ambas fotografías, en **B** se observa iluminada con luz UV de 254 nm. Se señalaron en las imágenes los distintos revelados que se utilizaron como criterio para la selección de bandas a estudiar, como la presencia de fluorescencia a 254nm, colores amarillo oscuro y naranja brillante en Brady y violeta y azules en Vainillina.

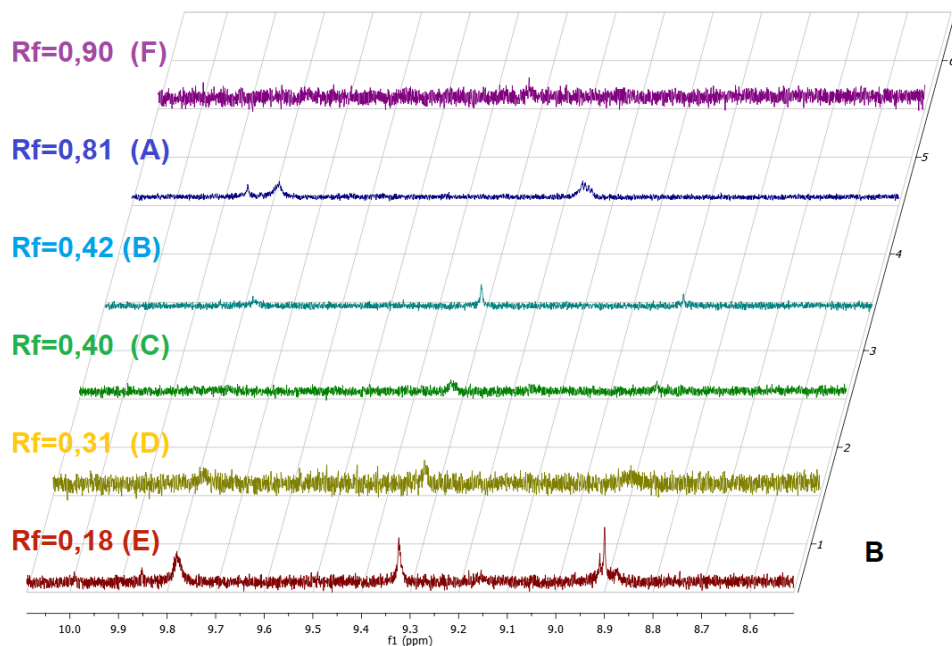
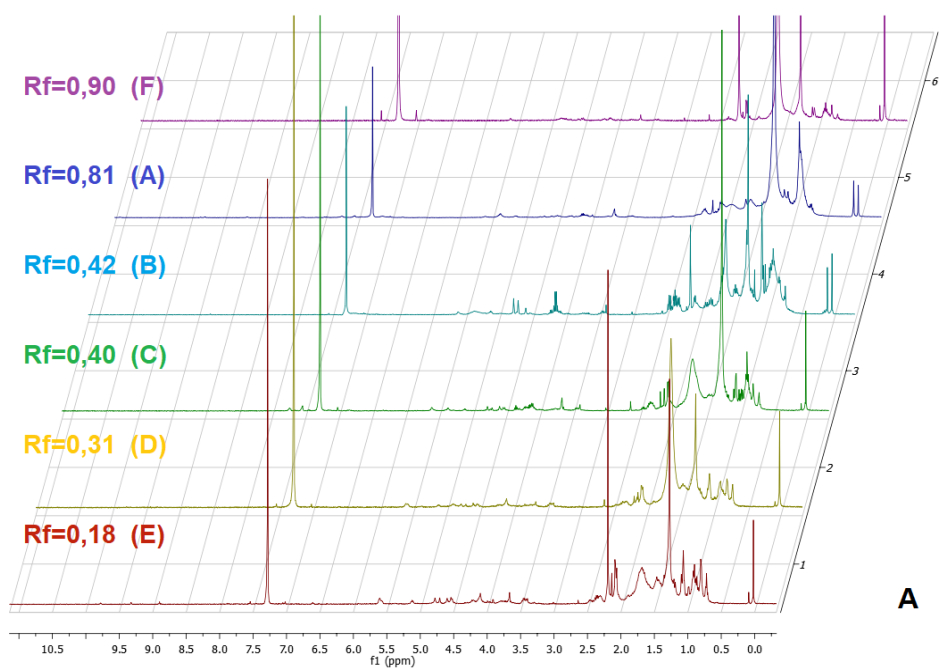


Figura 21. En **A** espectros apilados de ¹H-RMN en CDCl₃, con TMS como referencia interna, de las bandas raspadas de las placas cromatográficas preparativa corrida solo con fase móvil 4:1:1 (Hex:AcOEt:CHCl₃). Se muestran las bandas en el siguiente orden de arriba a abajo: **F (Rf=0,9); E (Rf=0,18); D (Rf=0,31); C (Rf=0,40); B (Rf=0,42) y A (Rf=0,81).** En **B** la zona entre 9 y 10 ppm expandida. **Como se explica en el texto, no se observa en todas las fracciones señales en B.**

En la Figura 20 se marcan todas las señales consideradas positivas y utilizadas como criterio para la selección y separación de las bandas de interés. Se lograron aislar 3 bandas de diferentes secciones de la placa cromatográfica (una banda de $R_f=0,18$ (E); otra de 0,42 (B) y una última perteneciente a la zona superior a $R_f=0,81$ (A)) con 2 tipos diferentes de señal aldehído y como se explica en el párrafo anterior, se separaron bandas intermedias a estas sin señal intensa de aldehído, siendo : F ($R_f=0,9$); D ($R_f=0,31$) y C ($R_f=0,40$), como se observa en los espectros de $^1\text{H-RMN}$ (Figura 21).

