

Fraccionamiento bioguiado de *Baccharis trimera* en búsqueda de agentes anti-*T. cruzi*



Estefania Birriel

Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias - Universidad de la República

Diciembre 2013

Tutores: Dra. Mercedes González; Lic. Javier Varela Ubillos

Resumen

La enfermedad de Chagas es provocada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Dado que los actuales tratamientos farmacológicos presentan una gran cantidad de efectos no deseados, resulta prioritario desarrollar nuevas alternativas de tratamiento, que puedan prevenir o disminuir los efectos crónicos de la enfermedad de Chagas y ofrecer una mejoría en la calidad de vida de los pacientes.

Basados en que agentes antifúngicos han sido descritos como inhibidores de crecimiento del parásito y que especies pertenecientes a la flora uruguaya han sido descritas con esta propiedad es que se decide incursionar en la búsqueda de agentes anti-tripanosomatídeos en plantas del Uruguay. Particularmente se han hecho numerosos estudios en especies pertenecientes a la familia de las Asteraceae, dado que muchos de sus miembros se han caracterizado por presentar lactonas sesquiterpénicas entre sus metabolitos secundarios, que han mostrado ser muy buenos inhibidores del crecimiento de *T. cruzi*. Resultando así, *Baccharis trimera*, comúnmente conocida como “carqueja” una buena candidata para estudiar.

En el marco de esta tesina de grado se realizó un fraccionamiento bioquímico de la carqueja, en el cual se fue aumentando gradualmente la polaridad de los disolventes de extracción, obteniéndose así tres fracciones: hexano, acetato de etilo y metanol. Resultando ser la fracción enriquecida en componentes químicos más apolares, fracción hexano, la que presenta mayor actividad antiproliferativa y buena selectividad hacia el parásito, seguida por la fracción acetato de etilo. La composición de los metabolitos de la fracción hexano y acetato se caracterizó por técnicas fitoquímicas y de ¹H RMN demostrando la presencia de terpenoides y flavonoides respectivamente.

Índice

1. Introducción	2
1.1. Enfermedad de Chagas	2
1.2. Plantas medicinales	7
1.3. <i>Baccharis</i>	9
1.3.1. Descripción botánica	10
1.4. Antecedentes	11
2. Objetivos	15
2.1. Objetivo general.	15
2.2. Objetivos específicos.	15
3. Materiales y métodos	17
3.1. Recolección del material vegetal	17
3.2. Preparación de los extractos	17
3.3. Caracterización fitoquímica	19
3.3.1. Análisis cromatográfico	19
3.3.1.1. Reactivo vainillin-sulfúrico.	19
3.3.2. Reactivos empleados para identificación de grupos químicos	19
3.3.2.1. Detección de esteroides/terpenos	19
3.3.2.1.1. Preparación de reactivo de Lieberman-Burchard	20
3.3.2.2. Detección de flavonoides	20
3.3.2.2.1. Preparación del Reactivo de Shinoda	20
3.4. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear	20
3.5. Ensayo biológico de actividad antiproliferativa anti- <i>T. cruzi</i> .	21
3.6. Ensayo de citotoxicidad en macrófagos murinos	22
4. Resultados y discusión	25

4.1. Fraccionamiento bioguiado	25
4.2. Caracterización fitoquímica	27
4.2.1. Análisis cromatográfico	27
4.2.2. Reacciones químicas de caracterización fitoquímica	33
4.2.3. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear	35
5. Conclusión	50
6. Bibliografía	52
7. Agradecimientos	60
8. Anexo	62
8.1. Anexo I	62
8.2. Anexo II	68

Introducción

1. Introducción

1.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es producida por el protozooario flagelado *Trypanozoma cruzi* (*T. cruzi*). Lleva el nombre de Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico brasileño que la descubrió en 1909, el cual dedicó gran parte de su vida al estudio de esta enfermedad caracterizando al vector, su hospedador, sus manifestaciones clínicas y su epidemiología [1].

Se trata de una enfermedad endémica que afecta a millones de personas generando problemas sanitarios, económicos y sociales en los países afectados, está ampliamente difundida en América Central y del Sur, afectando a 21 países en la región [2]. Se ha estimado que alrededor de 100 millones de personas viven bajo permanente riesgo de contraer la enfermedad, desde México a Argentina, de los cuales 24 millones estarían infectados por el parásito y 6 millones serían cardiopatas debido a la Enfermedad de Chagas. La inmensa mayoría de estas personas procede de áreas rurales pobres, atestadas de vinchucas, habitando ranchos de barro y paja. Esta enfermedad se encuentra asociada a la pobreza razón por la cual muchas veces es estigmatizada [3,4].

Se transmite vectorialmente a través de diversas especies de insectos triatomíneos. El principal vector intradomiciliario es *Triatoma infestans*; el cual habita en las grietas de las casas rurales y sale por las noches para alimentarse [5].

El ciclo se inicia cuando el insecto vector, comúnmente conocido como “vinchuca”, ingiere sangre de hombres o mamíferos infectados y pica posteriormente a individuos sanos depositando con sus heces los parásitos. Los cuales al rascarse ingresan en la herida los *T. cruzi*. No obstante, se han descrito otros mecanismos de transmisión no

vectorial, como la transmisión a través de transfusiones con sangre contaminada, trasplante de órganos infectados, la transmisión vertical de madre a hijo y más recientemente transmisión por ingestión de alimentos contaminados con el parásito [6,7].

El *Trypanosoma cruzi* presenta un ciclo de vida bastante complejo con distintas formas a lo largo de su ciclo evolutivo. En el insecto vector se pueden observar diferentes estadios. En el estómago del vector ocurre la fase denominada esferomastigote, se caracteriza por presentar una forma redondeada; el estadio epimastigote se encuentra en el intestino del vector, en esta etapa el *Trypanosoma cruzi* se multiplica intensamente por división binaria; y por último se encuentra el estadio tripomastigote metacíclico, que es la forma infectante para el huésped vertebrado [8,9].

Cuando el insecto se alimenta de sangre humana, defeca sobre la piel del hospedero, liberando en las heces parásitos en la forma tripomastigote metacíclicos. Una vez que estos ingresan al organismo, los tripanosomas se diseminan por vía hemática o linfática, afectando diversos órganos principalmente el corazón, sistema nervioso, músculo y aparato digestivo. Una vez que los parásitos llegan a los tejidos se reproducen, pasando por una etapa no flagelada, denominada amastigote, los cuales son capaces de multiplicarse activamente formando pseudoquistes, en donde se van a transformar a tripomastigotes que luego van a ser liberados (Figura 1.1) [10].

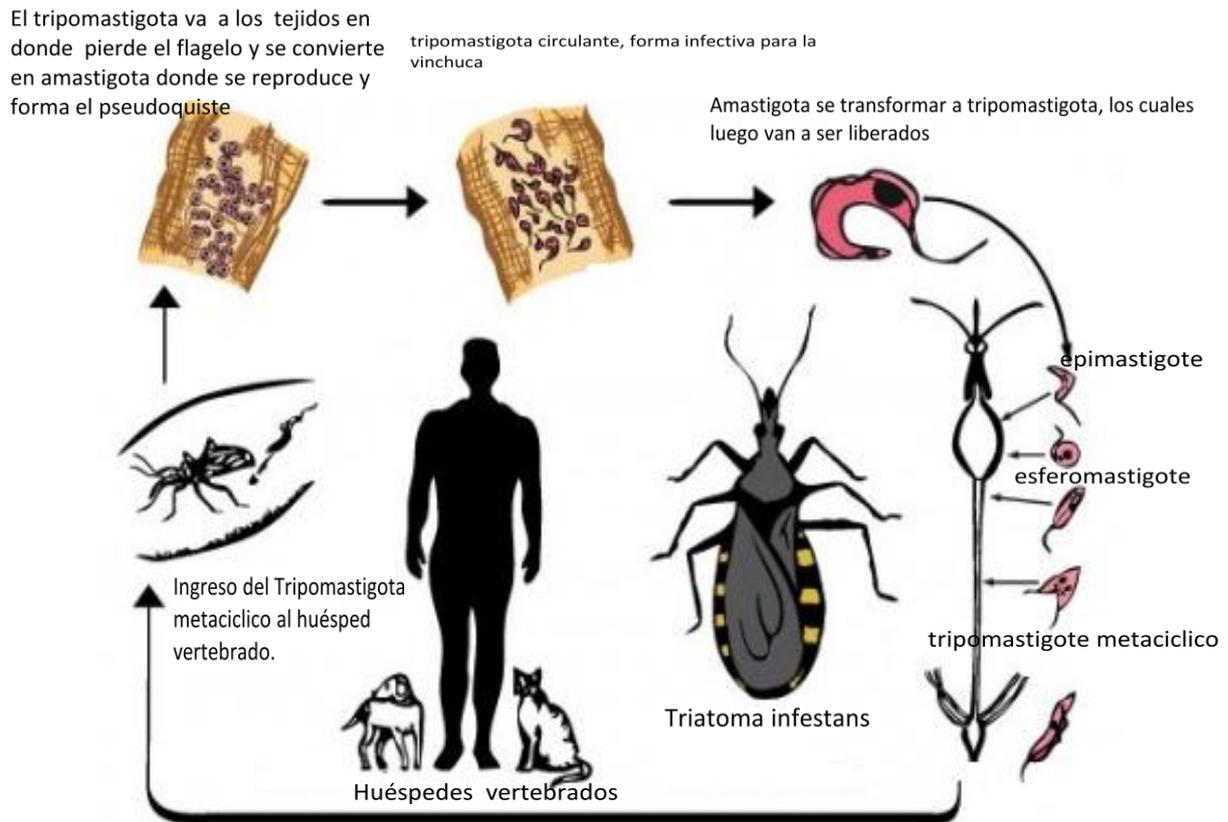


Figura 1.1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* [10].

Se estima que el período de incubación de la enfermedad es de entre 5 a 12 días relativo a cada caso, al igual que la aparición de los síntomas y la intensidad de los mismos. Muchas veces no se presenta sintomatología por lo que el diagnóstico a tiempo puede ser muy difícil. En los individuos afectados con el paso del tiempo comienzan a surgir serias afecciones cardíacas y digestivas las cuales pueden derivar en la muerte [11].

Es posible observar tres etapas bien definidas de la enfermedad. La primera de ellas se denomina aguda o inicial, la cual presenta una duración aproximada de dos a cuatro meses tras la infección. En esta etapa muchas personas no presentan síntomas. La mayoría de los pacientes que presentan síntomas sufren fiebre variable, malestar general, irritabilidad, dolor de cabeza, crecimiento de hígado, bazo y

ganglios. Cuando la inoculación es cercana al área ocular se observa el característico chagoma así como un edema unilateral de ambos párpados (Figura 1.2) [12]. En esta etapa se puede encontrar al parásito en sangre. Algunos casos agudos pueden llegar a ser mortales. Muchos de estos resultan ser niños pequeños y pacientes que están inmunodeprimidos (por ej. personas infectadas con VIH), que pueden desarrollar miocarditis aguda o meningoencefalitis [13].



Figura 1.2. Fotografía de niño afectado con signo de Romaña [12].

Una segunda etapa indeterminada o también denominada latente, en la cual la parasitemia se vuelve indetectable y suele ser asintomática. Presenta una duración variable. Suele ocurrir entre la semana 8 ó 10 de la fase aguda. Puede durar meses o incluso años. Se estima que aproximadamente el 30% de los individuos que llegan a esta etapa desarrollan problemas digestivos, cardíacos y neurológicos [14].

Por último la fase crónica, la cual aparece de forma tardía. Se caracteriza por presentar problemas cardíacos e intestinales. Puede ocurrir muerte súbita sin que el individuo desarrolle problemas cardíacos [15].

El diagnóstico de esta enfermedad es relativo a la etapa en la que se encuentre el paciente. Se pueden emplear métodos directos (observación microscópica directa, xenodiagnóstico, PCR, entre otros) basados en la detección de material genético o de

parásitos, o también métodos indirectos (ELISA, IFI, Western blot, entre otros) basados en la detección de anticuerpos específicos contra *T. cruzi*, utilizados principalmente en la etapa crónica, ya sea sintomática o asintomática. Estos suelen ser empleados fundamentalmente en la fase aguda, en el caso de tratarse de personas inmunodeprimidas o menores de 6 meses [16].

En cuanto al tratamiento para esta enfermedad, sólo existen 2 fármacos, los cuales fueron desarrollados hace más de 30 años. Estos son Nifurtimox (Nfx, *N*-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil)metanimina, Lampit®, producido por Bayer actualmente no comercializado por este laboratorio), el cual presenta efecto sobre tripomastigotes y amastigotes y se utiliza tanto en casos agudos como crónicos y Benznidazol (Bnz, *N*-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida, Rochagan®, producido por Roche, ahora producido por LAFEPE en Brasil) se emplea en pacientes que se encuentren en fase aguda, casos congénitos y también en pacientes crónicos (Figura 1.3) [17].

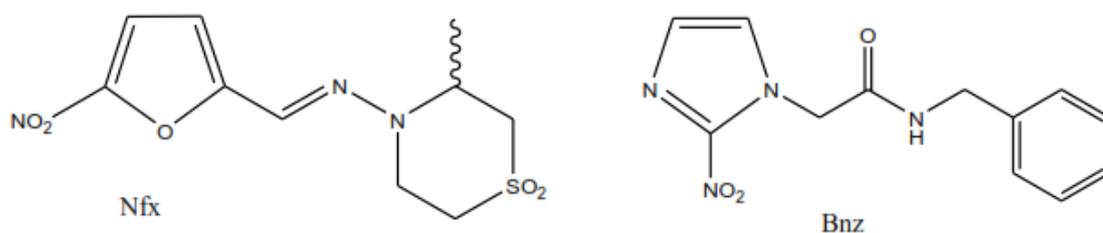


Figura 1.3. Estructuras químicas de los fármacos Nifurtimox (NFX) y Benznidazol (Bnz).

Ambos fármacos afectan el metabolismo redox del parásito reduciendo las concentraciones de glutatión, tripanotona y glutatiónil espermidina [18].

Estos medicamentos son nitroheterociclos que presentan significativos efectos adversos. Por ejemplo Nifurtimox suele asociarse a dolor abdominal, anorexia, náuseas, vómitos, trastornos neurológicos. Por otra parte, Benznidazol puede generar

erupción cutánea, depresión de médula ósea, neuropatía periférica, posee efecto carcinogénico, entre otras patologías [19].

Para lograr una disminución en la transmisión es fundamental implementar actividades de control vectorial y no vectorial. Con una constante vigilancia, un correcto diagnóstico y tratamientos apropiados para las personas afectadas. En cuanto a la situación actual de nuestro país desde 1997 Uruguay fue declarado por la Organización Panamericana de la Salud como el primer país de América Latina que logró erradicar el insecto vector.

1.2. Plantas medicinales

Desde la antigüedad se ha implementado en la cultura popular la utilización de plantas medicinales como alternativa para el tratamiento de diferentes tipos de afecciones. Estos remedios caseros se conocían comúnmente con el nombre de medicamentos y su empleo era resultado de la observación y la experiencia. La concepción actual de medicamento dista mucho de la concepción que se tenía antiguamente en el uso de extractos [20].

Este saber que se ha ido transmitiendo de generación en generación se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo a través de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos, que tienen como objetivo la búsqueda de los principios activos para obtener así una explicación más racional de su uso y efecto [21].

Estas drogas de origen vegetal que se suministran con fines curativos pueden estar constituidas por la planta entera, por alguna de sus partes (hojas, raíces, corteza, etc.) o por algún producto derivado de las mismas [22].

Desde mediados del siglo XX, la química vegetal o fitoquímica ha sido una herramienta muy importante para la obtención de extractos de hierbas, usados como

medicamentos. La extracción de los principios activos por medio de la fitoquímica se basa en conceptos básicos de la polaridad de las moléculas. De acuerdo a los mismos, se han desarrollado técnicas analíticas de separación, que facilitan la obtención de perfiles químicos detallados, lo que a su vez permite la identificación y el aislamiento de moléculas bioactivas con mayor rapidez y precisión [23].

Las plantas presentan dos tipos básicos de metabolismo: primario y secundario. Dentro de los productos del metabolismo primario se encuentran carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. En el caso del metabolismo secundario, se pueden encontrar productos a los cuales se les adjudica diversas propiedades, un ejemplo es la defensa contra patógenos, entre otras funciones ecológicas [24]. Los metabolitos secundarios, incluyen terpenoides, alcaloides, fenilpropanoides y policétidos, entre otros, corresponden a un grupo muy amplio conformado por moléculas pequeñas, que no son estrictamente necesarias para la supervivencia del organismo pero si le ofrecen ciertos beneficios [25].

En la medicina popular los métodos de extracción más empleados son relativamente sencillos, suele utilizarse como disolvente más común el agua. Algunas de las técnicas más empleadas son las infusiones, que consisten en la extracción con agua a ebullición, dejando actuar unos minutos y luego se procede al filtrado. Otra técnica muy utilizada es la decocción, que se suele utilizar en el caso de tratarse de drogas duras como por ejemplo cortezas o raíces. Esta técnica consiste en la extracción a través de agua a ebullición, luego se deja enfriar y se filtra. Otra alternativa muy utilizada es la maceración la cual consiste en dejar actuar agua fría durante unos días. Las sustancias activas generan reacciones muy diversas en el organismo, esto depende de la naturaleza química de la droga, la concentración y la forma de

administración. La concentración de la misma es muy importante dado que en pequeñas dosis puede generar efectos que pueden llegar a ser beneficiosos, pero dosis superiores pueden ser muy tóxicas [26].

La mayor parte de la población de los países en desarrollo no tiene acceso a los medicamentos, siendo esta la razón fundamental del uso de plantas medicinales, dado que es una alternativa más económica para las poblaciones pobres [27,28].

Las plantas medicinales contienen normalmente más de una sustancia activa e inactiva, estas últimas pueden afectar de distinta manera a los componentes más activos, por ejemplo los taninos pueden formar complejos con los componentes activos, haciendo que éstos sean liberados de manera gradual. Para mantener la actividad los distintos componentes deben mantener cierto equilibrio. Razón por la cual hay que tener especial cuidado en diversos factores que pueden ejercer ciertas variaciones en la composición química, como por ejemplo forma de cultivo (condiciones climáticas, suelo, época del año) almacenamiento (evitar descomposición por efectos de la luz o enzimático), procesamiento, entre otras [21,29].

1.3. *Baccharis*

El género *Baccharis* pertenece a la familia de las Asteraceae, éste se encuentra integrado por más de 500 especies ampliamente distribuidas en Latinoamérica [30].

Las especies pertenecientes a este género presentan un elevado valor socioeconómico en muchas regiones dado que suelen ser empleadas en la medicina popular para el tratamiento de numerosas afecciones [31]. En muchas culturas se conocen bajo el nombre de “carqueja” a varias especies de este género entre ellas se encuentran *B. articulata*, *B. cylindrica*, *B. gaudichaudiana*, *B. microcephala*, *B. stenocephala* y *B. trimera* (Figura 1.4). Particularmente esta última suele emplearse

como analgésico, en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, úlceras, infecciones y diabetes. Existen descripciones previas que la misma posee propiedades antiinflamatoria, modulador del sistema inmune, antifúngico, antioxidante y antimicrobiano [32-35].



Figura 1.4. Fotografía de *Baccharis trimera* en flor.

1.3.1. Descripción botánica

Baccharis trimera es una especie dioica (individuos masculinos y femeninos separados), excepcionalmente monoicas o polígamo-dioicas. Se caracteriza por ser arbustos o hierbas, de 40 a 70 cm de altura, el cual no presenta pelos, es muy ramosa con tallos con tres alas y hojas muy reducidas o nulas. Posee capítulos dispuestos en forma de espiga en los extremos de las ramas, los masculinos de forma globosa y los femeninos cilíndricos [36]. Las plantas pistiladas están constituidas por flores pistiladas (raramente puede haber algunas flores estaminadas centrales) y en las plantas estaminadas por flores morfológicamente perfectas pero funcionalmente estaminadas por atrofia del ovario. El fruto es muy pequeño, ligeramente comprimido y

provisto de pappus. Presenta un período de floración entre los meses de febrero y abril, incluso hasta junio. El fruto madura desde marzo hasta principios de mayo [37,38].

En distintos tipos de *Baccharis* se destaca la presencia de flavonoides: santonina, absintina, luteolina, quercetina, genkwanina, acacetina, 7,4-dimetil-apigenina, circimartina, salvigenina, jaceidina, jaceosidina, chondrillasterol; diterpenos: de tipo neoclerodano (articulina I y acetato de articulina) y triterpenos: óxido de baccharis y ácido oleanólico [39,40]. 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]. En cuanto a la composición química de las flores han sido descritos un diterpeno furánico o barticulidiol, un diterpeno clerodano, la bachotricuneatina A y también un diéster de malonato [42].

1.4. Antecedentes

Recientemente en el Grupo de Química Medicinal, Facultad de Ciencias-Facultad de Química, UdelaR se realizó el estudio de la actividad anti-*T. cruzi* de la planta ecuatoriana *Aristiguieta glutinosa* Lam. ("Matico"). "Matico" fue seleccionada para su estudio dado que está descrito su uso como agente antifúngico y que es reconocido que éstos pueden también afectar a parásitos. Se comprobó que el extracto hidro-etanólico de la parte aérea de la misma presentaba una destacada actividad tanto *in vitro* como *in vivo* frente al parásito. Además se identificaron dos componentes responsables de la actividad, los cuales pertenecen a la familia de los diterpenos tipo labdano [43,44].

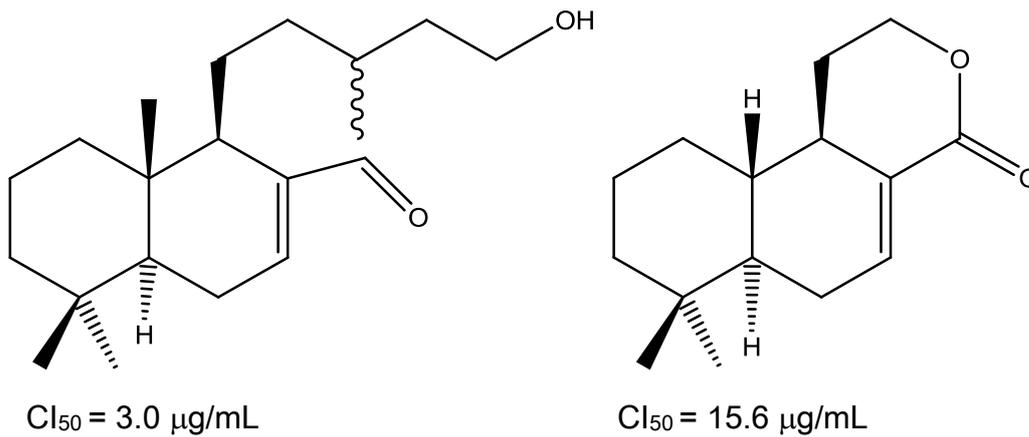


Figura 1.5. Estructura química de diterpenos tipo labdano aislados de *Aristiguieta glutinosa* Lam. ("Matico") con sus respectivas concentraciones inhibitorias de crecimiento del 50% de *Trypanosoma cruzi* [43,44].

En base a estos resultados se inició una búsqueda de especies silvestres que reuniesen similares características que "Matico", como por ejemplo que presenten propiedades antifúngicas, antibacterial y metabolitos secundarios provenientes de la familia de los labdanos. Nuestro grupo se centró en la identificación de especies uruguayas con actividad antifúngica ya que una gran cantidad de agentes antifúngicos han sido descritos como buenos inhibidores del crecimiento de *Trypanosoma cruzi* [45]. Particularmente se han hecho numerosos estudios en especies pertenecientes a la familia de las Asteraceae, dado que muchos de sus miembros se han caracterizado por presentar compuestos pertenecientes a la familia de las lactonas sesquiterpénicas, que han mostrado ser muy buenos inhibidores del crecimiento de *T. cruzi*, incluso a muy bajas concentraciones [46,47]. Es así que se investiga el efecto del extracto hidro-etanólico de las hojas de *Baccharis trimera* en un cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* obteniéndose una destacada actividad inhibitoria de crecimiento (Cl₅₀= 79.5 µg/mL). Por otra parte se evaluó el extracto frente a células

mamíferas, macrófagos murinos J774, con el fin de determinar su selectividad frente al parásito, obteniéndose un CI_{50} 76.1 $\mu\text{g/mL}$. Por lo que se propuso en este trabajo de tesina de grado el estudio bioguiado de *Baccharis trimera* en la búsqueda de fracciones más activas y selectivas frente a *T. cruzi*.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

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

2.2. Objetivos específicos

- Recolectar *Baccharis trimera* en tres estaciones climáticas distintas y realizar la identificación botánica de las muestras.
- Realizar el fraccionamiento bioguiado de la parte aérea de *Baccharis trimera* utilizando disolventes con gradiente de polaridad creciente: hexano, acetato de etilo y metanol.
- Evaluar la actividad biológica de las fracciones obtenidas frente a la forma epimastigote de *T. cruzi*.
- Evaluar la toxicidad inespecífica de las fracciones frente a células mamíferas, macrófagos murinos J774.
- Realizar un acercamiento a la caracterización fitoquímica de los principios activos mediante cromatografía en capa fina, reactivos específicos de reconocimiento de metabolitos secundarios y espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.

Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1. Recolección del material vegetal

La especie estudiada fue colectada por el Lic. Javier Varela en 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, Cátedra de Botánica de la Facultad de Química, UdelaR. Un ejemplar fue depositado en el Herbario de la Facultad de Química con el N° 4402 (Figura 3.1).



Figura 3.1. Fotografía de *Baccharis trimera* depositada en el herbario de Facultad de Química, UdelaR, N° 4402.

3.2. Preparación de los extractos

Se seleccionaron las partes aéreas de la planta, la cuales se secaron hasta peso constante en estufa a 50 °C sin contacto con la luz para detener la acción de diversas enzimas, garantizándose así la conservación de los componentes de la planta. Una vez seca se sometió a molienda. Luego se realizaron sucesivas maceraciones, partiendo de una masa constante de material vegetal (10 gramos), al cual se le realizó tres maceraciones con cada uno de los disolventes, con un aumento

progresivo de la polaridad. Se partió de un disolvente de baja polaridad (hexano), seguido por acetato de etilo de polaridad intermedia y por último metanol de polaridad alta (Figura 3.2).

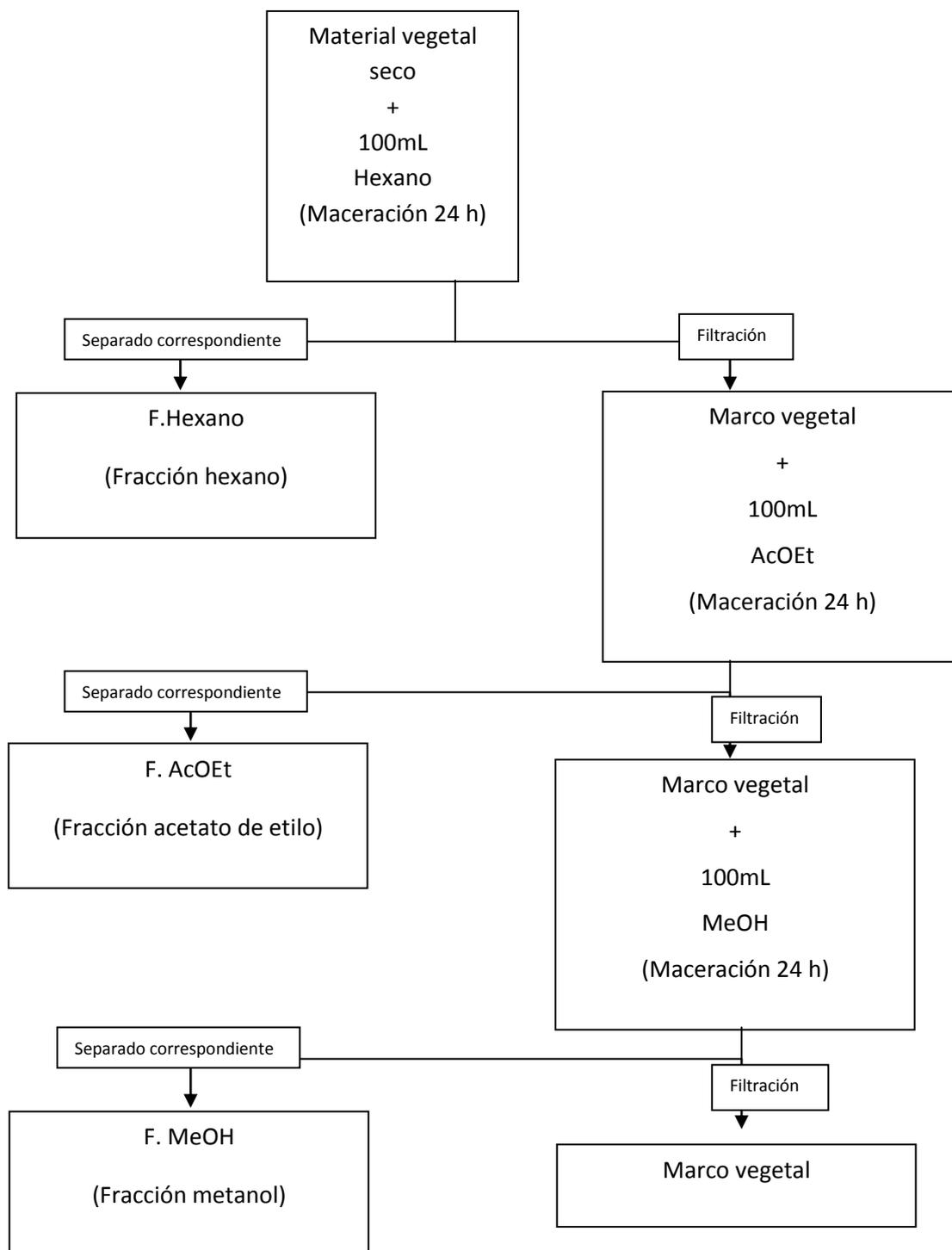


Figura 3.2. Diagrama de flujo utilizado para la obtención de los diferentes extractos.

Los tres extractos obtenidos en cada una de las maceraciones fueron reunidos luego de filtrado y los diferentes disolventes se evaporaron a sequedad a presión reducida, utilizando un evaporador rotatorio a vacío a una temperatura no mayor de 40 °C.

3.3. Caracterización fitoquímica

3.3.1. Análisis cromatográfico

Las distintas fracciones obtenidas fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina (TLC de sus siglas en inglés), en la cual se utilizó como fase móvil hexano: acetato de etilo (9:1) y como fase estacionaria sílica gel. Para la preparación de las muestras a sembrar se utilizó siempre una concentración de 5 mg/mL, se sembró con capilar para recolección de sangre siempre 3 gotas de cada una de las fracciones. Se utilizaron como reveladores universales, luz UV 254 nm y vapores de yodo. Además se empleó el revelador específico vainillin-sulfúrico para detectar componentes terpenoides.

3.3.1.1. Reactivo vainillin-sulfúrico [48]

Para la preparación del mismo se disolvió 1 g de vainillina en 4 mL de HCL y en 5 mL de H₂SO₄. Se llevó a un volumen final de 100 mL con metanol. Se rociaron las placas y posteriormente se calentó en estufa a 110 °C durante 15 minutos.

3.3.2. Reactivos empleados para identificación de grupos químicos

3.3.2.1. Detección de esteroides/terpenos [49,50]

El reactivo de Lieberman-Burchard se emplea para la observación de los distintos compuestos orgánicos, triterpenos (al revelar presenta color morado) y esteroides, cuya coloración varía en el tiempo, va desde el color rosado al verde y posteriormente al pardo, entre otros.

3.3.2.1.1. Preparación del reactivo de Lieberman-Burchard

Se mezcló 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, se enfría a 0 °C y se le añadió una gota de ácido sulfúrico. Gota a gota se añadió este reactivo a la muestra. La prueba será positiva si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, etc.

3.3.2.2. Detección de flavonoides [51]

La reacción de cianidina o también conocida como Shinoda, permite el reconocimiento de flavonoides. Esta reacción se fundamenta en que, al poner en contacto ácido clorhídrico con magnesio metálico se genera hidrógeno, el cual es capaz de reducir al flavonoide dando una coloración característica. Si en estas condiciones se observa la aparición de coloración rojiza, violeta o naranja, se considera positivo para compuestos con el núcleo de la γ -benzopirona (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, isoflavonoides y xantonas).

3.3.2.2.1. Preparación del reactivo de Shinoda

Se resuspendieron 5 mg de la fracción en estudio en una solución etanólica en agua a la cual se le adiciona luego limaduras de magnesio. Seguidamente se adicionó HCl concentrado, gota a gota, hasta que se visualice desprendimiento de hidrógeno.

3.4. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear [52]

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se realizan a 22.16 °C en un equipo Bruker AVANCE DPX-400 que trabaja con el programa Topspin 1.3. Las muestras se preparan disolviendo 20 mg del extracto correspondiente en 0.6 mL de DMSO-d₆ (0.05 % de TMS como referencia interna). Los espectros se procesan usando el programa MestRe-C NMR [53]. Los espectros de ¹H-RMN se adquirieron a 400.132 MHz usando un pulso de 90, con un tiempo de adquisición de 1.3664 segundos, abarcando un

ancho espectral de 14.983 ppm y realizando 28 escanes. Los espectros de correlación homonuclear (^1H - ^1H COSY) y heteronuclear (^1H - ^{13}C) se adquieren y procesan utilizando los parámetros incluidos en el software del equipo.

3.5. Ensayo biológico de actividad antiproliferativa anti-*T. cruzi* [54]

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 (0.02g/L), D-(+)-glucosa (0.3 g/L), estreptomycin (0.2 g/L) y penicilina (200000 U/L) complementado con 10 % de suero fetal bovino. 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 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 y se agregan inmediatamente a cada pocillo para dar concentraciones decrecientes (200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6.25 µg/mL). Los parásitos se incuban 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 [55]. El porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito se calcula como: $\text{PIC} = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} \times 100$, donde A_p es A_{610} del cultivo conteniendo el compuesto al día 5; A_{0p} es A_{610} del cultivo conteniendo el compuesto inmediatamente luego de la adición del compuesto (día 0); A_c es A_{610} del cultivo en ausencia de compuesto (control negativo) al día 5; A_{0c} es A_{610} en ausencia del compuesto al día 0. La CI_{50} corresponde a la

concentración del extracto capaz de provocar un 50 % de inhibición de crecimiento. Esta se determina al graficar Log (concentración) vs PIC, ajustando los puntos a una curva sigmoidea de Boltzmann. Todos los resultados obtenidos son la media de por lo menos tres experimentos independientes.

3.6. Ensayo de citotoxicidad en macrófagos murinos [56]

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos sintetizados se realizó el ensayo de citotoxicidad por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Se emplean macrófagos murinos J774. Se siembra una placa de 96 pocillos transparente con confluencia, con $2.5-10 \times 10^5$ células/pocillo, la misma se incuba durante 24 h a 37 °C. Luego de este período, las células deben estar en un 70-80% de confluencia. Se preparan soluciones stock de los compuestos a ensayar con el disolvente adecuado (DMSO) a una concentración tal que en la placa el disolvente no supere el 0.5%. Luego se coloca medio de cultivo fresco en tubos eppendorfs estériles y se realizan las diluciones seriadas de los compuestos. Se retira el medio de cultivo de la placa y se adiciona el compuesto ya disuelto en medio de cultivo fresco (volumen final 200 µL). Se incuba durante 48 horas en estufa a 37 °C, 5 % CO₂. Se realizan los siguientes controles: células con disolvente y MTT, células sin disolvente y con MTT, blanco de lectura: células con disolvente y sin MTT.

Luego del período de incubación se observan las células en el microscopio y se realizan anotaciones acerca del estado de las mismas. El medio de cultivo se retira, se prepara la solución de MTT (0.1 mg/mL) en PBS estéril 0.2 % glucosa (D-(+)-glucosa 200 mg, PBS); y se adicionan 100 µL de esta solución en cada pocillo. En el blanco de lectura se colocan 100 µL de PBS estéril 0.2 % glucosa sin MTT. Posteriormente, se incuba durante 3 h a 37 °C. Luego de este procedimiento se retira la solución de MTT

y se adicionan en cada pocillo 180 μ L de DMSO y 20 μ L de solución amortiguadora glicina para MTT (glicina 0.1 M, NaCl 0.1M, EDTA 0.5 M). Se agita la placa en agitador mecánico rotatorio por lo menos durante un minuto y se realiza la lectura de absorbancia a 560 nm. Se calcula el % citotoxicidad según la fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = 1 - [(\text{Abs muestra}/\text{Abs}) \times 100].$$

Resultados y discusión

4. Resultados y discusión

4.1. Fraccionamiento bioguiado

A partir de las partes aéreas secas de la plantas recolectadas en los tres períodos del año 2012 (febrero, junio y diciembre) en suelo rocoso, se realizó el fraccionamiento bioguiado de *Baccharis trimera* utilizando disolventes de polaridad creciente. Se observó que el rendimiento de extracción (Tabla 4.1) fue superior en las fracciones enriquecidas en componentes más polares, fracción metanol (cerca a 10 %), seguida por las fracciones acetato de etilo (cerca a 7 %) y por último las fracciones hexano (cerca a 2.5 %). Las fracciones obtenidas fueron evaluadas, inicialmente frente a la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* forma epimastogote y posteriormente frente a macrófagos murinos, J774, con el fin de determinar la selectividad hacia el parásito que presentan los compuestos que componen las distintas fracciones (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Tabla de rendimientos de extracción y resultados de ensayos biológicos de las distintas fracciones.

	F.Hexano			F.AcOEt			F.MeOH		
	Febrero	Junio	Diciembre	Febrero	Junio	Diciembre	Febrero	Junio	Diciembre
Rend.^a (%)	2.6 ± 0.6	2.1 ± 0.5	2.3 ± 0.1	8.2 ± 0.9	6.2 ± 0.4	5.5 ± 1.3	10.2 ± 0.1	13.3 ± 0.7	7.4 ± 1.1
IC₅₀ <i>T. cruzi</i> ^b (µg/mL)	34.3 ± 4.2	44.1 ± 4.3	45.2 ± 5.2	43.2 ± 3.4	41.3 ± 3.1	61.3 ± 6.2	>100	>100	>100
IC₅₀ Macróf.^c (µg/mL)	143.2 ± 3.2	93.2 ± 5.3	54.4 ± 4.4	120.2 ± 3.4	41.6 ± 3.3	42.3 ± 3.1	>250	125.2 ± 5.1	80.2 ± 6.3
IS^d	4.2	2.1	1.2	2.8	1	0.7	-	< 12.5	< 0.8

^a Rendimiento de extracción es el promedio de tres extracciones independientes. ^b IC₅₀ *T. cruzi* concentración inhibitoria 50% del crecimiento de *T. cruzi* cepa Tulahuen 2, ^c IC₅₀ concentración de compuesto necesaria para reducir en un 50% el número de macrófagos murinos J774, ^d IS índice de selectividad hacia parásitos definido como IC₅₀ macrófagos/ IC₅₀ *T. cruzi*.