Dado los resultados obtenidos se realiza con muestras de las bandas aisladas que presentan mejor resolución de la señal aldehído (A, B y E), el bioensayo de actividad inhibitoria del crecimiento de *T. cruzi*. Se obtienen resultado “Relevantes” de bajo valor de CI_{50} (Tabla 4). Al comparar los valores de bioactividad de estas bandas con los obtenidos para las fracciones eluidas en la columna cromatográfica y los extractos con disolvente, se puede apreciar una concentración y aislación del principio activo creciente en los pasos de purificación.

Tabla 4 Actividad anti-*T. cruzi* CI_{50} para las muestras obtenidas al aislar las bandas de interés de la preparativa hecha con fase móvil 4:1:1 (Hex:AcOEt:CHCl₃)

Muestra (R_f)	CI_{50} ^a ($\mu\text{g/ml}$)	σ ^b
A (0,81)	21,8	2,0
B (0,42)	17,9	2,6
E (0,18)	25,8	8,3

^a IC_{50} concentración que inhibe el 50% de crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi* cepa Tulahuen 2. ^b desviación estandar del promedio de tres repeticiones

Se prosiguió a repetir la experiencia cromatográfica, juntando las tres bandas de interés de 30 placas más. Tras comprobar que los perfiles químicos eran similares mediante ^1H -RMN, se sumaron las fracciones a las obtenidas anteriormente con el fin de lograr un aumento de concentración de los compuestos de interés y así intentar lograr una elucidación o acercamiento a la estructura del compuesto. Para esto se envían las muestras a un ensayo de RMN de COSY, HMQC, HSQC y HMBC (no se muestran los datos). No se encontró correlación entre la señal aldehído y otras señales de la misma estructura de la muestra en estudio, principalmente debido al grado de impureza.

Se verifica que la concentración no es suficiente para realizar una elucidación de los compuestos con estas fracciones exigiendo aún más pasos de purificación. No es posible lograr una identificación de las muestras obtenidas mediante ^1H RMN ya que en las mismas no se pudo extraer correlaciones que ayudasen a obtener una distribución molecular adecuada. A su vez por TLC se observa que las bandas que se ven como una sola en la cromatografía preparativa, presentan compuestos varios (no se muestran datos).

4.4 Estudio del aceite esencial de *Baccharis usterii*

Dada la naturaleza de baja polaridad del principio buscado se planteo también la posibilidad de que el compuesto sea volátil y poder extraerse mediante destilación por arrastre con vapor. Mediante esta técnica se obtiene lo denominado aceite esencial de la droga vegetal, con presencia de compuestos de alta volatilidad y principalmente naturaleza terpenica o aromática. Al finalizar el proceso de destilación, se obtuvieron 0,042 g de aceite esencial de *Baccharis usterii*. Se

procedió a determinar su actividad biológica frente al protozoario *Trypanosoma cruzi* en estadio epimastigotas. Se separaron 8 mg para la realización del ensayo biológico.

En la Tabla 5 se puede observar el valor de concentración de inhibición del crecimiento del 50% de los parásitos (CI₅₀) para el aceite esencial de carqueja. Resulta ser una concentración muy alta para considerar un efecto relevante.

Tabla 5. Actividad anti-*T. cruzi* de aceite esencial de *B. usterii*.

Muestra	Masa de muestra vegetal (g)	Masa extracto (g)	Rendimiento de extracción (%)	CI ₅₀ ^a (µg/ml)	P.I.C (para 50 µg/ml)
Aceite esencial de <i>Baccharis usterii</i>	10	0,042	0,4	>100	2 %

^aCI₅₀ concentración que inhibe el 50% de crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi* cepa Tulahuen 2

Las TLC realizadas (Figura 22) muestran presencia terpénica en el aceite esencial, al revelar bandas en tonos violetas con Vainillina y presencia de cetonas y aldehídos al revelar en naranja y amarillo con el revelador Brady. Los terpenos son muy frecuentes en los compuestos volátiles de las plantas. No siendo muy informativo el perfil fitoquímico observado. Se detectan sin embargo la presencia de diferentes entidades químicas por TLC.

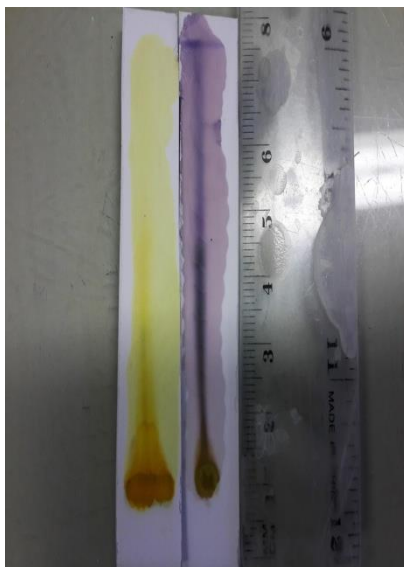


Figura 22. Imagen de las TLC corridas en y reveladas con Brady (izquierda) y Vainillina (derecha). Dado el revelado del último se aprecia la presencia de terpenos.

Observando el espectro de ^1H -RMN obtenido no se encuentra ninguna señal relevante que confirme la presencia de un grupo aldehído. Esto podría explicar la falta de actividad biológica relevante del destilado, dado que se supone que el principio activo con bioactividad anti-*Typanosoma* posee un grupo funcional aldehído.