Se observó que la fracción que presenta mayor actividad antiproliferativa frente al parásito, *T. cruzi*, fue la que reúne los componentes más apolares (fracción hexano), especialmente la que corresponde al período de febrero (Figura 4.1). A su vez esta fracción presenta el mayor índice de selectividad, seguida por las fracciones hexano y AcOEt de junio y diciembre. Por otra parte las fracciones enriquecidas en componentes más polares, fracciones metanólicas, no presentaron actividad antiproliferativa a las concentraciones de trabajo (Anexo I). Estos resultados permiten inferir que los compuestos responsables de la actividad biológica seguramente sean de naturaleza lipofílica (lípidos, compuestos volátiles, ceras, entre otros).

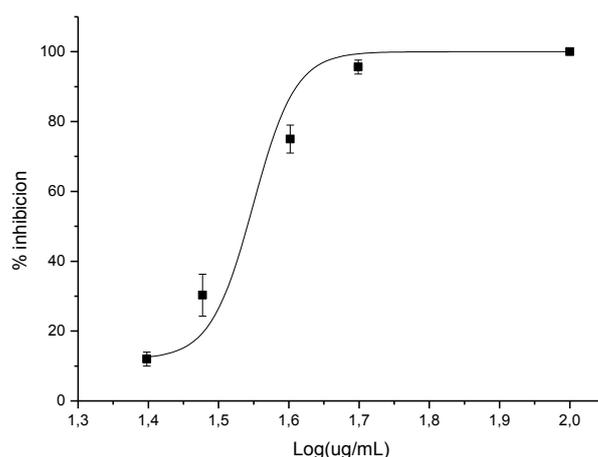


Figura 4.1. Curva dosis-respuesta del ensayo de actividad antiproliferativa de la fracción hexano de *Baccharis trimera* correspondiente a la colecta del mes de febrero.

Muchos de estos componentes apolares pueden ser compuestos volátiles dado que estos son solubles en disolventes orgánicos apolares. Estos compuestos se encuentran formados en su mayoría por terpenos y sesquiterpenos a los cuales se les han atribuido relevante actividad inhibitoria del crecimiento de *T. cruzi* [57]. Entre los compuestos volátiles que presenta la carqueja se destacan el acetato de carquejillo,

ledol y carquejol (Figura 4.2). Estos dos últimos se aislaron principalmente de las flores de *Baccharis trimera* [58].

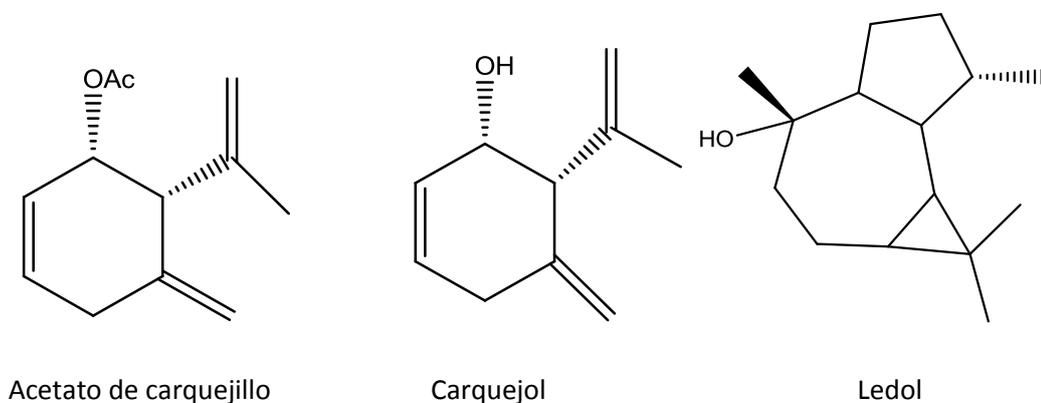


Figura 4.2. Estructuras químicas de terpenos aislados en *Baccharis trimera* [58].

En resumen se descarta, de acuerdo a los resultados obtenidos, a los compuestos de polaridad alta como los responsables de la actividad biológica observada. Siendo los componentes más apolares los que presentaron mayor actividad. Especialmente las mayores actividades y selectividades se encontraron en las fracciones hexano y acetato de etilo del período de febrero, lo que podría estar indicando que la floración podría estar aportando metabolitos particulares que hacen a esta actividad.

4.2. Caracterización fitoquímica

4.2.1. Análisis cromatográfico

Se realizaron las cromatografías en capa fina (TLC) de todas las fracciones obtenidas. En las TLC correspondientes a la colecta del mes de febrero del 2012, se observó el mismo patrón de manchas con ambos reveladores, tanto con reactivo vainillin-sulfúrico como con vapores de yodo, R_f cercanos a 0.9, 0.5 y 0.2. Las mismas para el caso del revelado con vainillina presentaron una coloración que va del violeta al pardo. La mancha de R_f cercano a 0.5, se observó con exposición a luz UV (Figura 4.3). En el

carril 2, correspondiente a la fracción AcOEt, al revelar con vainillina se observó una mancha amarilla oscura que se corresponde con el lugar de siembra la cual también se observó con exposición a la luz UV. Estos resultados indican la presencia de compuestos de polaridad mediana en la fracción acetato de etilo que no alcanzan a desplazarse del origen con la fase móvil utilizada. Como era de esperar lo mismo sucede para los compuestos polares que forman parte de la fracción metanol.

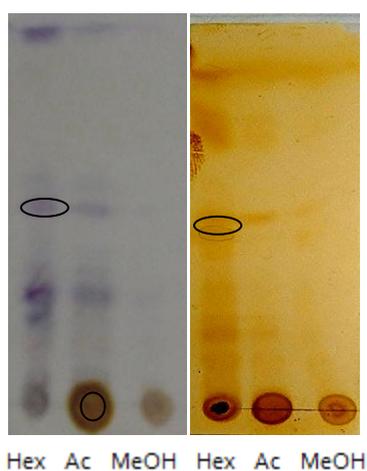


Figura 4.3. TLC (hexano:AcOEt (9:1)) de la fracción correspondiente a la colecta mes de febrero: Hexano (carril 1), AcOEt (carril 2) y MeOH (carril 3) respectivamente. Revelado con vainillina (izquierda) y vapores de yodo (derecha). El círculo muestra el revelado con UV.

En cuanto a las TLC correspondientes a las fracciones obtenidas de la colecta de junio de 2012 se observó un patrón de manchas muy similares al de las muestras de febrero. La mayor diferencia con respecto a las TLC del período anterior se encuentra en una banda de coloración rojo-marrón de gran intensidad ($R_f = 0.1$), en el carril 1 correspondiente a la fracción hexano al ser revelada con vainillina (Figura 4.4).

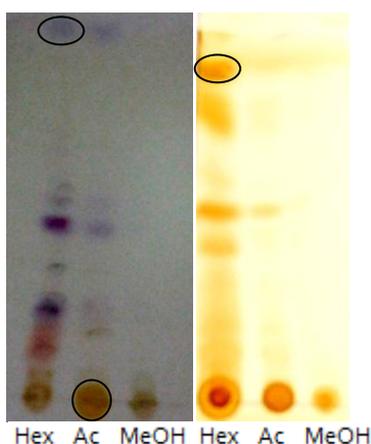


Figura 4.4. TLC (hexano: AcOEt (9:1)) de la fracción hexano, AcOEt y MeOH de las muestras de junio 2012, revelada con vainillina (izquierda) y vapores de yodo (derecha). El círculo muestra el revelado con UV.

Por otra parte en las TLC de las fracciones correspondientes a la colecta de diciembre de 2012, se observó en general, el mismo patrón de manchas que en los dos extractos anteriores (Figura 4.5).

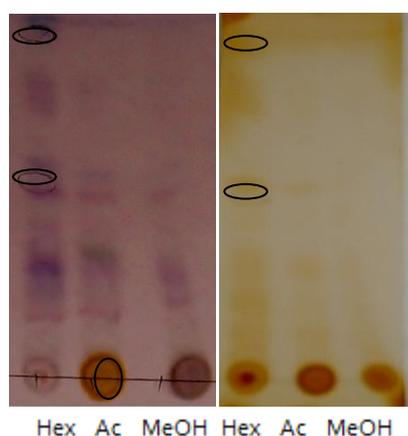


Figura 4.5. TLC (hexano : acetato de etilo (9:1)) de las fracciones hexano, AcOEt y MeOH correspondientes al mes de diciembre, revelada con vainillina (izquierda) y vapores de yodo (derecha). Los círculos muestran el revelado con UV.

Para comparar las diferentes fracciones hexanos (febrero, junio y diciembre) se realizó una TLC conjunta (Figura 4.6). En la misma se observó que en las fracciones de junio y diciembre aparecen además de las manchas comunes para los tres extractos una banda de color rojo intenso con un $R_f = 0.1$ que parece más abundante en el primer caso. Por otra parte se observa que la mancha que revela violeta con $R_f = 0.2$ va disminuyendo de acuerdo a los períodos siendo más intensa en el mes de febrero y

muy tenue en el mes de diciembre. De estos resultados se podría inferir que este componente podría estar involucrado en la bioactividad obtenida.

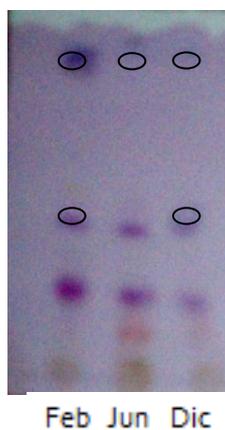
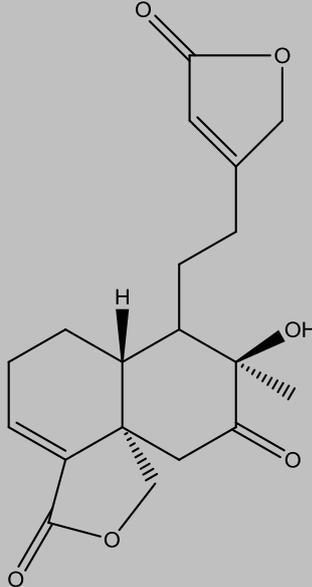
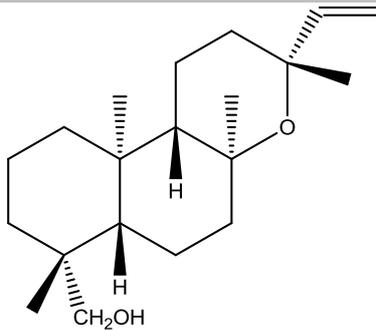
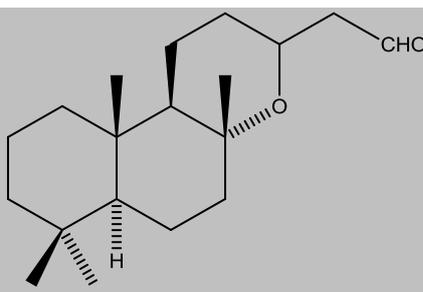
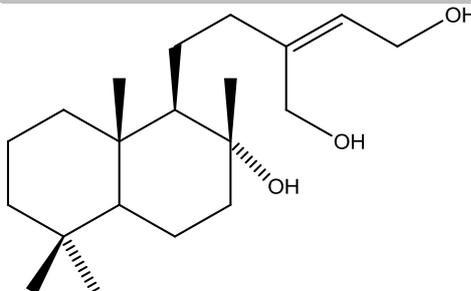


Figura 4.6. TLC (hexano: acetato de etilo (9:1)) de las fracciones hexano correspondientes a febrero, junio y diciembre respectivamente, revelado con vainillina. Los círculos muestran las bandas que revelan con UV.

Este resultado confirma que el perfil metabólico de los compuestos apolares presentes en las fracciones hexanos de *Baccharis trimera* varía según la época del año en que se realiza la colecta de la planta. A su vez el revelado positivo con vainillina, y las diferentes tonalidades de colores observados, confirman la presencia de compuestos terpenoides de variada naturaleza química, resultado que era de esperar ya que hay descripciones bibliográficas que muestran que es común su presencia en plantas del género *Baccharis* (Tabla 4.2) [32,59-61].

Tabla 4.2. Identificación de terpenos en género *Baccharis*

Terpeno	Estructura
Bacchariol	 <p>[32]</p>
Óxido de 19-hidroxi-13-epimanoilo	 <p>[59]</p>
8 α ,15-dihidroxiabdano	 <p>[60]</p>
2 β ,15,16,17-trihidroxi-labda-7,13E-dieno	 <p>[61]</p>

Dado que se cuenta en nuestra quimioteca con un patrón de quercetina, flavonoide que se encuentra en *Baccharis* según descripciones previas [39,40], se realizó una TLC (Figura 4.7) junto con las fracciones acetato de etilo, que se espera contenga los flavonoides de la carqueja. En la misma se observó que estas fracciones presentan una mancha muy similar al patrón que presentó un $R_f = 0.28$, mientras que las fracciones correspondientes a los extractos de AcOEt presentaron un $R_f = 0.27$. Este resultado infiere la presencia de quercetina en la fracción acetato de etilo, así como también la presencia de otros flavonoides.

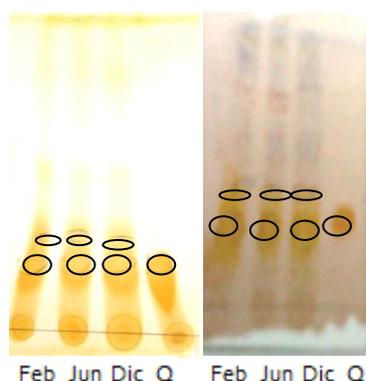
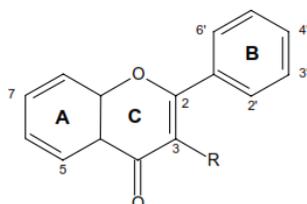


Figura 4.7. TLC (hexano:AcOEt(1:1)) de la fracción AcOEt correspondiente a los períodos febrero (carril 1), junio (carril 2), diciembre (carril 3) y quercetina (carril 4). Se usó como revelador vapores de yodo (izquierda) y vainillina (derecha). Los círculos muestran las bandas que revelan con UV.

Además de la quercetina según bibliografía, ya han sido identificado otros flavonoides en especies de su género (Tabla 4.3) [62-63].

Tabla 4.3. Identificación de flavonoides en género *Baccharis* [48,62-63]

Flavonoide	Posición							
	R	5	6	7	8	3'	4'	5'
Hipidulina	H	OH	OMe	OH	H	H	OH	H
Apigenina	H	OH	H	OH	H	H	OH	H
Nepetina	H	H	OMe	H	H	H	OH	OH
Cirsimartina	H	OH	OMe	OMe	H	H	OH	H
Quercetina	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H
Eupatilina	H	OH	OMe	OH	H	H	OMe	OMe
Luteolina	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H
Rutina	O-Glucosilo	OH	H	OH	H	OH	OH	H

4.2.2. Reacciones químicas de caracterización fitoquímica

Los resultados de la prueba realizada para la detección de presencia de flavonoides se muestran a continuación (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Resultados de prueba realizada para la detección de flavonoides.

	Febrero	Junio	Diciembre
F. hexano	---	---	---
F. AcOEt	+++	+++	+++
F. MeOH	---	---	---

(+++): significa que se obtuvo una respuesta positiva de mayor cantidad para ese metabolito en el extracto, (---): significa que se obtuvo una respuesta negativa para ese metabolito en el extracto.

Como era de esperar se observó la presencia de flavonoides claramente positiva (+++) únicamente para las fracciones AcOEt (Tabla 4.4). Estos resultados se deben a la intensidad del color marrón-rojo bien definido como producto de la reacción del

extracto disuelto en etanol con ácido clorhídrico en presencia de magnesio. Estos resultados permitieron afirmar que el proceso de extracción se realizó con éxito ya que estos compuestos sólo se encontraron en la fracción adecuada.

Los resultados de la prueba realizada para la detección de componentes terpenoides y/o esteroides se muestran a continuación (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Resultados de prueba realizada para la detección de componentes terpenoides y/o esteroidales.

	Febrero	Junio	Diciembre
F. hexano	+++	+++	+++
F. AcOEt	++	++	++
F. MeOH	---	---	+

(+++): significa que se obtuvo una respuesta positiva de mayor cantidad para ese metabolito en el extracto, (++): significa que se obtuvo una respuesta positiva moderada para ese metabolito en el extracto, (+): significa que se obtuvo una respuesta positiva baja para ese metabolito, (-): significa que se obtuvo una respuesta negativa para ese metabolito en el extracto evaluado.

Mediante esta técnica de caracterización se evidenció la presencia de componentes triterpenoides y/o esteroides claramente positivo para el caso de las fracciones hexánicas, seguida de la fracción acetato de etilo. Estos resultados se deben a la intensidad del color marrón-verde, en el caso de las fracciones hexánicas claramente positivos (+++) y para el caso de las fracciones acetato de etilo resulto ser positivo (++) presentando una coloración marrón-verde de menor intensidad. Según bibliografía ya se ha informado para esta familia la presencia de diferentes clases de terpenos como los ácidos ursólico y oleanólico (triterpenos), así como también del tipo de los ent-clerodano como dilactona del ácido 8 β ,16,19-trihidroxi-7-oxo-ent-cleroda-3-en-15,18-dicarboxílico y la dilactona del ácido 7-oxo-16,19-dihidroxi-3,4-dehidroclerodano-15,20-dicarboxílico (Figura 4.8) [64].

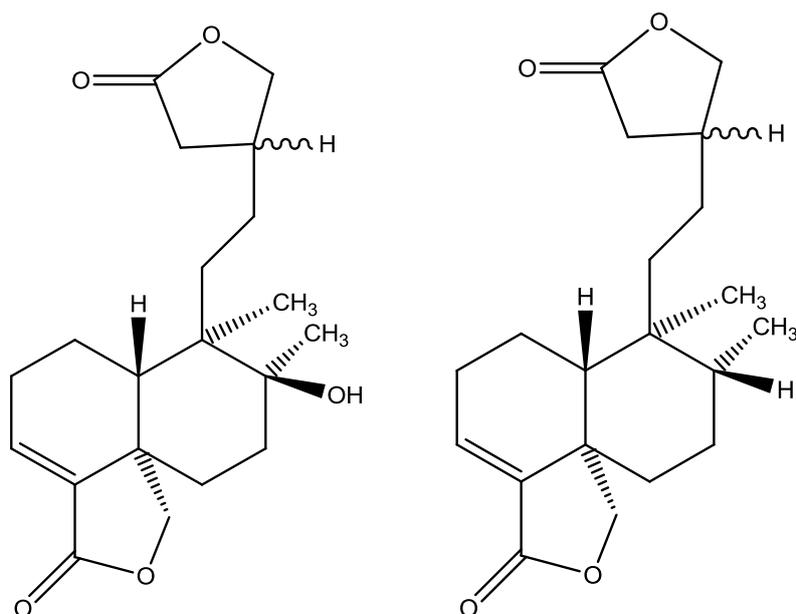


Figura 4.8. Estructuras químicas de dilactona del ácido $8\beta,16,19$ -trihidroxi-7-oxo-ent-cleroda-3-en-15,18-dicarboxílico (izq.) y dilactona del ácido 7-oxo-16,19-dihidroxi-3,4-dehidroclerodano-15,20-dicarboxílico (der.) [64].