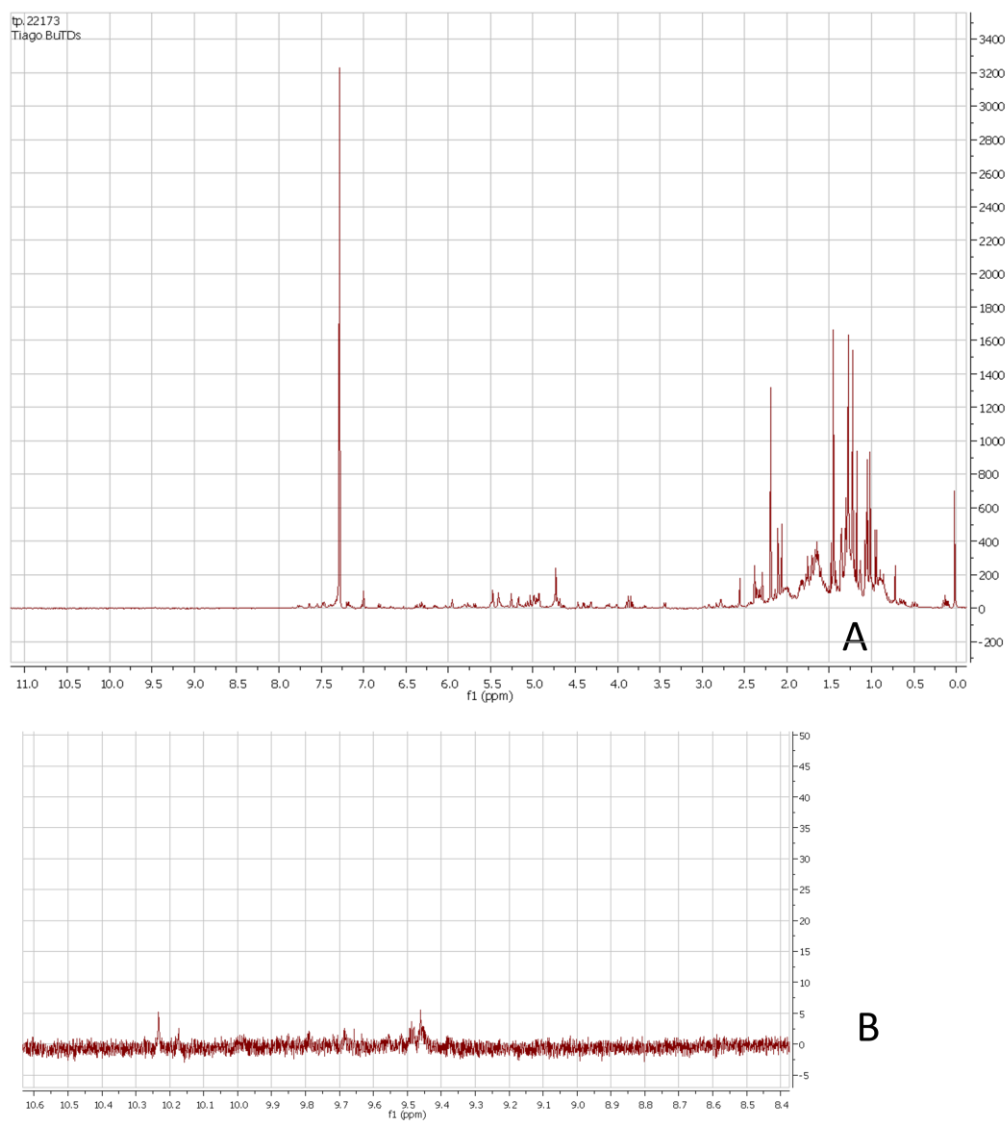


Figura 23 Espectros de ^1H -RMN del aceite esencial de *Baccharis usterii* en CDCl_3 (A). Abajo (B) se muestra la zona entre 9 y 10 ppm expandida.

5. Conclusiones y perspectivas

A partir de los datos obtenidos se realizan las siguientes **conclusiones**:

- Fue posible por diferentes caminos obtener fracciones enriquecidas de componentes activos de *B. usterii* frente a forma epimastigota de *T. cruzi*. Esto se observa al obtener mediante diferentes técnicas cromatográficas varias fracciones con mayor bioactividad (menor CI_{50}) que los extractos enteros de partida (como se muestra en la Tablas 1, 3 y 4, se parte de una actividad del orden de 80 $\mu\text{g/ml}$ y se obtienen fracciones que promedian en el orden de 20 $\mu\text{g/ml}$ aproximadamente). Se destacan las fracciones: 1:1:1b (cc, de la columna cromatográfica) y la banda A y E (de la placa preparativa corrida en 4:1:1 (Hex:AcOEt:CHCl₃)). Además es posible apreciar un aumento en la resolución e intensidad de los picos relacionados a señales del grupo aldehído. A partir de estos resultados es posible confirmar la bioactividad anti-*Trypanosoma cruzi* (en las condiciones de trabajo), en las partes aéreas de *Baccharis usterii*.
- Dado el carácter de los disolventes utilizados en la extracción y fase móvil de las técnicas cromatográficas empleadas, se puede considerar una naturaleza del principio activo de polaridad media a baja. La resolución de las TLC de las fracciones con bioactividad, muestran revelados positivos en zonas de polaridad baja a media (R_f entre 0,2 y 0,8 aproximadamente según la fase móvil utilizada).
- La evaluación del aceite esencial obtenido por destilación por arrastre de vapor permitió indicar que el principio activo no está presente en los componentes del mismo dado que se pierde actividad biológica.

- Se plantea la existencia de varios compuestos responsables de la bioactividad tripanosomicida de *Baccharis usterii*. Se observa que estos compuestos difieren en su polaridad, al encontrar fracciones cromatográficas diferentes y que presentan señales del farmacóforo (grupo aldehído) y bioactividad distinta.
- Se considera la opción de estar observando diferentes metabolitos de una misma ruta metabólica, lo que puede explicar que distintas fracciones tienen señal aldehído de similar forma y valor, de pico e integración. Por otro lado, puede deberse a compuestos diferentes dicha bioactividad. Esto no se descarta ya que también se observa bioactividad en fracciones sin señal aldehído, como el extracto Hexánico de *Baccharis usterii*.
- Se pueden descartar efectos sinérgicos relevantes, ya que se ha alcanzado por distintas formas valores de CI_{50} menores a los de los extractos de partida.

Se plantea como perspectivas de trabajo futuros pasos en la investigación del principio activo, que serían además de evaluar la citotoxicidad e índice de selectividad (escalado farmacéutico), realizar más pasos de purificación de forma de acercarse más a la elucidación del compuesto.

- Se propone considerar para la purificación de los principios activos, la combinación de las técnicas cromatográficas utilizadas y no la separación de estas, como se procedió ya que no es posible llegar mediante un solo método cromatográfico a una fracción lo suficientemente pura. Es decir, se propone realizar un fraccionamiento por columna cromatográfica utilizando

principalmente la fase móvil 1:1:1 (Hex:AcOEt:CHCl₃) del extracto de *B. usterii* con AcOEt con la suficiente masa de partida (o repitiendo la técnica las veces necesarias) para obtener una gran cantidad de la fracción de interés. A continuación se propone la utilización de técnicas cromatográficas preparativas (TLC) utilizando esta fracción obtenida por columna cromatográfica.

- Resulta interesante destacar que la bioactividad puede deberse a la selectividad del compuesto por los protozoos *T. cruzi* o debido a mecanismos de citotoxicidad general. En este sentido, realizar ensayos de citotoxicidad correspondería ser el siguiente paso en la purificación, pudiendo ser el índice de selectividad (relación directa entre citotoxicidad y bioactividad estudiada) un criterio útil para la selección y guía de la purificación del principio activo.
- Una vez conocida de mejor forma la identidad de este, se facilita la aplicación de otras técnicas de purificación, como por ejemplo HPLC.
- Resultaría interesante probar las fracciones frente a otros estadios de *T. cruzi* y contra animales infectados por el parásito para evaluar su potencial como fitoterápico.
- Los resultados obtenidos en este trabajo permiten pensar en nuevos tratamientos para la enfermedad de Chagas en base a componentes de *Baccharis usterii*. Siendo necesario pasar a etapa de ensayos in vivo de eficacia y seguridad para continuar con el desarrollo del mismo.

A partir de esta tesina se aportan datos para verificar el vínculo entre el grupo aldehído y la bioactividad de los principios activos presentes en *Baccharis usterii*, como ya había sido propuesto y analizado por el Dr. Javier Varela [50]. Esto aporta un valor agregado a la especie *Baccharis usterii*, nativa del territorio uruguayo. Lo que plantea la posibilidad de obtener un fármaco de producción nacional, a partir de un producto natural contra una “enfermedad olvidada” y que afecta a millones de personas a nivel mundial.

6. Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis tutores de tesis Dr. Javier Varela y Dra. Mercedes González y al equipo de Química Medicinal, donde desarrollé mi tesis, por la oportunidad brindada, el espacio y libertades para poder desarrollarme como investigador, respetando mis tiempos y capacidades. En particular agradecer a Javier Nargoli quien compartió sus experiencias conmigo y me ayudó con la realización de los bioensayos. En este sentido también agradecer a la Facultad de Ciencias, UdelaR y Estado por otorgarme la posibilidad de estudiar una profesión tan digna. Agradezco también a todos los docentes que conocí y compañeros con los que compartí la carrera, todos fundamentales para mi formación y experiencia universitaria.

Quiero agradecer fundamentalmente a mi familia, padres, hermanos y en general, que día a día puedo realmente decir que cuento con su apoyo. Agradezco a mis abuelas por la atención privilegiada que me han dedicado. Finalmente a todas mis amigas y amigos que me han enseñado que la vida compartida es más, dándome muchas veces la fuerza que necesité para realizar estos estudios.

7. Bibliografía

- [1] W. de Souza, "Novel cell biology of *Trypanosoma cruzi*," *Am. Trypanos.*, 2003.
- [2] G. H. (Geoffrey H. Bourne, J. F. (James F. Danielli, and K. W. Jeon, *International review of cytology. Vol. 86*. Academic Press, 1984.
- [3] C. VataruNakamura, T. Ueda-Nakamura, W. Souza, S. W., Cunha, S. N.L., and P. J.B., "Visualization of the cytostome in *Trypanosoma cruzi* by high resolution field emission scanning electron microscopy using secondary and backscattered electron imaging," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 242, no. 2, pp. 227–230, Jan. 2005.
- [4] J. Gállego Berenguer, *Manual de parasitología : morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. Universitat de Barcelona, Publicacions i edicions, 2007.
- [5] D. Steverding, "The history of Chagas disease.," *Parasit. Vectors*, vol. 7, p. 317, 2014.
- [6] F. Panzera; Y. Panzera; I. Ferrandis; M. J. Ferreiro; L. Calleros; R. Perez., "Vectores de la enfermedad de Chagas: aportes e importancias de la investigación genética.," in *A 100 años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas. Contribuciones desde Uruguay*, Organización Panamericana de la Salud, 2009, pp. 197–219.