4.2.3. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) realizados permiten caracterizar y comparar agrupamientos químicos presentes en las fracciones, al mismo tiempo arrojar pautas estructurales de las mismas estableciendo relaciones entre carbonos y sus respectivos protones.

El espectro ^1H -RMN correspondiente a la fracción hexano (Figura 4.9) se puede dividir en distintas regiones en donde se encuentran presentes señales características a diversos grupos químicos. La primera región (desplazamientos químicos (δ) entre 2.0 - 0.5 ppm) en donde se visualiza una gran superposición de señales de componentes alifáticos, que se corresponden con grupos metilos, metilenos y metinos. La segunda región (δ 4 - 3 ppm) donde se observa la presencia de protones enlazados a carbono unidos a átomos de oxígeno o nitrógeno. Una tercera región (δ 6

– 5 ppm) donde se encuentran señales que se podrían corresponder con protones olefínicos o también a grupos hidroxilos.

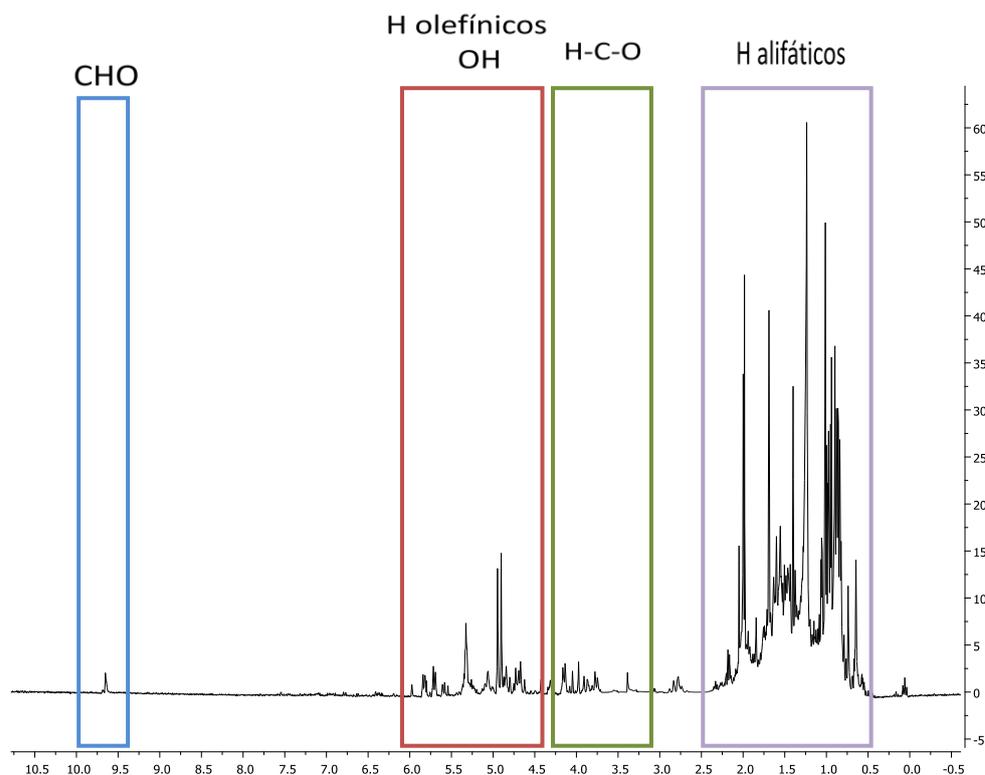


Figura 4.9. Espectro de ^1H -RMN de la fracción hexano correspondiente al período de febrero 2012 en DMSO-d_6 adquiridos a 22.16°C .

Por último una cuarta región donde se visualiza una señal de baja intensidad que presenta un desplazamiento químico de 9.6 ppm, esta región según bibliografía es característica de grupos aldehídos de muchos componentes terpenoides. Algunos ejemplos de ellos se muestran en la Figura 4.10 [60,65].

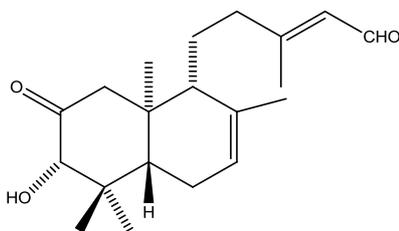
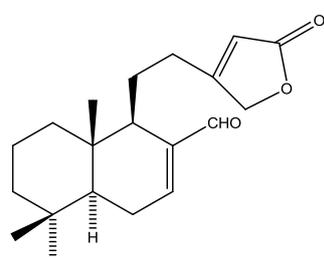


Figura 4.10. Estructura química de 17-oxolabda-7,13-dien-15-ácido-16-lactona [60] (izq.) y 3 α -hidroxi-2,15-dioxo-entlabda-7,13E-dieno [65] (der.) aislados de plantas del género *Baccharis*.

Esta señal también está presente en el espectro de ^1H (Figura 4.11) tanto de febrero, junio y diciembre (Tabla 4.6).

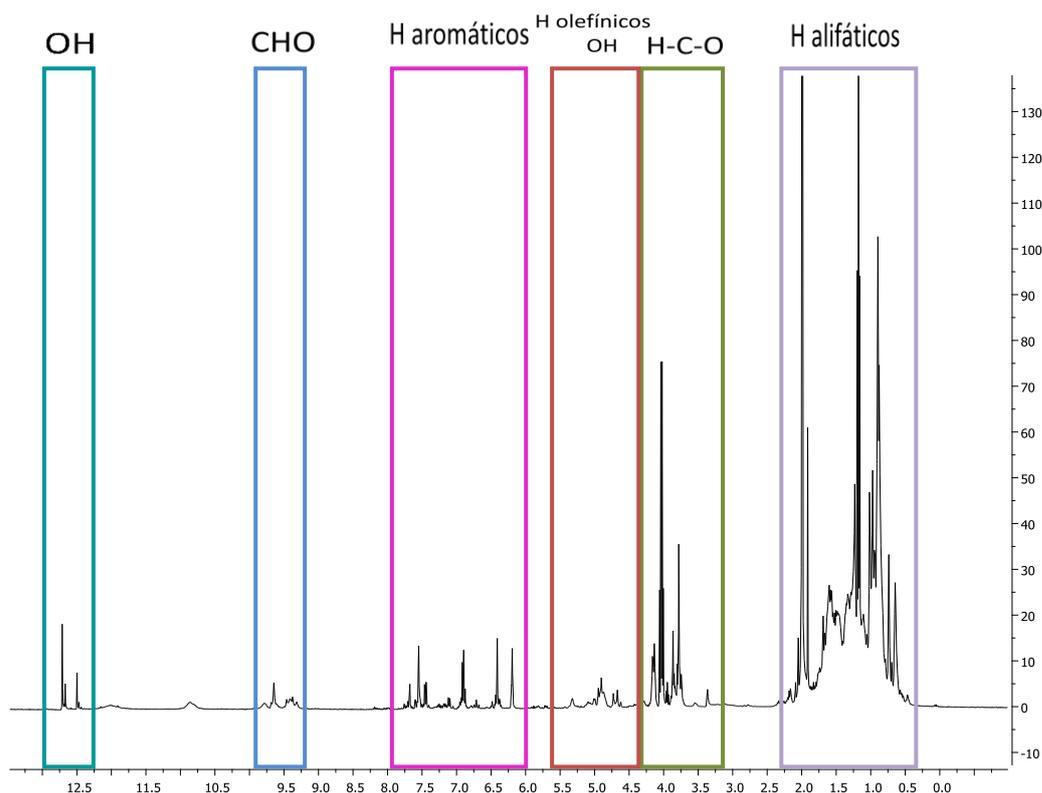


Figura 4.11. Espectro ^1H -RMN de la fracción AcOEt correspondiente a la colecta del mes de febrero en DMSO-d_6 adquiridos a $22.16\text{ }^\circ\text{C}$.

En el espectro de ^1H RMN de la fracción AcOEt también se observaron señales en la región ubicada entre 12.2 y 13.0 ppm típica de grupos fenólicos que forman enlace de hidrógeno intramolecular, que podrían corresponderse con la presencia de flavonoides. Un ejemplo de estos compuestos es 5,6-dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona (Figura 4.12), flavonoide que fue aislado de *Baccharis trimera*, y en cuyo espectro ^1H -RMN se identifican señales correspondientes a protones aromáticos (δ 7-8 ppm), así como también señales características de protones de grupos hidroxilos fenólicos (δ 13.04 y 9.57 ppm) [66]. Otro ejemplo es 5,7-dihidroxi-6,8,4'-trimetoxiflavona, aislada de la especie *Baccharis nitida*, en cuyo espectro ^1H -RMN se pueden caracterizar señales correspondientes al grupo hidroxilo en el C5 en 12.77 ppm y señales características de protones aromáticos en el entorno de 7-8 ppm (Figura 4.12) [67].

Tabla 4.6. Asignación de señales del espectro de $^1\text{H-RMN}$ de las fracciones obtenidas de *Baccharis trimera* correspondiente a la región de grupos aldeídos.

F. hexano febrero	F. hexano junio	F. hexano diciembre	F. AcoEt febrero	F. AcoEt junio	F. AcoEt diciembre
δ (ppm), multiplicidad					
9.65, m ^a	9.65, m	9.65, m	9.78, b ^d	9.80, b	9.68, b
	9.48, s ^b	9.67, sa ^c	9.68, b	9.68, b	9.65, b
		9.68, sa	9.65, m	9.67, b	9.45, b
			9.67, sa	9.65, b	9.37, b
			9.46, sa	9.65, b	
			9.41, sa	9.64, b	
			9.38, sa	9.46, b	
			9.32, sa	9.42, b	
				9.37, b	
				9.32, b	

^a m múltiplete, ^b s singulete, ^c sa señal ancha, ^d b poco definida

Estos antecedentes permiten en nuestro trabajo la asignación de las señales que se encuentran en la región correspondiente a protones aromáticos en parte a la presencia de flavonoides.

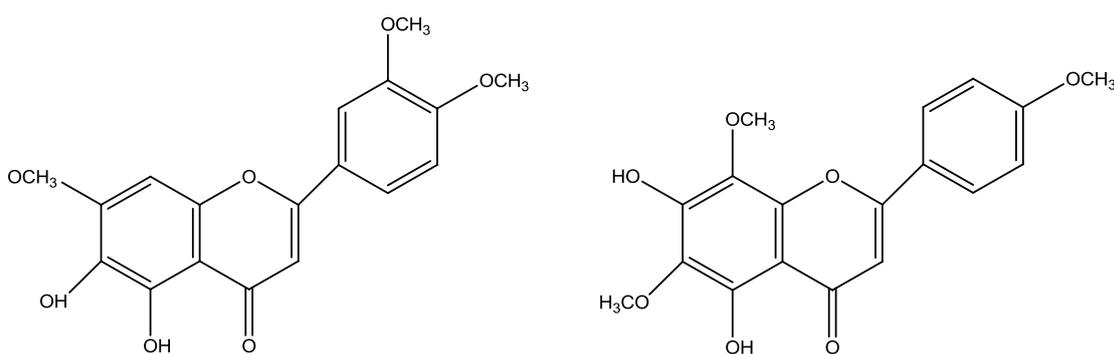


Figura 4.12. Estructuras químicas de 5,6-diidroxí-7,3',4'-trimetoxiflavona (izq.) y 5,7-dihidroxí-6,8,4-trimetoxiflavona (der.) (Nevadensina) [67].

Estas señales se observan también en las fracciones de febrero, junio y diciembre (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Asignación de señales del espectro de ^1H -RMN de las fracciones AcOEt aisladas de *Baccharis trimera* correspondiente a la región de grupos fenólicos.

F. AcOEt febrero	F. AcOEt junio	F. AcOEt diciembre
δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
13.18	12.97	12.71
12.71	12.78	12.67
12.67	12.71	12.49
12.50	12.70	
12.47	12.68	
	12.67	
	12.62	
	12.50	
	12.47	

También se observaron señales correspondientes a grupos aromáticos y alquénicos conjugados entre 4.8 y 7.8 ppm al igual que en el espectro ^1H -RMN de la fracción MeOH (Figura 4.13), pero estas señales no se corresponderían a compuestos tipo flavonoides dado los resultados negativos de las reacciones de caracterización fitoquímicas. En esta fracción también se apreció una marcada disminución en la intensidad de las señales en la región característica de grupos aromáticos.

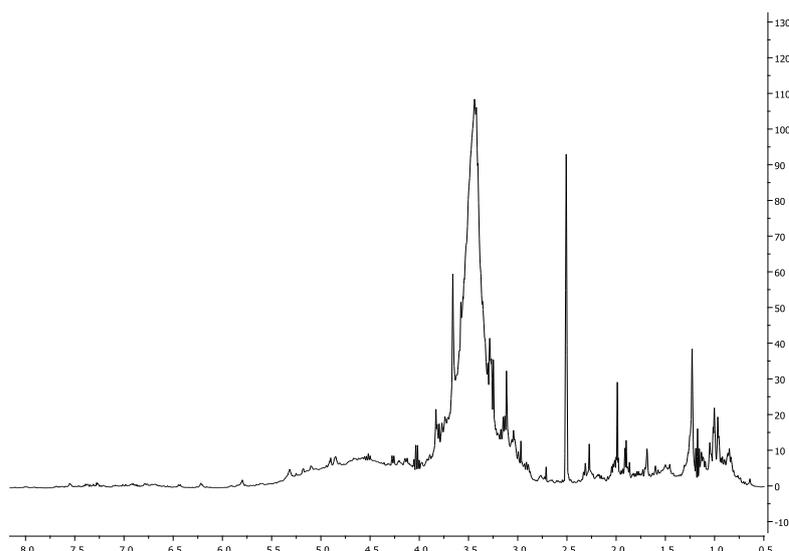


Figura 4.13. Espectro de ^1H -RMN de la fracción MeOH correspondiente a la colecta del mes de febrero disuelto en DMSO-d_6 adquiridos a $22.16\text{ }^\circ\text{C}$.

El espectro homonuclear COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de la fracción hexano del mes de febrero, permitió establecer correlaciones entre los protones correspondientes a grupos metilos, metilenos y metino δ 0.5 - 3.0 ppm con protones olefínicos con desplazamientos de entre 5 y 6 ppm (Figura 4.14).

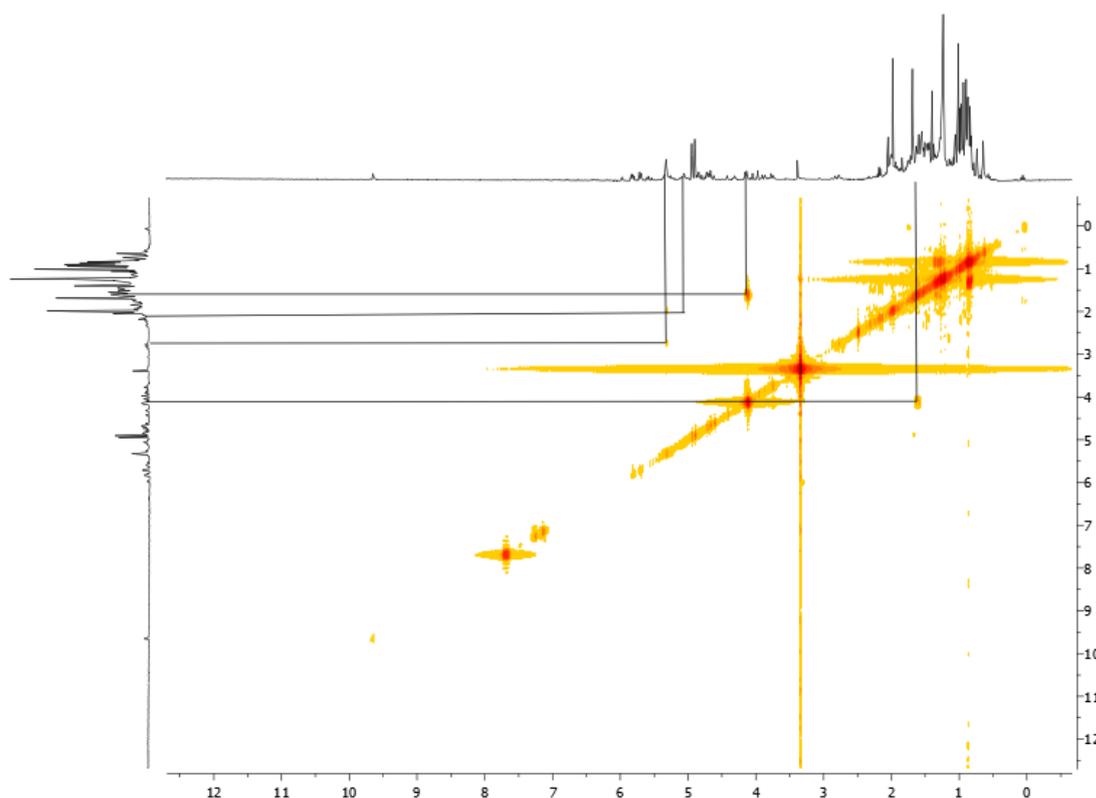


Figura 4.14. Espectro COSY de la fracción hexano correspondiente a la colecta de febrero.

Se realizó el estudio heteronuclear ^1H - ^{13}C , experimentos HSQC y HMBC (Anexo II). Estos estudios permitieron confirmar la presencia de metabolitos ya descritos por otros autores y comenzar con la identificación de los mismos. Se identificaron los carbonos a los que se encuentran unidos los hidrógenos y por ende fue posible conocer su entorno químico próximo.

Tabla 4.8. Asignación de señales obtenidas a partir de los espectros de ^1H RMN y ^1H - ^{13}C HSQC y HMBC de la fracción hexano recolectada en el mes de febrero.

Asignación de señales	δ_{H} (ppm) ^a	δ_{H} ; δ_{C} (ppm) ^b
H-alifáticos CH ₃ , CH ₂ , CH	2.15, 1.98, 1.91, 1.73, 1.67, 1.50, 1.24, 1.00, 0.98, 0.82	9.22 – 40 ^c
C-CH-O-C	4.84, 4.73, 4.69, 4.67, 4.16, <u>4.14</u> ^d , 4.05, 3.97, 3.91, 3.87, 3.86, 3.78, <u>3.75</u> , 3.39	- 4.14; 67.66 - 3.75; 65.63
H-olefínicos	5.84, 5.72, 5.72, 5.69, 5.35, 5.33, 5.33, <u>5.32</u> , 5.07, 5.06,	- 5.32; 129.27
C-CH-OH	5.71, 5.81, <u>5.32</u> , 5.07, 4.95, 4.91, <u>4.90</u>	- 5.32; 130.00 - 4.90; 112.14
COH	9.65	Nd ^e

^a desplazamientos químicos de protón asignado por ^1H RMN ^b desplazamientos químicos de protón y carbono correlacionados asignados por HSQC y HMBC ^c desplazamientos químicos de los carbonos, ^d el subrayado indica los protones que se correlacionan con los carbonos que se muestran determinado por HSQC y HMBC, ^e Nd: señal no detectada.

También se realizaron los correspondientes estudios heteronucleares ^1H - ^{13}C de la fracción AcOEt (experimentos HSQC y HMBC colecta de febrero, junio y diciembre) (Anexo II). Se observaron señales que se correspondían con algunos flavonoides previamente descritos en especies de la familia de las Asteraceae [68-70] (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Asignación de señales de los espectros de ^1H -RMN y ^1H - ^{13}C HSQC y HMBC de la fracción AcOEt correspondiente a la colecta del mes de febrero mostrándose las señales características de flavonoides.