- [7] M. D. Piñeyro; A. Parodi; C. Robello., “Caracterización molecular de la respuesta al estrés físico químico en *Trypanosoma cruzi*: una estrategia de detección de factores de virulencia y blancos de acción de fármacos.,” in *A 100 años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas. Contribuciones desde Uruguay.*, Organización Panamericana de la Salud, 2009, pp. 111–121.
- [8] P. T. Cantey, S. L. Stramer, R. L. Townsend, H. Kamel, K. Ofafa, C. W. Todd, M. Currier, S. Hand, W. Varnado, E. Dotson, C. Hall, P. L. Jett, and S. P. Montgomery, “The United States *Trypanosoma cruzi* Infection Study: evidence for vector-borne transmission of the parasite that causes Chagas disease among United States blood donors,” *Transfusion*, vol. 52, no. 9, pp. 1922–1930, Sep. 2012.
- [9] <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> [Accedido: 01-05-2017]
- [10] A. Rojas de Arias, “Situación de la enfermedad de Chagas en el Continente Americano,” in *Enfermedad de Chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos.*, Hugo Cerreceto; Mercedes Gónzales, Ed. México, Laboratorios Silanes, SA de CV, pp. 17–34.
- [11] R. Tarleton, “*Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease: Cause and Effect,” *Am. Trypanos.*, pp. 107–115, 2003.
- [12] M. P. Barrett, R. J. Burchmore, A. Stich, J. O. Lazzari, A. C. Frasch, J. J. Cazzulo, and S. Krishna, “The trypanosomiasis,” *Lancet*, vol. 362, no. 9394,

pp. 1469–1480, Nov. 2003.

- [13] N. Gironès, H. Cuervo, and M. Fresno, “*Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas’ disease,” *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 296, pp. 89–123, 2005.
- [14] J. D. Maya, Y. Repetto, M. Agosín, J. M. Ojeda, R. Tellez, C. Gaule, and A. Morello, “Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*,” *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 86, no. 1, pp. 101–6, 1997.
- [15] A. Rassi, A. Rassi, and J. A. Marin-Neto, “Chagas disease,” *Lancet*, vol. 375, no. 9723, pp. 1388–1402, 2010.
- [16] H. Cerecetto and M. González, “Synthetic Medicinal Chemistry in Chagas’ Disease: Compounds at The Final Stage of ‘Hit-To-Lead’ Phase,” *Pharmaceuticals*, vol. 3, no. 4, pp. 810–838, 2010.
- [17] M. C. Field, D. Horn, A. H. Fairlamb, M. A. J. Ferguson, D. W. Gray, K. D. Read, M. De Rycker, L. S. Torrie, P. G. Wyatt, S. Wyllie, and I. H. Gilbert, “Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 15, no. 4, pp. 217–231, 2017.
- [18] S. G. Andrade and J. B. Magalhães, “Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology,” *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, vol. 30, no. 1, pp. 27–35, Feb. 1997.

- [19] A. J. Browne, C. A. Guerra, R. V. Alves, V. Maia, A. L. Wilson, D. M. Pigott, S. I. Hay, S. W. Lindsay, N. Golding, and C. L. Moyes, “Data Descriptor : The contemporary distribution of *Trypanosoma cruzi* infection in humans , alternative hosts and vectors,” pp. 1–9, 2017.
- [20] “WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis),” *WHO*, 2017. [Online]. Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. [Accesdido: 01-05-2017].
- [21] R. Salvatella and C. J. Schofield, “Enfermedad de Chagas Iniciativas para su control en Latinoamérica,” *BIOMEDICINA*, vol. 1, no. 2, 2006.
- [22] P. M. Dewick, “Medicinal Natural Products,” *Hardback*, pp. 471496405–471496413, 2002.
- [23] I. Ross, *Medicinal Plants of the World, Volume 3*. 2005.
- [24] M. M. Iwu and J. C. Wootton, *Ethnomedicine and drug discovery*. Elsevier, 2002.
- [25] D. L. V Muschietti and D. V. Martino, “Metodología empleada en el estudio de los productos naturales para el descubrimiento de fármacos con actividad tripanosomicida,” in *Enfermedad de Chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos.*, Hugo Cerreceto; Mercedes Gónzales., Ed. México, Laboratorios Silanes, SA de CV., pp. 227–251.
- [26] S. L. Croff and C. R. Weiss, “Natural Products with Antiprotozoal Activity” 1999.

- [27] J. D. Maya, B. K. Cassels, P. Iturriaga-Vásquez, J. Ferreira, M. Faúndez, N. Galanti, A. Ferreira, and A. Morello, "Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host," 2006.
- [28] S. Saeidnia, A. R. Gohari, and A. Haddadi, "Biogenic trypanocidal sesquiterpenes: lead compounds to design future trypanocidal drugs - a mini review.," *Daru*, vol. 21, no. 1, p. 35, 2013.
- [29] G. Hrckova and S. Velebny, "Pharmacological Potential of Selected Natural Compounds in the Control of Parasitic Diseases," *Pharmacol. Potential Sel. Nat. Compd. Control Parasit. Dis.*, no. Who 2002, pp. 29–99, 2013.
- [30] D. Da Silva Ferreira, V. R. Esperandim, M. P. A. Toldo, J. Saraiva, W. R. Cunha, and S. De Albuquerque, "Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids," *Parasitol. Res.*, vol. 106, no. 4, pp. 985–989, 2010.
- [31] G. Heiden, J. Ricardo, V. Iganci, and L. Macias, "*Baccharis sección sect. Caulopterae* (asteracea, astereae) no Rio Grande do Sul, Brasil," 2009.
- [32] M. V. Rodriguez, S. Gattuso, and M. Gattuso, "*Baccharis crispa* y *Baccharis trimera* (Asteraceae): Revisión y nuevos aportes para su normalización micrográfica," *Lat. Am. J. Pharm.*, vol. 27, no. 3, pp. 387–397, 2008.
- [33] C. M. Fernandes Geraldo, Silva Jhonathan, Espírito-Santo Mário, Fagundes