Asignación de señales	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (ppm)
OH- aromáticos	13.18, 12.71, 12.67, 12.50, 12.47	Nd ^c
H-aromáticos	7.68, 7.68, 7.55, 7.55, 7.53, 7.53, 7.46, 7.46, 7.44, 7.44, 6.93, 6.92, 6.91, 6.90, 6.87, 6.43, 6.43, 6.42, 6.41, 6.21, 6.20, 6.19, 6.18.	113 - 121
OCH ₃	4.16, 4.14, 4.06, 4.04, 4.02, 4.00, 3.86, 3.80, 3.79, 3.78.	56 - 69

^a desplazamientos químicos de protón asignado por ^1H RMN, ^b desplazamientos químicos de carbonos asignados por ^1H - ^{13}C HSQC y HMBC, ^c Nd: Señal no detectada

Cabe destacar que tanto en la fracción hexano, como AcOEt, se observaron señales en la región de grupos aldehídos, cercana a 9.5 ppm. Esta señal, correspondiente a la fracción AcOEt se pudo relacionar mediante los estudios de HSQC, con un carbono que presentó un desplazamiento de 203.99 ppm. Este dato llevó a buscar aldehídos que presenten este desplazamiento del carbono ya descritos en plantas del género *Baccharis* y se encontró un diterpeno del tipo labdano, óxido de 15-oxo-14,15-dihidro-13-epi-manoilo (Figura 4.15), que presenta un grupo aldehído con un desplazamiento de 204 ppm para el carbono y 9.87 ppm para el protón [71]. A su vez fue posible identificar en el espectro los protones correspondientes a los carbonos numerados con 6 y 7 del compuesto confirmando la presencia del mismo. Este tipo de compuestos

suelen encontrarse en diversas especies de este género en forma de una mezcla de epímeros. Estos dos epímeros presentan señales muy similares en el espectro de ^1H -RMN, las principales diferencias se encuentran en las señales correspondientes al H-14, H-15 y H-16. Pudiéndose también diferenciar ambos epímeros comparando las señales en el espectro HSQC. El C-13 unido al H-16 de estar en posición axial presentaría un desplazamiento de 28 ppm, mientras que si el H-16 se encuentra en posición ecuatorial presentaría un desplazamiento de 31 ppm [71] (Tabla 4.10).

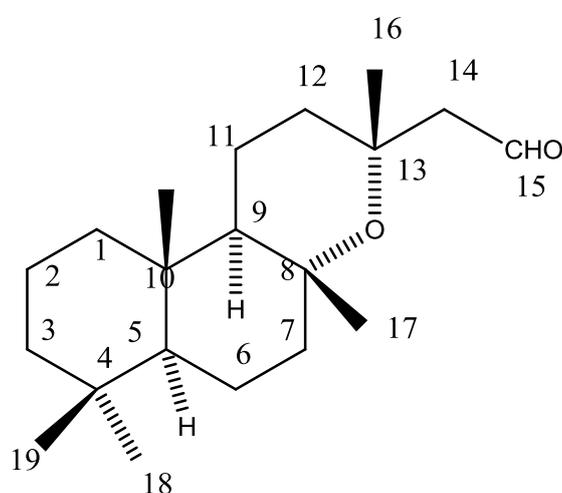


Figura 4.15. Estructura química de óxido de 15-oxo-14,15-dihidro-13-epi-manoilo [71].

Este compuesto puede considerarse desde nuestro punto de vista uno de los responsables de la actividad biológica que presentan las fracciones hexano y AcOEt. Cabe mencionar que en trabajos previos de nuestro grupo de investigación se aislaron dos diterpenos del tipo labdano de la planta ecuatoriana *Aristeguietia glutinosa*, con relevante actividad anti-*Trypanosoma cruzi*, y uno de ellos tiene a su vez un grupo aldehído en su estructura [43,44]. Esto avalaría la importancia de estos agrupamientos como responsables de la bioactividad observada para *Baccharis trimera*.

Por lo que se realizó un estudio comparativo de la presencia de la señal del grupo aldehído en las distintas épocas de recolección (febrero, junio y diciembre) de un mismo extracto (hexano o AcOEt), utilizando como patrón interno de integración la señal del disolvente (DMSO), y se observó que la fracción AcOEt de junio es donde la planta produce mayor cantidad de dicho metabolito, mientras que para la fracción hexano es en febrero la época en la que se observa la mayor acumulación. Siendo este resultado totalmente concordante con los resultados obtenidos en los ensayos de actividad biológica (Tabla 4.11). Por otra parte al compararse las fracciones hexano y AcOEt, se observó una mayor cantidad del metabolito en la fracción AcOEt que en la fracción hexano, por lo que se puede inferir que en esta última deben de estar presentes más de un compuesto con actividad anti- *T. cruzi*.

Tabla 4.10. Asignación de señales de los espectros ¹H-RMN y ¹H-¹³C de la fracción AcOEt correspondiente a la colecta del mes de febrero.

Asignación de señales	δ_H^a (ppm)	$\delta_H; \delta_C^b$ (ppm)
H-alifáticos CH ₃ , CH ₂ , CH	1.99, 1.91, 1.60, 1.23, 1.19, 1.18, 1.16, 1.02, 0.99, 0.97, 0.95, 0.94, 0.90, 0.88, 0.74, 0.64.	4.40-60 ^c
C-CH-O	4.16, <u>4.13^d</u> , 4.06, 4.04, <u>4.02</u> , 4.00, 3.86, 3.85, 3.80, <u>3.78</u> , 3.75, 1.99, 1.91, 1.60, 1.23, 1.19, 1.18, 1.16, 1.02, 0.99, 0.97, 0.95, 0.94, 0.90, 0.88, 0.74, 0.64.	- 4.13; 65.16 - 4.02; 60,00 - 3.78; 59.74
H-olefínicos C-CH-OH	5.01, 4.99, 4.94, <u>4.90</u> , 4.87, 4.73, 4.72, <u>4.67</u>	- 4.90; 100.26 - 4.67; 106.27
CHO	9.64	203.19

^a desplazamientos químicos de protón asignado por ¹H RMN ^b desplazamientos químicos de protón y carbono correlacionados asignados por HSQC y HMBC ^c desplazamientos químicos de los carbonos, ^d el subrayado indica los protones que se correlacionan con los carbonos que se muestran determinado por HSQC y HMBC.

Tabla 4.11. – Valores de integración obtenidos utilizando como patrón interno la señal del disolvente DMSO. ^a Rango de integración.

Fracción	DMSO-d6 (2.52 a 2,48) ^a	grupo aldehído (9.70 a 9.60)
Hex Feb'12	200	0.24
Hex Jun'12	200	0.05
Hex Dic'12	200	0.04
AcOEt Feb'12	200	11.16
AcOEt Jun'12	200	12.81
AcOEt Dic'12	200	5.30

Paralelamente se realizó el espectro de ¹H-RMN de la quercetina, con el fin de compararlo con el de la fracción AcOEt, se pudo observar un muy adecuado solapamiento de las señales de ambos espectros. Además se visualizó la presencia de otras señales en la fracción AcOEt que no se corresponden con la quercetina, que pueden explicarse por la presencia de otros flavonoides y terpenoides (Figura 4.16).

También se corroboró en estudios heteronucleares ¹H-¹³C, experimentos HSQC y HMBC (Figura 4.17). En los mismos se observaron patrones similares en la región correspondiente a agrupamientos aromáticos ($\delta_H; \delta_C$) (7.68;115.41), (7.54;120.54), (6.87;115.41), (6.41; 91,28), (6.89;114.88).

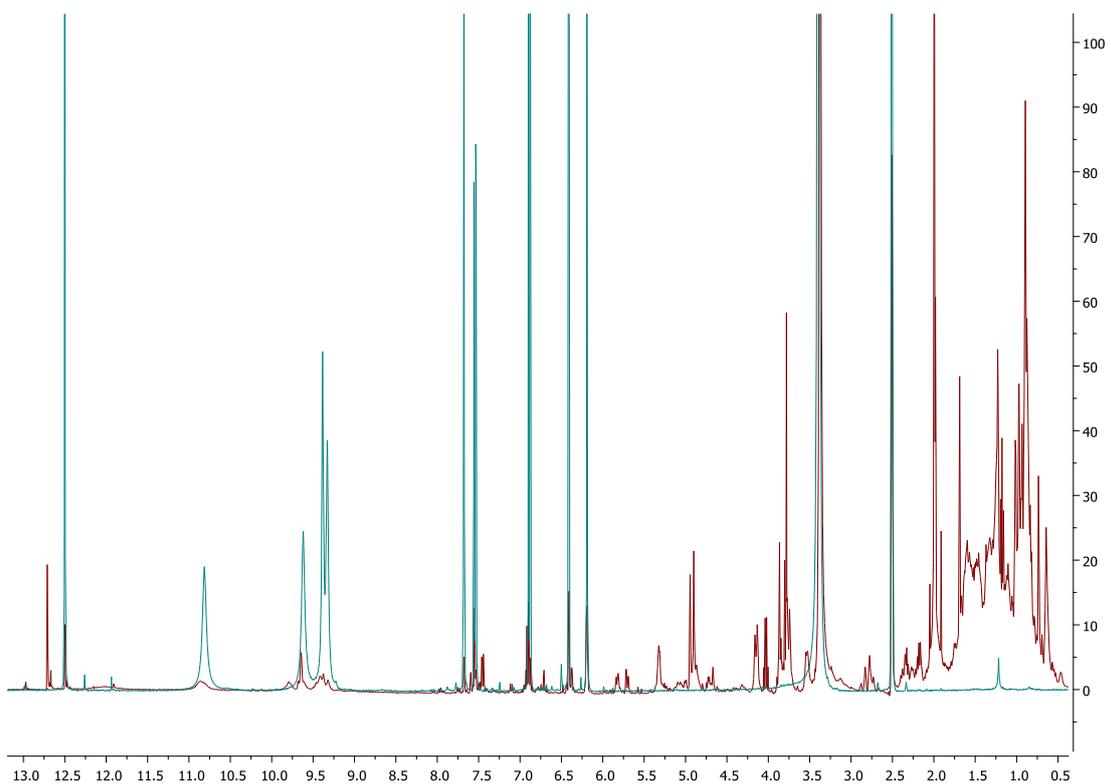
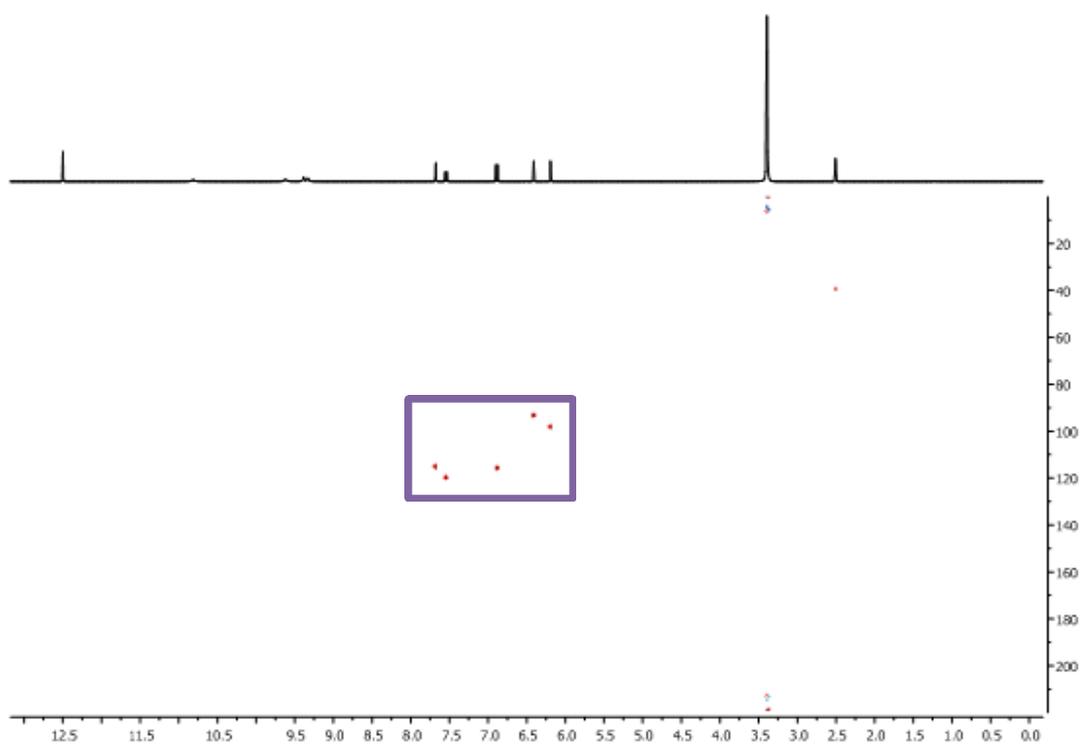


Figura 4.16. Espectro ^1H -RMN correspondientes a fracción AcOEt junio(---) y quercetina (---).



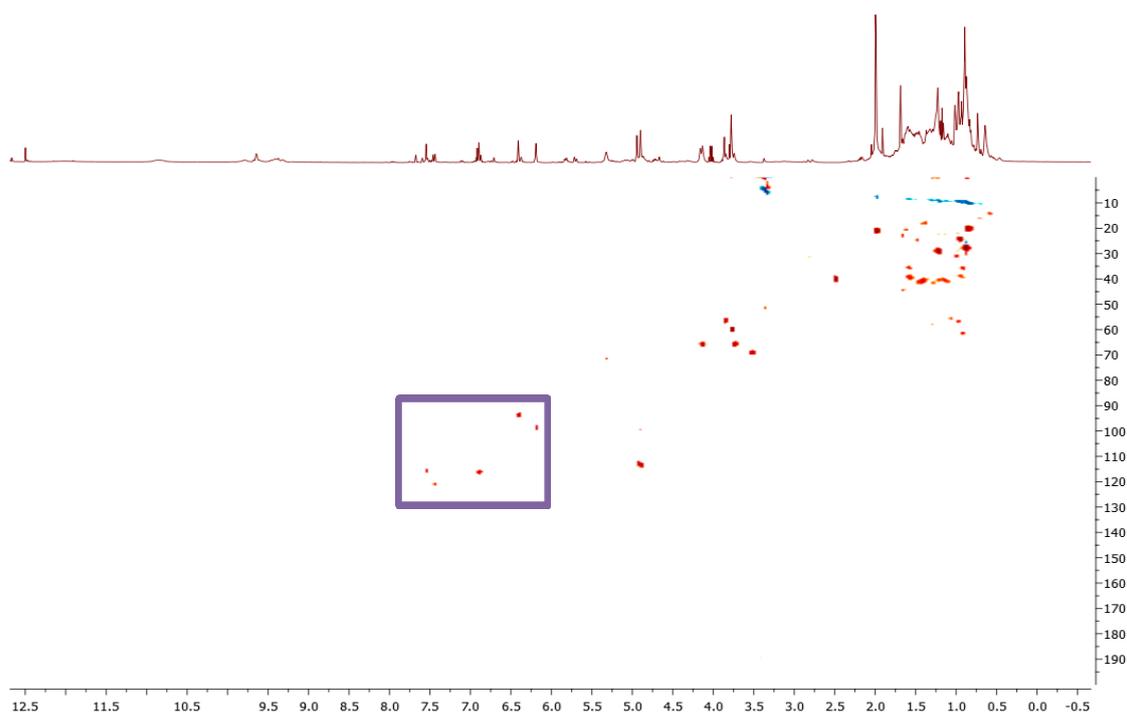


Figura 4.17. Espectro HSQC de quercetina (superior) y fracción AcOEt correspondiente al mes de junio (inferior).

También se realizó un estudio comparativo con el espectro ^1H -RMN de un extracto etanólico obtenido previamente del mismo lugar geográfico en el mes de diciembre, con las fracciones hexano y AcOEt correspondiente a la colecta realizada en el mismo mes. En este estudio se observó que el espectro ^1H -RMN del extracto etanólico presentó una mayor cantidad de señales como era de esperar ya que prácticamente todos los constituyentes de interés fitoquímico presentan solubilidad en mezclas hidroalcohólicas (Figura 4.18). Este estudio permitió corroborar el proceso de extracción ya que se observa que la fracción hexano presenta señales distintas que la fracción AcOEt, y que las señales de ambas se encuentran en el extracto etanólico.

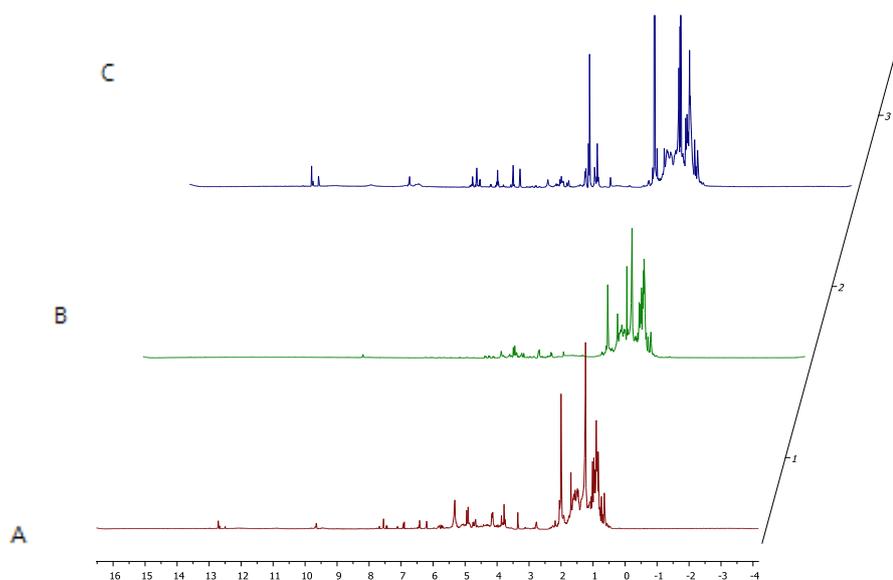


Figura 4.18. Espectros ^1H -RMN de la fracción EtOH (A), fracción hexano (B) y fracción AcOEt (C) correspondientes al periodo de diciembre en DMSO-d_6 adquiridos a 22.16°C .

Conclusiones

5. Conclusiones

Se realizó con éxito el fraccionamiento bioguiado por gradiente de polaridad de *Baccharis trimera* recolectada en suelo rocoso. A su vez se realizó el estudio comparativo del mismo realizando colectas de la planta silvestre en tres estaciones distintas del año. Se encontró que la fracción hexano presenta la mayor actividad antiproliferativa y el mejor índice selectividad hacia el parásito, mientras que la fracción acetato de etilo también presenta relevante actividad biológica pero menor índice de selectividad. Las diferencias en la actividad biológica de los períodos se pueden explicar por los cambios en el perfil metabólico de las plantas según el ambiente, este estudio permite confirmar cambios en relación directa con la época de colecta.

Se realizó el acercamiento a la caracterización fitoquímica de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi* donde se observó que las fracciones con actividad biológica significativa presentan terpenoides de distintos tipos entre los que se destacan los del tipo labdano y también flavonoides.

Aún resta realizar el aislamiento y la identificación exacta del principio activo pero estos resultados muestran que las partes aéreas de *Baccharis trimera* pueden ser una fuente de nuevos fármacos con actividad antiprotozoaria. Estudios *in vitro* e *in vivo* adicionales son necesarios para validar el uso de la carqueja en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Bibliografia

6. Bibliografía

- [1] E.R Parker, A Sethi. Chagas Disease: Coming to a Place Near You. *Dermatologic Clinics*. 2011, 29, 53-62.
- [2] G Álvarez, B Aguirre-López, J Varela, M Cabrera, A Merlino, G.V López, M.L Lavaggi, W Porcal, R Di Maio, M González, H Cerecetto, N Cabrera, R Pérez-Montfort, A Gómez Puyou. Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase dimer-interface-irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010, 45, 5767 - 5772.
- [3] R Storino, M Jörg, S Auger (2003). *Atención médica del paciente chagásico. Manual Práctico, un enfoque biológico, antropológico y social*. Buenos Aires, Argentina Editorial Ediprof, p11-15.
- [4] L.M Ibáñez, J.A Carli, B Kennel. Mal de Chagas. La enfermedad de la pobreza, Casas de fuego. *Revista Medica*. 2006, 66-73.
- [5] T.R Fritsche. Arthropods of medical importance. *Manual of clinical Microbiology*. 8th Ed, Washington, EUA. American Society for Microbiology. 2003, 2, 2061-2078.
- [6] J Gascón, P Albajarb, E Cañasc, F Floresd, J Gómez, R.N Herrera . Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2008, 26, 99-106.
- [7] R Zeledón. Vectores de la enfermedad de Chagas y sus características ecofisiológicas. *Interciencia*. 2000, 8(6), 384-395.
- [8] R Storino, J Milei (1994). *Introducción. Enfermedad de Chagas*. Argentina. Editorial Mosby-Doyma.. Capitulo 1:1-7.
- [9] R Storino (1998). *Enfermedad de Chagas*. En Medicina, Mautner B y col. Centro Buenos Aires. Editor Fundación Favaloro. Capitulo 25: 774-783.
- [10] R Storino, J Milei (1985). *Estudio clínico, con métodos complementarios no invasivos y correlación anatomopatológica de la enfermedad de Chagas*. Premio Federico Guillermo Scholottman.

- [11] S.C Barr, K.A Gossett, T.R Klei. Clinical, clinicopathologic, and parasitologic observations of trypanosomiasis in dogs infected with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. American Journal of Veterinary Research. 1991, 52(6), 954-960.
- [12] L.V Kirchhoff. 2013. *Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Clinical Presentation*. [Internet] Departments of Internal Medicine (Infectious Diseases) and Epidemiology, Carver College of Medicine and College of Public Health, University of Iowa. Disponible desde: < <http://emedicine.medscape.com/article/1000389-clinical#a0217> > [Acceso 26 de julio del 2013]
- [13] M de Rosa. Período indeterminado de la enfermedad de Chagas. Revista Argentina de cardiología. 2002, 70 (1).
- [14] Organización Panamericana de la Salud (2003). *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Washington DC, EUA., 27-39.
- [15] S Schettino, M Paz, R Perera, R Hernandez. Chagas Disease as a Cause of Symptomatic Chronic Myocardopathy in Mexican Children. Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society. 2009, 28, 1011-1013.
- [16] D Botero, M Restrepo (2003). *Parasitosis humanas*. Cuarta edición. Colombia. Corporación para las Investigaciones Biológicas, p 220-224.
- [17] B Werner, I.G Heitmann, M.I.L Jercic, L.M Jotré, P.C Muñoz, I.H Noemí, A.M.V San Martin, J.P Sapunar, M.H Torres, I. A Zulantay. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte IV. Enfermedad de Chagas en pacientes inmunocomprometidos. Revista Chilena de Infectología. 2008, 25(4), 289-292.
- [18] J.D Maya, Y Repetto, M Agosin, J.M Ojeda, R Tellez, C Gaule, A Morello. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology. 1997, 86,101-106.
- [19] J.A Castro , E.G.D Toranzo. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas disease). Biomedical and Environmental Sciences. 1988, 1(1), 19-33.
- [20] N.M Patiño (2008). *Farmacología médica*. México. Editorial Panamericana. p922-932.

- [21] O Muñoz, M Montes, T Wilkomirsky (1999). *Monografías. Plantas medicinales de uso en Chile Química y farmacología*. Segunda edición. Santiago de Chile. Editorial Universitaria.
- [22] N Sharapin, R Pinzón (2000). *Fundamentos de Tecnologías de Productos Fitoterapéuticos*. Primera edición. Colombia. Convenio Andrés Bello, p 27-30.
- [23] V Riva (2006). *Plantas medicinales en los andes de Bolivia, Botánica Económica de los Andes Centrales*. La Paz. Universidad Mayor de San Andrés, p 268-284.
- [24] B Buchanan, R Grissem, R Jones, R Croteau, TM Kutchan, NM Lewis (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists. EUA.. Capítulo 24
- [25] S.D Sarker, A.I Gray, Z Latif (1998). *Natural products isolation*. New Jersey. Human Press. Capítulo 1.
- [26] R Blanca, M Arrillaga (1969). *Plantas medicinales. Nuestra tierra*. Uruguay, p 6-9.
- [27] R.W Bussmann, D Sharon. Traditional medicinal plant use in Loja province, Southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2006, 22 - 44.
- [28] R.W Bussmann, D Sharon. Traditional plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing culture. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2006, 2, 47 - 65.
- [29] B.L Díaz (2006). *Farmacognosia*. España. Editorial Elsevier, p 1 - 9.
- [30] D.A Giuliano. Clasificación infragenérica de las especies Argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Darwiniana*. 2001, 39, 131-154.
- [31] L.G Verdi, I.M.C Brighente, M.G Pizzolatti. Género *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, económicos e biológicos. *Química Nova*. 2005, 28, 85-94.
- [32] M.J Abad, P Bermejo. *Baccharis* (Compositae). Issue in Honor of Prof. Atta-ur-Rahman . 2007, 76-96
- [33] E.L Paul, A Lunardelli, E Caberlon. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. *Inflammation*. 2009, 419-425.
- [34] S Martínez, P Mollinedo, O Mamani, G Almanza, E Terrazas. Estudio in vitro de la actividad antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis* sobre *candida albicans*. *Revista Boliviana de Química*. 2011, 1, 35-40.

- [35] L.R Borges, V Astolfi, A.J Mossi, R.L Cansian. Determinação de actividades biológicas em extratos de carqueja(*baccharis trímera* (Less)). Sociedad ecológica de Brasil. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. 2007, 1-2.
- [36] A.M Ocampo, C.A López Zuluaga, J.E Pérez Cárdenas, G Isaza Mejía. Actividad antifúngica de los extractos acuosos de *Baccharis trinervis*, *Baccharis latifolia* y *Solanum dolichosepalum*, Biosalud. 2006, 5,51–59.
- [37] D Rangel, I Garcia, J Velasco, D Buitrago, E Velazco . Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nítida*. Revista de la Facultad de Farmacia. 2001, 42,43–46.
- [38] INIA, 2004, Estudios en domesticación y cultivos de especies medicinales y aromáticas nativas, serie11, Uruguay.
- [39] J.R Alonso. Tratado de fitomedicina: bases y clínicas farmacológicas. Buenos Aires: Isis. 1998, 350-354.
- [40] E.M Petenatti, D.A Cifuentes, J.C Gianello. Medicamentos Herbarios en el Centro-Oeste Argentino. VI. Caracterización y Control de Calidad de dos Especies de “Carquejas”. Latin American Journal of Pharmacy. 2007, 26, 201-208.
- [41] G Kerstiens. Signaling across the divide: a wider perspective of cuticular structure-function relationships. Trends in Plant Science. 1996, 1(4), 125-129.
- [42] J.M Achinetto, S.B Tedesco. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trímera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2009, 11(4), 360-367.
- [43] J Varela, M.L Lavaggi, M Cabrera, A Rodríguez, P Miño, X Chiriboga, H Cerecetto, M González. Bioactive-guided identification of labdane diterpenoids from aerial parts of *Aristeguietia glutinosa* Lam. as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. Natural Product Communications. 2012, 7, 1-2.
- [44] J Varela, E Serna, G Yaluff, N.I Vera de Bilbao, P Miño, X Chiriboga, H Cerecetto, M González. *In vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of the active principles from *Aristeguietia glutinosa* and study of mechanisms of action. 2013, Sao Paulo Advanced School on Bioorganic Chemistry, Araraquara SP, Brasil.

- [45] A.G Tempone, P Sartorelli, D Teixeira, F.O Prado, I Calixto, H Lorenzi, M.S.C Melhem. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. *Memoria Instituto Oswaldo Cruz*. 2008, 103, 443-449.
- [46] S.D Brengio, S.A Belmonte, E Guerreiro, O.S Giordano, E.O Pietrobon, M.A Sosa. The sesquiterpene lactone dehydroleucodine (DhL) affects the growth of cultured epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Parasitology*. 2000, 86, 407–412.
- [47] V.J Ortiz, S.D Brengio, O Giordano, C Tonn, M Sanchez, M.H Burgos. The trypanocidal effect of sesquiterpene lactones helenalin and mexicanin on cultured epimastigotes. *The Journal of Parasitology*. 2005, 91, 170–174.
- [48] P.A Mangiaterra (2005). *Evaluación de parámetros botánicos y fitoquímicos para el control de calidad de «carqueja»*. Tesina de grado, Universidad de Belgrano. Argentina.
- [49] P.L Thamaraiselvi, P. Jayanthi. Preliminary studies on phytochemicals and antimicrobial activity of solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 2012, 2 (2), 115-122.
- [50] U Kumar, B Kumar, A Bhandari, Y Kumar. Phytochemical investigation and comparison of antimicrobial screening of clove and cardamom. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2010, 1(12), 138-147.
- [51] R.J.P Cannell. *Natural Products Isolation*. Humana Press. 1998, 357-358.
- [52] G Seoane, S Onetto, M Risso, E Umpiérrez. *Tablas espectroscópicas para elucidación estructural*. Comisión Sectorial de Educación Permanente, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 2009, 23 - 24.
- [53] MestReC 4.5.6.0, <http://www.mestrelab.com>
- [54] S Ancizu, E Moreno, E Torres, A Burguete, S Pérez-Silanes, D Benítez, R Villar, B Solano, A Marín, I Aldana, H Cerecetto, M González, A Monge. 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 – 2272.
- [55] H Rubbo, A Denicola, R Radi. Peroxynitrite inactivates thiol-containing enzymes of *T. cruzi* energetic metabolism and inhibits cell respiration. *Archives Biochemica and Biophysica* 1994, 308(1), 96 - 102.
- [56] M Cabrera, M.L Lavaggi, P Hernández, A Merlino, A Gerpe, W Porcal W, M Boiani

- M, A Ferreira, A Monge, A López de Cerain, M González, H Cerecetto. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti – *T. cruzi* 5-phenylethenylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction. Toxicology Letters. 2009, 190,140 – 149.
- [57] T Julianti, Y Hata, S Zimmermann, M Kaiser, M Hamburger, M Adams. Antitrypanosomal sesquiterpene lactones from *Saussurea costus*. Fitoterapia. 2011, 82, 955–959.
- [58] M.A Besten, D.S Nunes, A Wisniewski, S.L Sens, D Granato, E.L Simionatto, D.R Scharf, J.B Dalmarco, N.I Matzenbacher. Chemical composition of volatiles from male and female specimens of *Baccharis trimera* collected in two distant regions of southern Brazil: a comparative study using chemometrics. Quimica Nova. 2013, 36(8).
- [59] A San Martín, J Roviroso, M Castillo. Diterpenoids from *Baccharis tola*. Phytochemistry. 1983, 22(6) 1461-1463.
- [60] F. Bohlmann, S Banerjee, J Jakupovic, M Grenz, L. N Misra, G.S Hirschmann, R.M. King, H Robinson. Clerodane and labdane diterpenoides from *Baccharis* species. Phytochemistry, 1984, 3(24), 511-515.
- [61] J Jakupovic, A Schuster, U Ganzer, F Bohlmann, P.E Boldt. Sesqui- and diterpenes from *Baccharis* species. Phytochemistry. 1990, 29 (7), 2217-2222.
- [62] J.M Fachinetto, S.B Tedesco. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2009, 11(4), 360-367.
- [63] H Soicke, E.L Peschlow. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. Planta Medica. 1987, 1, 37-39.
- [64] S.C da Silva Luz (2003). *Estudo fitoquímico da cera epicuticular de Baccharis uncinella e comparação da atividade antioxidante com outras espécies do gênero Baccharis*. Mestreeem Ciências Farmacêuticas.. Universida de Federal de Santa Catarina.
- [65] C Zdero, F Bohlman, J.C Solomon, RM King, H Robinson. Ent-clerodanes and other constituents from Bolivian *Baccharis* Species. Phytochemistry. 1989, 28 (2), 531-542.

- [66] J.C Borella, D.P Duarte, A.A.G Novaretti, A Menezes, S.C França, C.B Rufato, P.A.S Santos, R.C.S Veneziani, N.P Lopes. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2006, 16(4), 557-561.
- [67] F.G Silva, A.H Januário, J.E.B.P Pinto, V.E Nascimento, W.S Barizan, J.F Sales, S.C Franca. Teor de flavonóides em populações silvestre e cultivada de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] coletadas nas estações seca e úmida. *The Brazilian Journal of Medicinal Plants*. 2006, 8(2), 19-25.
- [68] S Chidiak, M Guada, D Buitrago, y A Morales. Flavonoides aislados de la especie *Baccharis nitida*. *CIENCIA*. 2007, 15(3), 361 – 365.
- [69] A Calle, J Yupanqui, Y Flores, G.R Almanza. Flavonoides de *Baccharis boliviensis*. *Revista Boliviana de Química*. 2012, 2 (29), 155-159.
- [70] A Francesca, M Castillo, M.R Torres. Flavonoids of *Baccharis incarum*. *Journal of Natural Products*. 1982, 45(4), 501-502.
- [71] C Zdero, F Bohlmann, H.M Niemeyer. An unusual dimeric sesquiterpene and other constituents from chilean *Baccharis* species. *Phytochemistry*. 1991, 30(5), 1597-1601.

Agradecimientos

7. Agradecimientos

A Mercedes González y Hugo Cerecetto por brindarme la oportunidad de realizar mi tesina de grado en el laboratorio de Química Orgánica.

A mi co-tutor Javier por ayudarme en todo momento y por su orientación a lo largo del trabajo en mi tesina.

A todos mis compañeros de laboratorio por acompañarme día a día.

A Horacio Pezaroglo y Verónica Martínez por la realización de los espectros de RMN.

Al profesor Eduardo Alonso Paz por realizar la identificación de las muestras.

A mi familia por acompañarme en todo momento.

A Maxi por estar siempre presente y su apoyo incondicional.

A todas mis amigas de la facultad Elena, Verónica, Jennyfer, Anita, Ceci, Mara, Stefani, Ile, Dani y Gaby por sus almuerzos, charlas y salidas.

A las instituciones que han permitido y contribuido al desarrollo de la tesina:

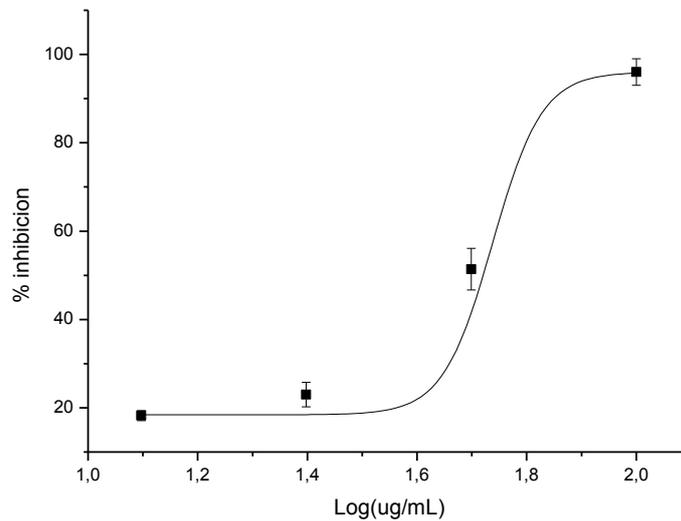
- Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)-beca de iniciación a la investigación.

- Comisión Sectorial de Investigación Científica, (CSIC), Uruguay.

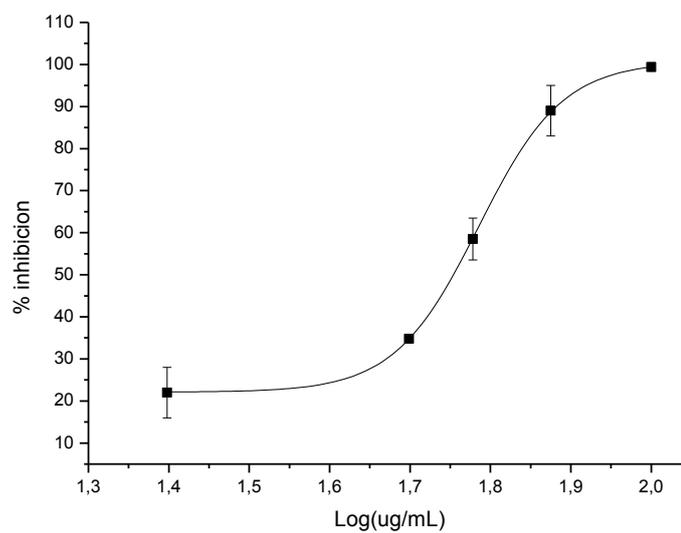
Anexos

8. Anexos

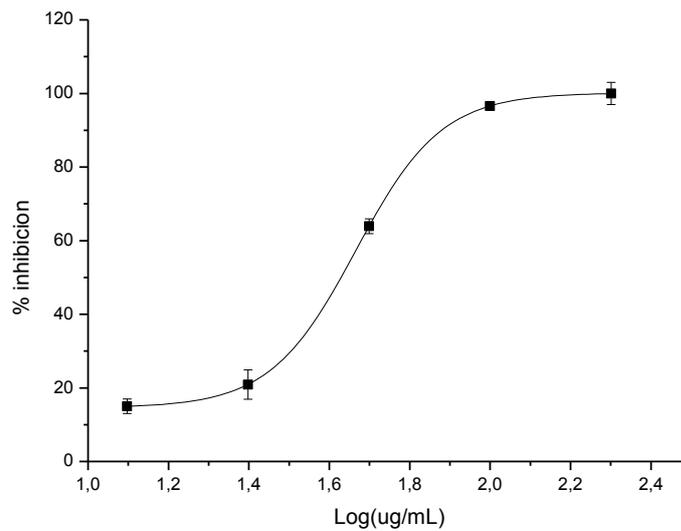
8.1. Anexo I



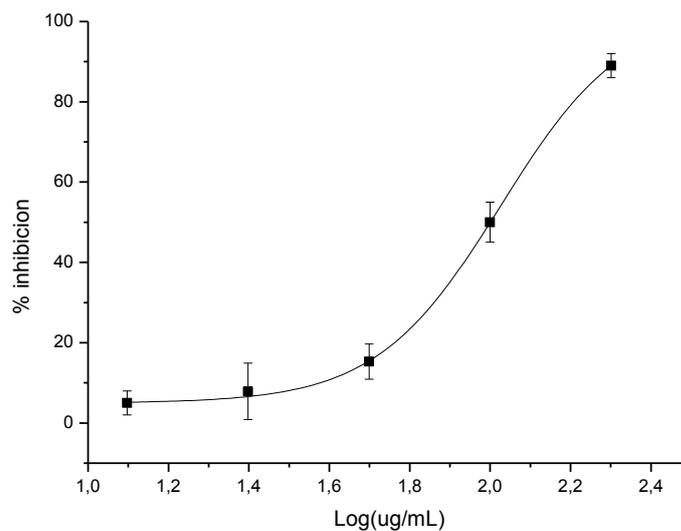
A.1. Curva dosis-respuesta para la actividad antiproliferativa de la fracción hexano de *Baccharis trimera* del período de junio frente a epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2.