- Marcílio , Oki Yumi, “*Baccharis* : A Neotropical Model System to Study Insect Plant Interactions,” in *Neotropical Insect Galls*, 2013, pp. 193–219.
- [34] L. G. Verdi, I. M. C. Brighente, and M. G. Pizzolatti, “Género *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econ??micos e biológicos,” *Quim. Nova*, vol. 28, no. 1, pp. 85–94, 2005.
- [35] D. A. Giuliano, “Clasificación infragenérica de las especies Argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae),” *Darwiniana*, vol. 39, no. 1–2, pp. 131–154, 2001.
- [36] J. Manfron Budel and M. do Rocio Duarte, “Macro and microscopic characters of the aerial vegetative organs of carqueja: *Baccharis usterii* heering,” *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, vol. 53, no. 1, pp. 123–131, 2010.
- [37] A. Schneider, G. Heiden, and I. I. Boldrini, “Notas Nomenclaturais em *Baccharis* L. sect. Caulopterae DC (Asteraceae),” *Rev. Bras. Biociências*, vol. 7, no. 2, pp. 225–228, 2009.
- [38] S. A. & B. Ilsi, “Microsculpture of cypselae surface of *Baccharis* sect. Caulopterae (Asteraceae) from Brazil,” *An. Jard. Bot. Madrid*, vol. 68, pp. 107–116, 2011.
- [39] L. G. Verdi, I. Maria, C. Brighente, G. Pizzolatti, D. De Química, U. Federal, and D. S. Catarina, “Revisão,” vol. 28, no. 1, pp. 85–94, 2005.
- [40] S. Q. De Oliveira, F. Dal-Pizzol, J. C. F. Moreira, E. P. Schenkel, and G.

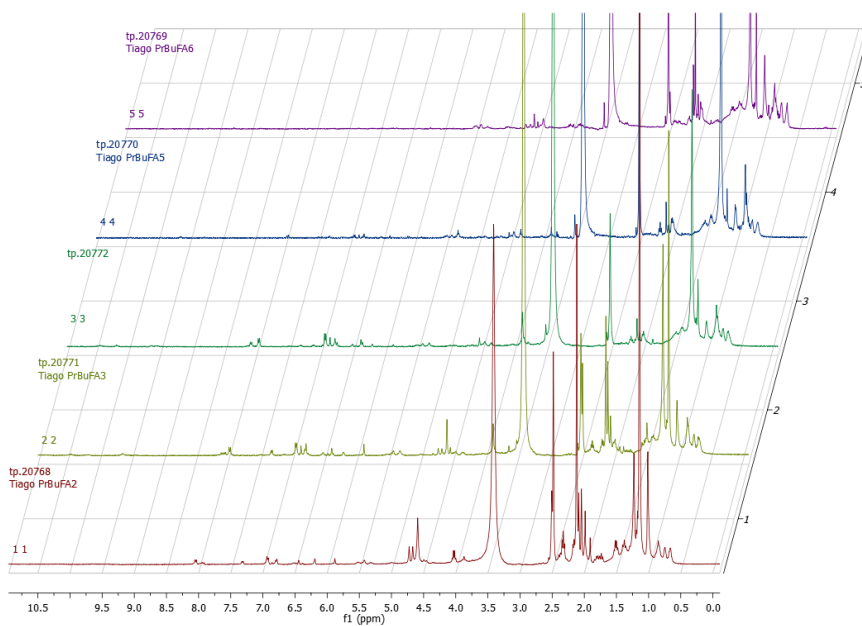
- Gosmann, "Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*," *Acta Farm. Bonaer.*, vol. 23, no. 3, pp. 365–368, 2004.
- [41] S. Q. De Oliveira, "composição química e análise biológica de espécies do gênero *Baccharis*," 2008.
- [42] M. Jose Abad Martinez, A. Latourrette Bessa, and P. Bermejo Benito, "biologically active substances from the genus *Baccharis l.* (compositae)," *Stud. Nat. Prod. Chem.*, vol. 30, pp. 703–759, 2005.
- [43] C. A. Simões-Pires, S. Debenedetti, E. Spegazzini, L. A. Mentz, N. I. Matzenbacher, R. P. Limberger, and A. T. Henriques, "Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): A taxonomic approach," *Plant Syst. Evol.*, vol. 253, no. 1–4, pp. 23–32, 2005.
- [44] C. a Simões-Pires, E. F. Queiroz, A. T. Henriques, and K. Hostettmann, "Isolation and On-line Identification of Anti-oxidant Compounds from Three *Baccharis* Species by HPLC-UV-MS / MS with Post-column Derivatisation," *Phytochem. Anal.*, vol. 16, no. June 2004, pp. 307–314, 2005.
- [45] V. Sülsen, C. Güida, J. Coussio, C. Paveto, L. Muschiatti, and V. Martino, "In vitro evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine," *Parasitol. Res.*, vol. 98, no. 4, pp. 370–374, 2006.
- [46] S. dos S. Grecco, J. Q. Reimo, A. G. Tempone, P. Sartorelli, R. L. O. R. Cunha,

- P. Romoff, M. J. P. Ferreira, O. A. Favero, and J. H. G. Lago, "In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae)," *Exp. Parasitol.*, vol. 130, no. 2, pp. 141–145, 2012.
- [47] J. V. Ubillos, H. Cerecetto, D. M. González, and G. D. Q. Medicinal, "Fraccionamiento bioguiado del extracto hidro-etanólico de *Aristeguetia glutinosa* Lam . y elucidación estructural de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi*," Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay., 2011.
- [48] J. Varela, E. Serna, S. Torres, G. Yaluff, N. I. V. De Bilbao, P. Miño, X. Chiriboga, H. Cerecetto, and M. González, "In vivo anti-*Trypanosoma cruzi* activity of hydro-ethanolic extract and isolated active principles from *Aristeguetia glutinosa* and mechanism of action studies," *Molecules*, vol. 19, no. 6, pp. 8488–8502, 2014.
- [49] J. Varela, "Resumen del poster presentado en ENAQUI 2015," in *ENAQUI 2015*, 2015.
- [50] J. Varela; H. Cerecetto y M. González, "Búsqueda de actividad anti-*Trypanosoma cruzi* en plantas del Uruguay," Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay, 2016.
- [51] E. Birriel; M. González; J. Varela, "Fraccionamiento bioguiado de *Baccharis trimera* en búsqueda de agentes anti- *T . cruzi*," Universidad de la República,

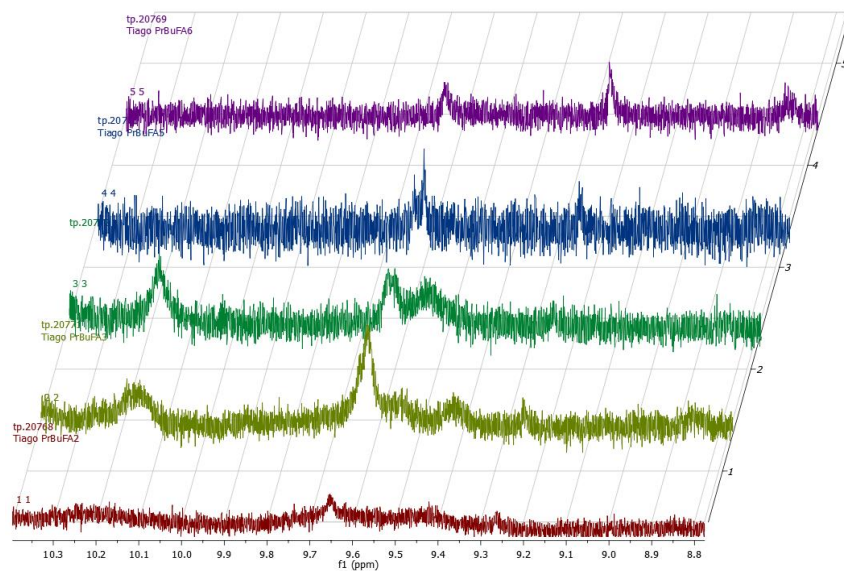
Montevideo, Uruguay., 2013.

- [52] E. U. G Seoane, S Onetto, M Risso, *Tablas espectroscópicas para elucidación estructural*. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay: Comisión Sectorial de Educación Permanente, 2009.
- [53] Ancizu, S.; Moreno, E.; Torres, E.; Burguete, A.; Pérez-Silanes S.; Benítez, D.; Villar, R.; Solano B.; Marín, A.; Aldana, I.; Cerecetto, H.; González, M.; Monge, A. Heterocyclic-2-carboxylic acid (3-cyano-1,4-di-N-oxide quinoxalin- 2-yl) amide derivatives as hits for the development of neglected disease drugs. *Molecules* 2009, 14, 2256 - 72.

8. Anexo 1

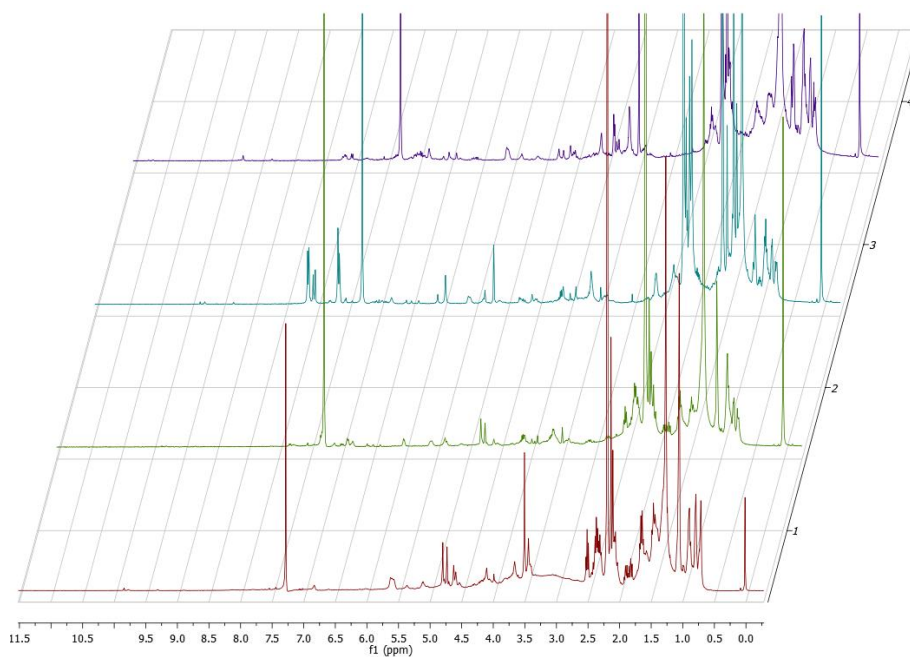


A



B

Figura anexo 1 Espectros $^1\text{H-RMN}$ realizados en CDCl_3 , con TMS como referencia interna, apilados de las fracciones obtenidas por cromatografía preparativa corrida con fase móvil 1:1:1 (Hex:AcOEt:CHCl₃). En **A** se observa el espectro entero de RMN mientras que en **B** se muestra la zona de 9-10 ppm expandida.