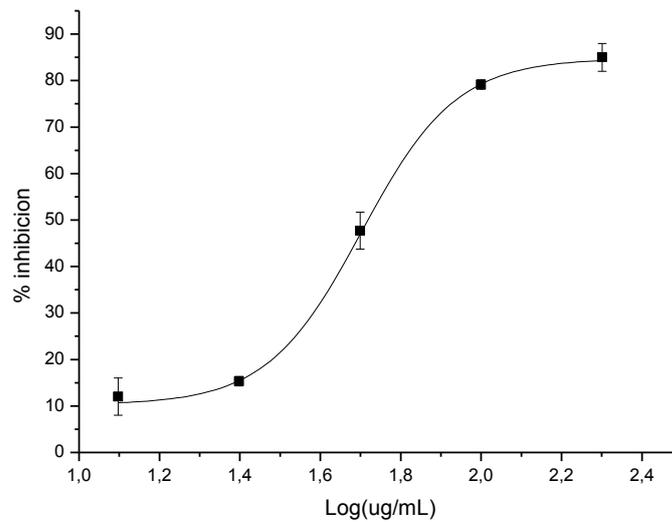
A.2. Curva dosis-respuesta para la actividad antiproliferativa de la fracción hexano de *Baccharis trimera* del período de diciembre frente a epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2.



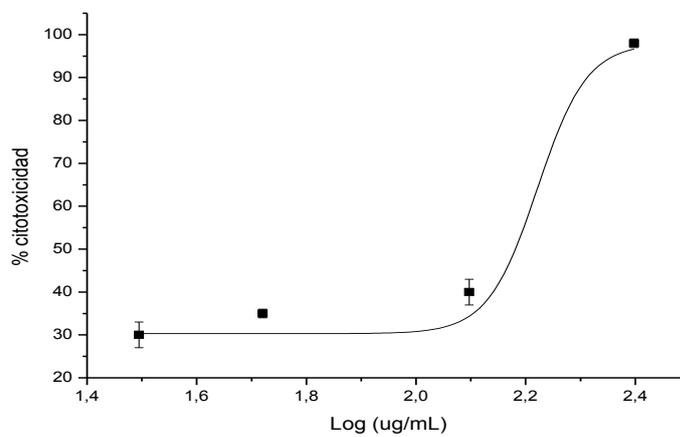
A.3. Curva dosis-respuesta para la actividad antiproliferativa de la fracción AcOEt de *Baccharis trimera* del período de febrero frente a epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2.



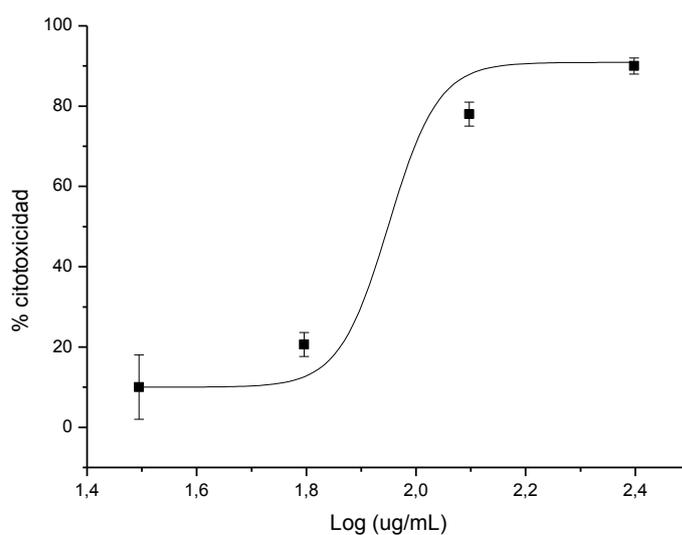
A.4. Curva dosis-respuesta para la actividad antiproliferativa de la fracción AcOEt de *Baccharis trimera* del período de junio frente a epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2.



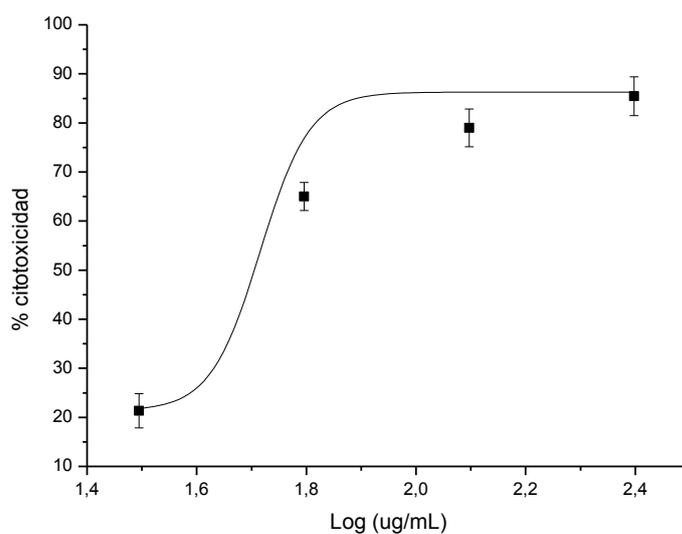
A.5. Curva dosis-respuesta para la actividad antiproliferativa de la fracción AcOEt de *Baccharis trimera* del período de diciembre frente a epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2.



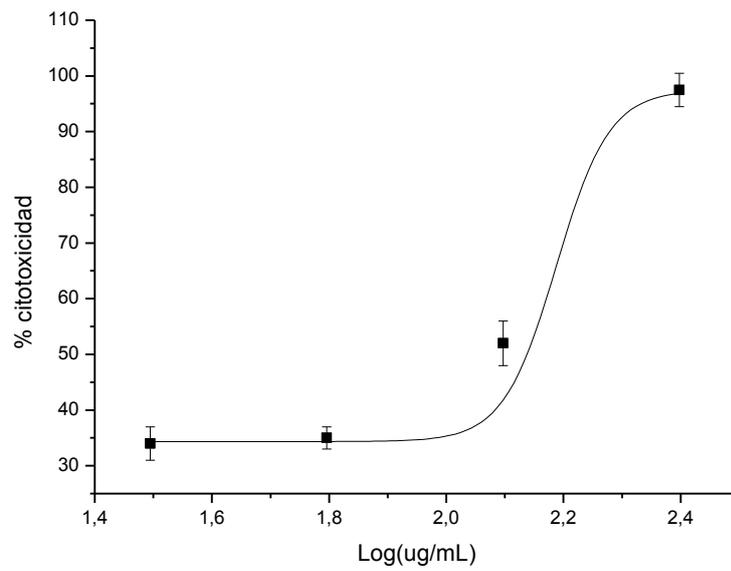
A.6. Curva dosis-respuesta para evaluar citotoxicidad de la fracción hexano período febrero de *Baccharis trimera* frente a macrófagos murinos.



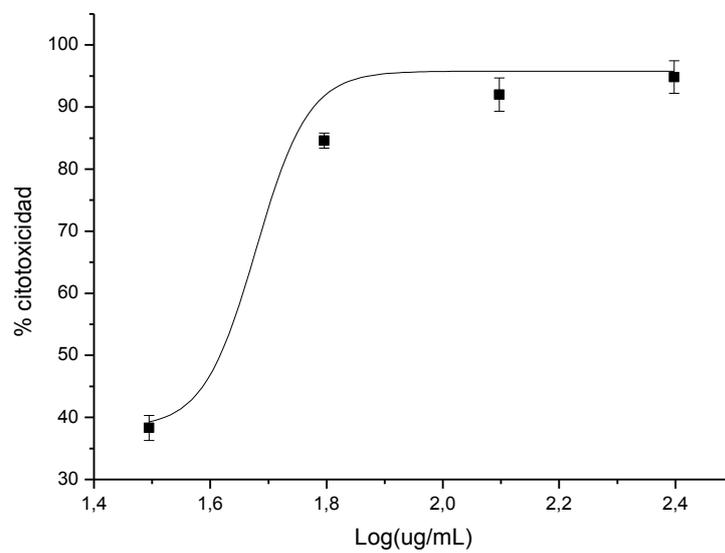
A.7. Curva dosis-respuesta para evaluar citotoxicidad de la fracción hexano período junio de *Baccharis trimera* frente a macrófagos murinos.



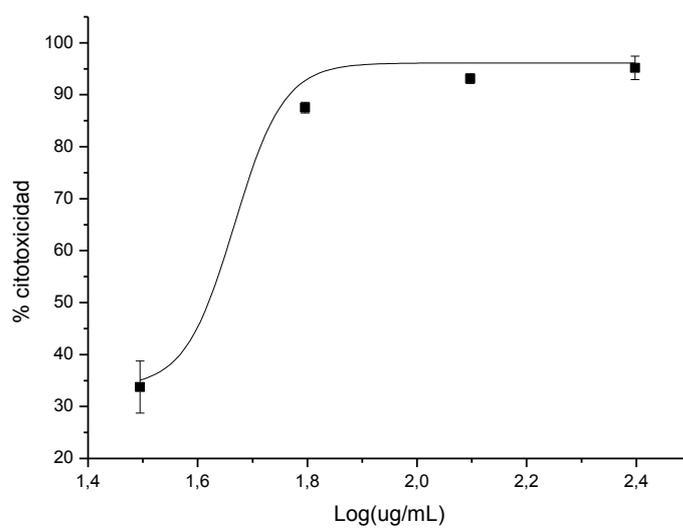
A.8. Curva dosis-respuesta para evaluar citotoxicidad de la fracción hexano período diciembre de *Baccharis trimera* frente a macrófagos murinos.



A.9. Curva dosis-respuesta para evaluar citotoxicidad de la fracción AcOEt período febrero de *Baccharis trimera* frente a macrófagos murinos.

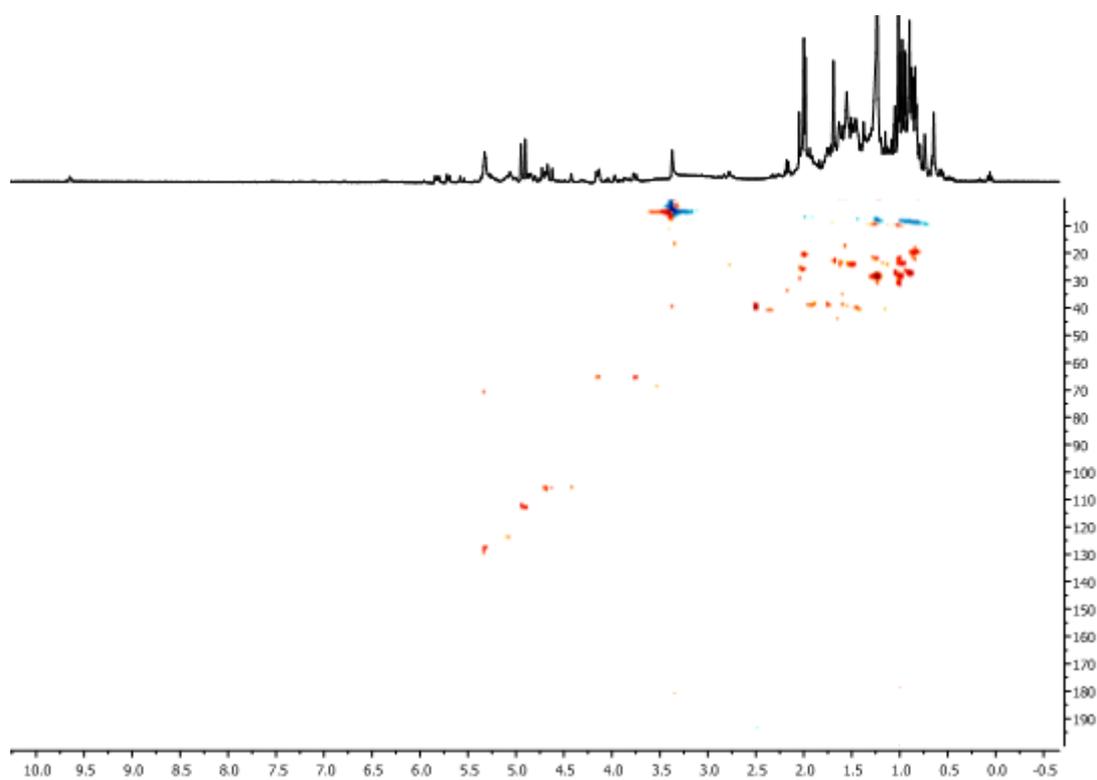


A.10. Curva dosis-respuesta para evaluar citotoxicidad de la fracción AcOEt período junio de *Baccharis trimera* frente a macrófagos murinos.

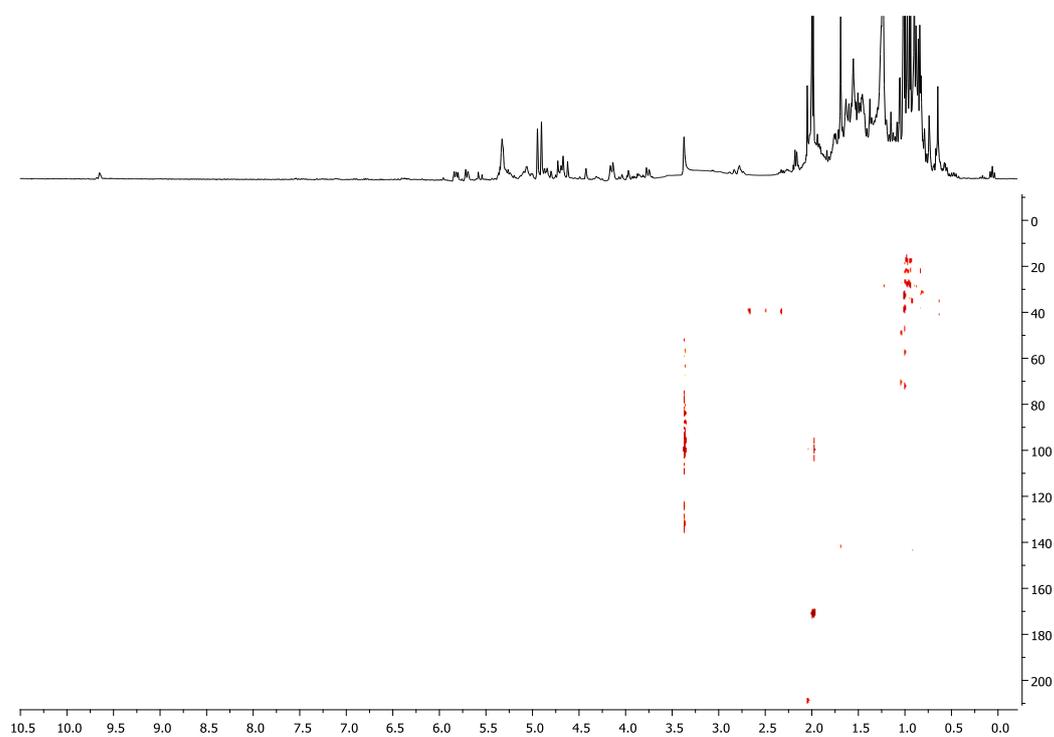


A.11. Curva dosis-respuesta para evaluar citotoxicidad de la fracción AcOEt período diciembre de *Baccharis trimera* frente a macrófagos murinos.

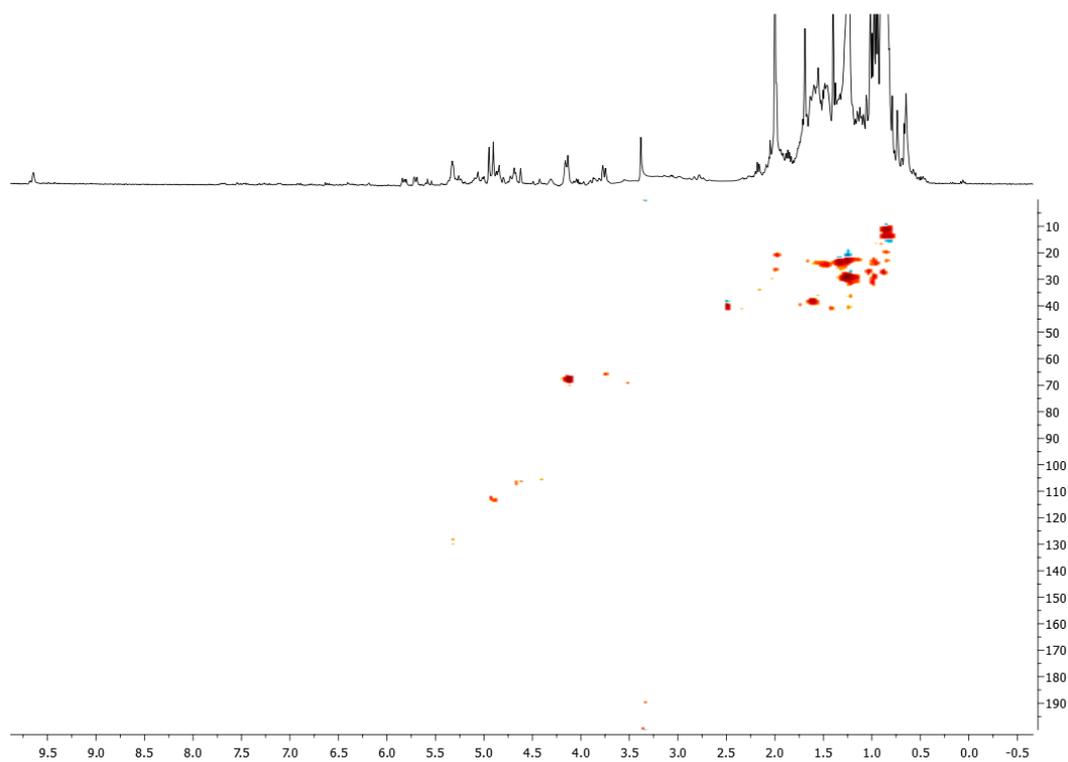
8.2. Anexo II



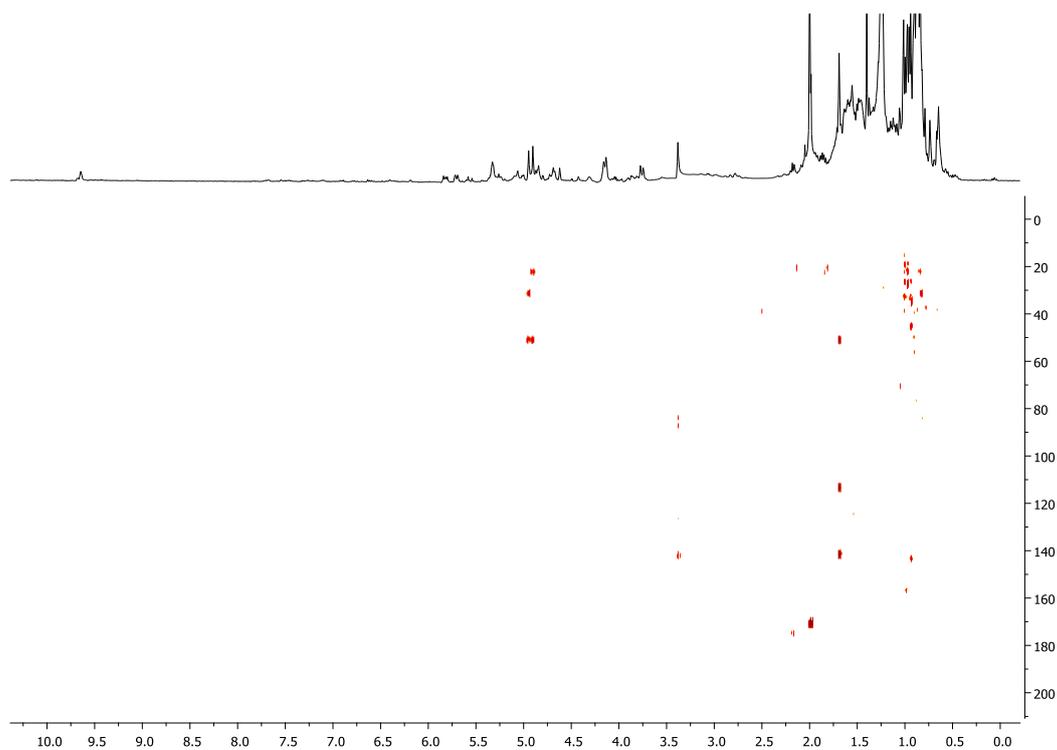
A.12. Espectro HSQC de la fracción hexano correspondiente al período de febrero disuelta en DMSO-d6 adquirido a 23 °C.