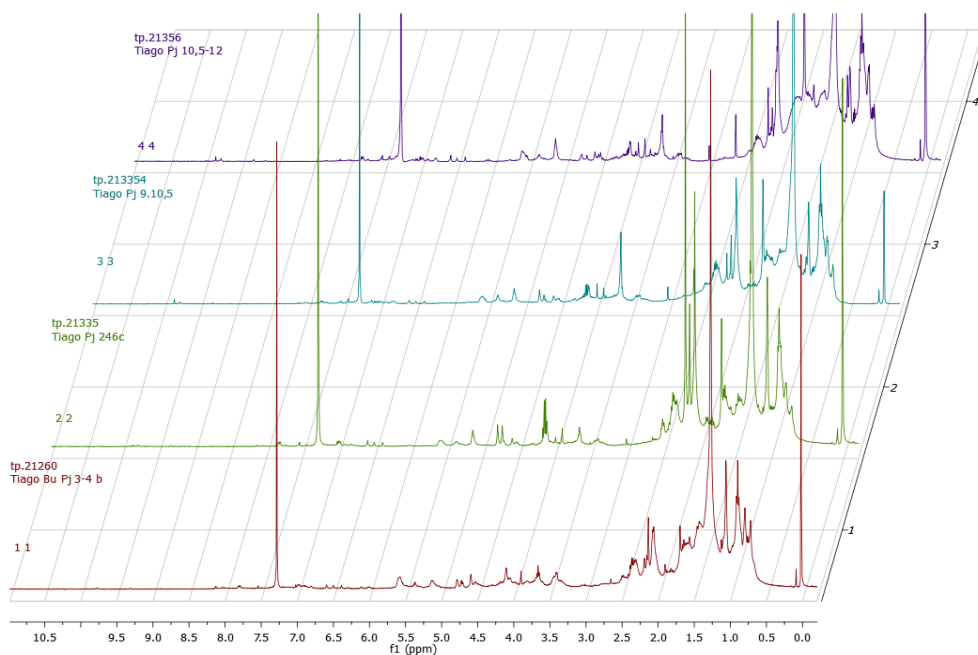


A

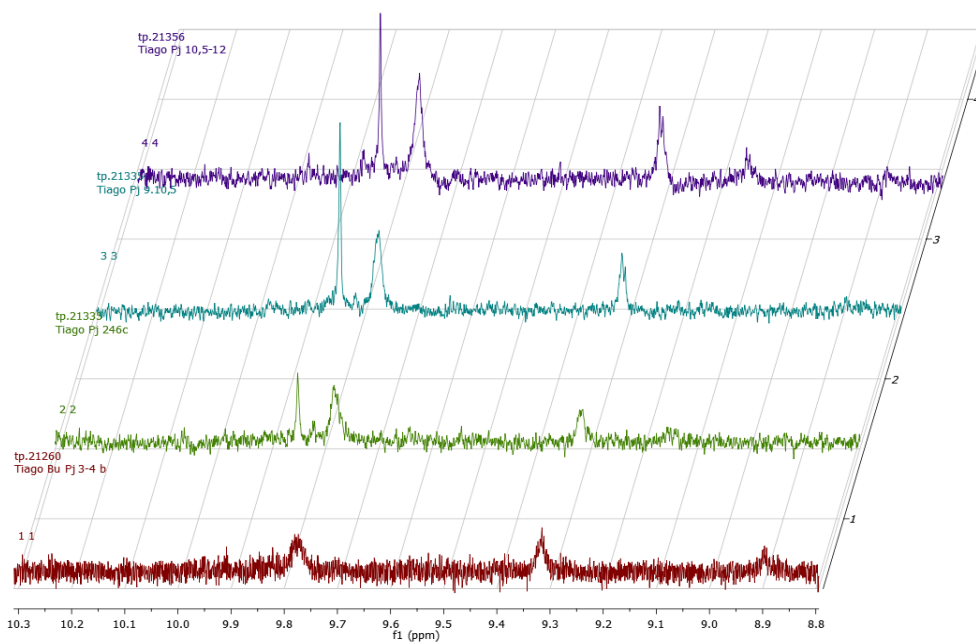


B

Figura anexo 2 Espectros ¹H-RMN realizados en CDCl₃, con TMS como referencia interna, apilados de las fracciones obtenidas por cromatografía preparativa corrida con fase móvil 1:1:1 + 1:1:4 (Hex:AcOEt:CHCl₃). En **A** se observa el espectro entero de RMN mientras que en **B** se muestra la zona de 9-10 ppm expandida.



A



B

Figura anexo 3 Espectros ^1H -RMN realizados en CDCl_3 , con TMS como referencia interna, apilados de las fracciones obtenidas por cromatografía preparativa corrida con fase móvil 1:4 ($\text{AcOEt}:\text{CHCl}_3$). En **A** se observa el espectro entero de RMN mientras que en **B** se muestra la zona de 9-10 ppm expandida.