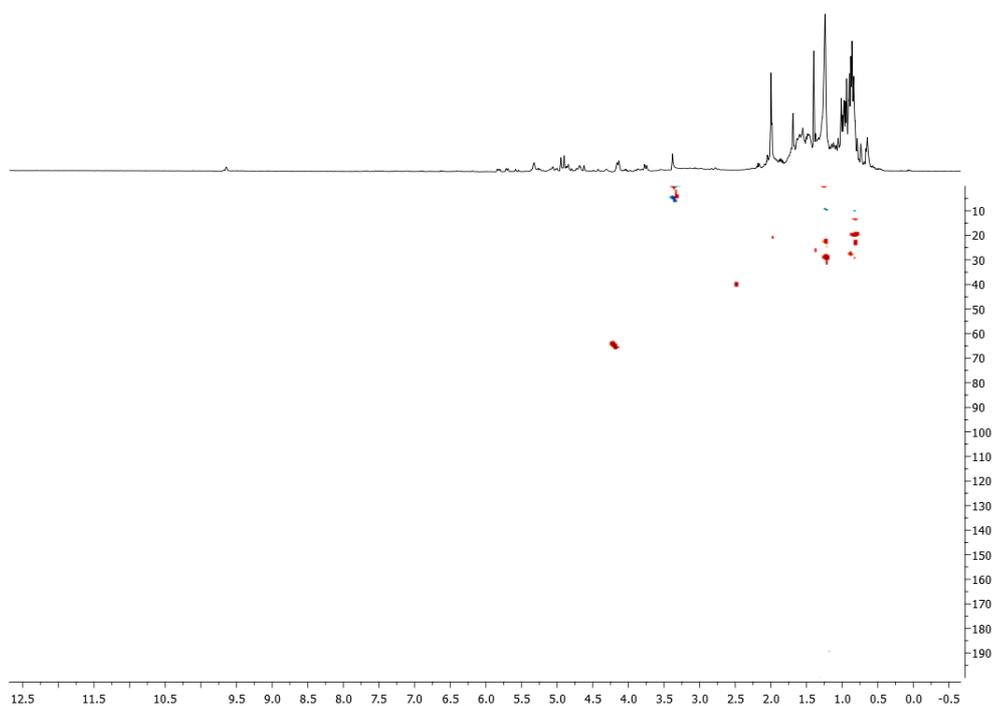
A.13 Espectro HMBC de la fracción Hexano correspondiente al período de febrero.



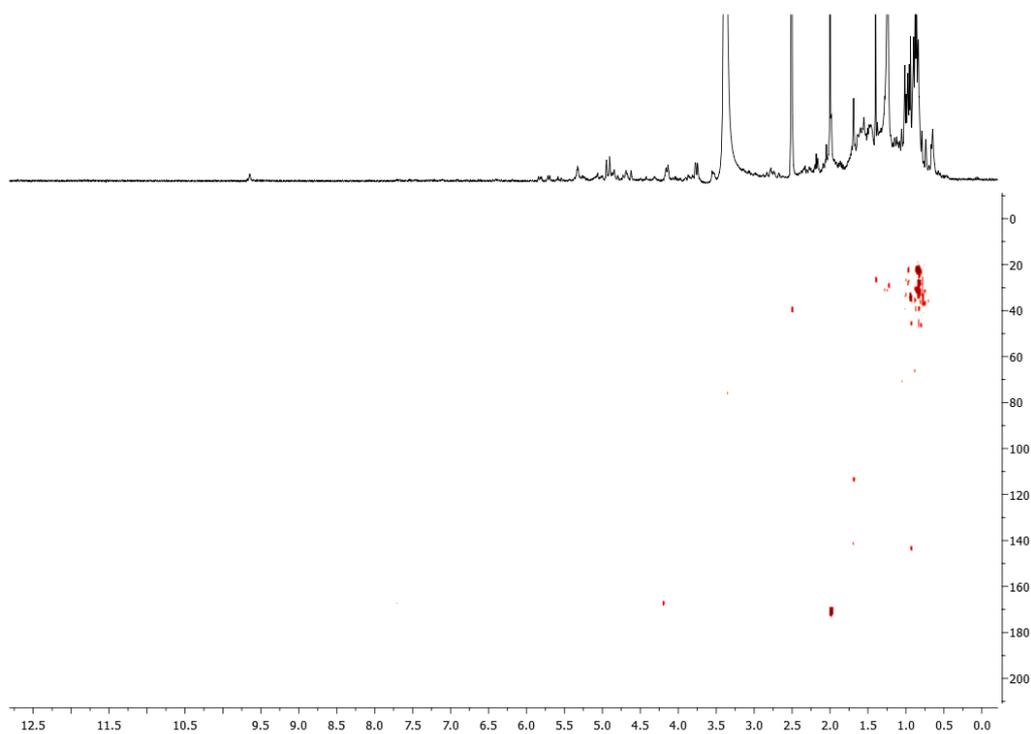
A.14. Espectro HSQC de la fracción hexano correspondiente al período de junio disuelto en DMSO-d₆ adquirido a 23 °C.



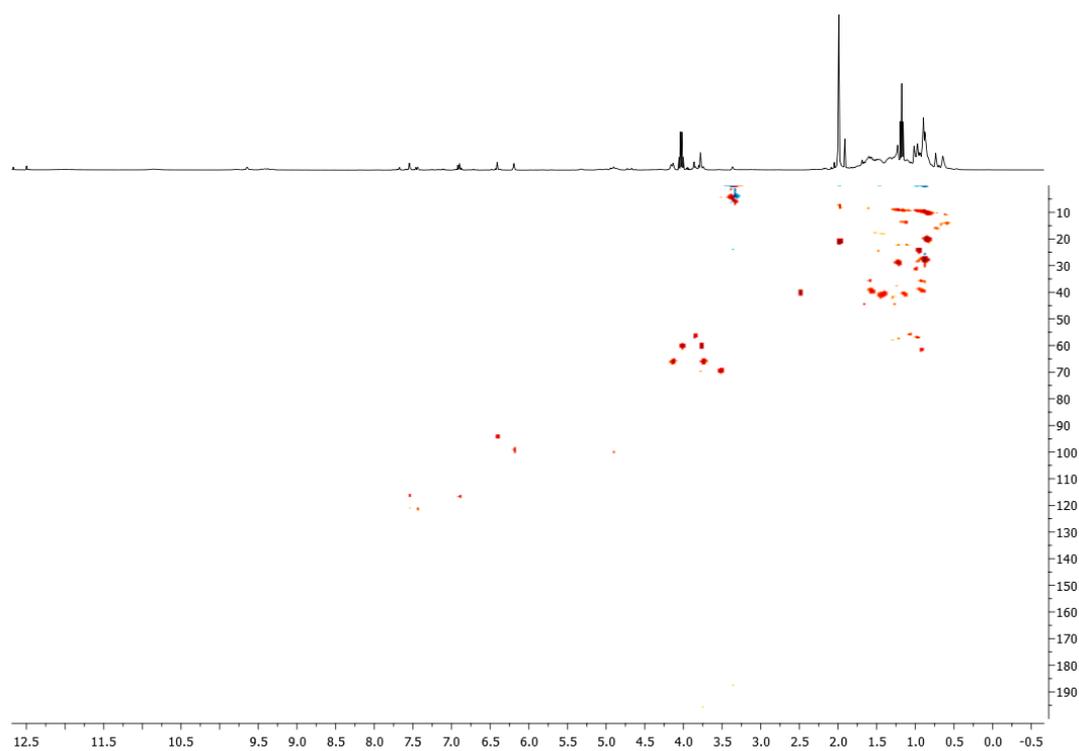
A.15. Espectro HMBC de la fracción hexano correspondiente al período de junio disuelta en DMSO-d₆ adquirido a 23 °C.



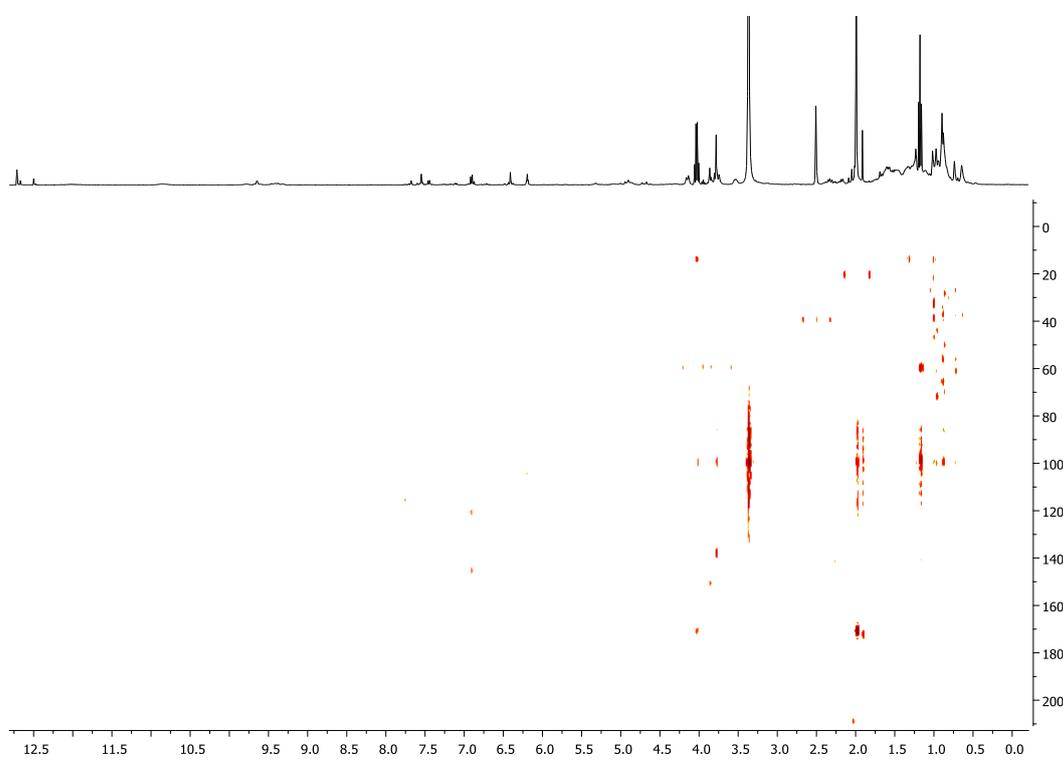
A.16. Espectro HSQC de la fracción hexano correspondiente al período de diciembre disuelto en DMSO-d₆ adquirido a 23 °C.



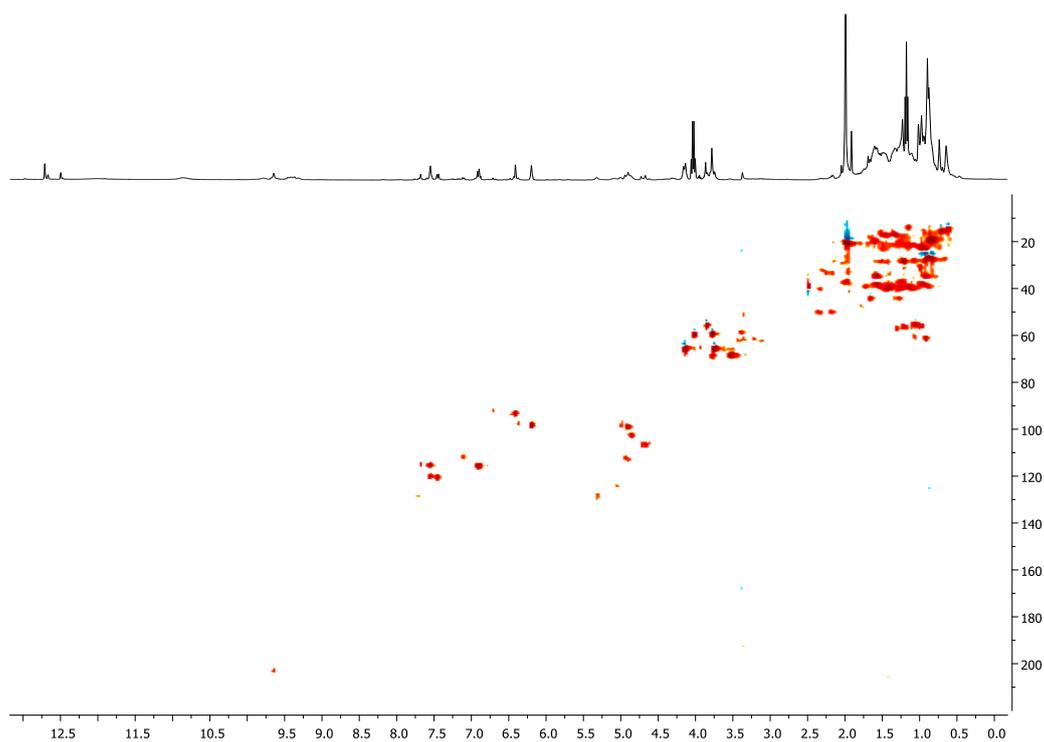
A.17. Espectro HMBC de la fracción hexano correspondiente al período de diciembre disuelto en DMSO-d₆ adquirido a 23 °C.



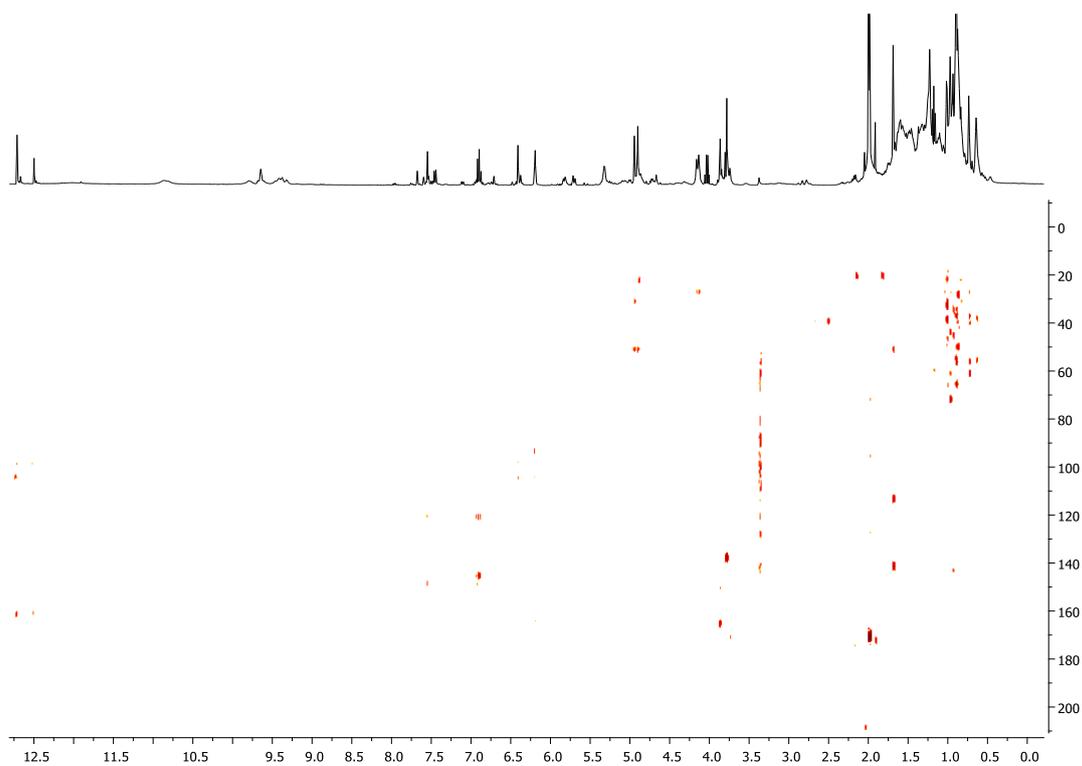
A.18. Espectro HSQC de la fracción AcOEt correspondiente al período de febrero disuelta en DMSO-d₆ adquirido a 23 °C.



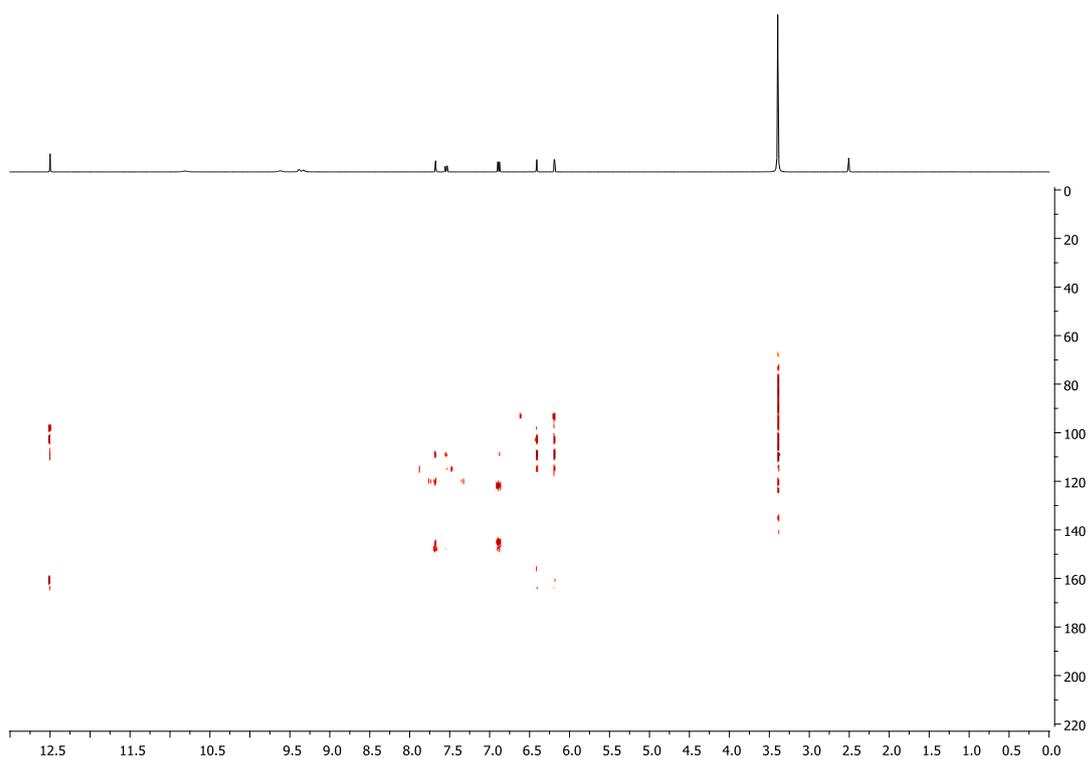
A.19 . Espectro HMBC de la fracción AcOEt correspondiente al período de febrero disuelta en DMSO-d₆ adquirido a 23 °C.



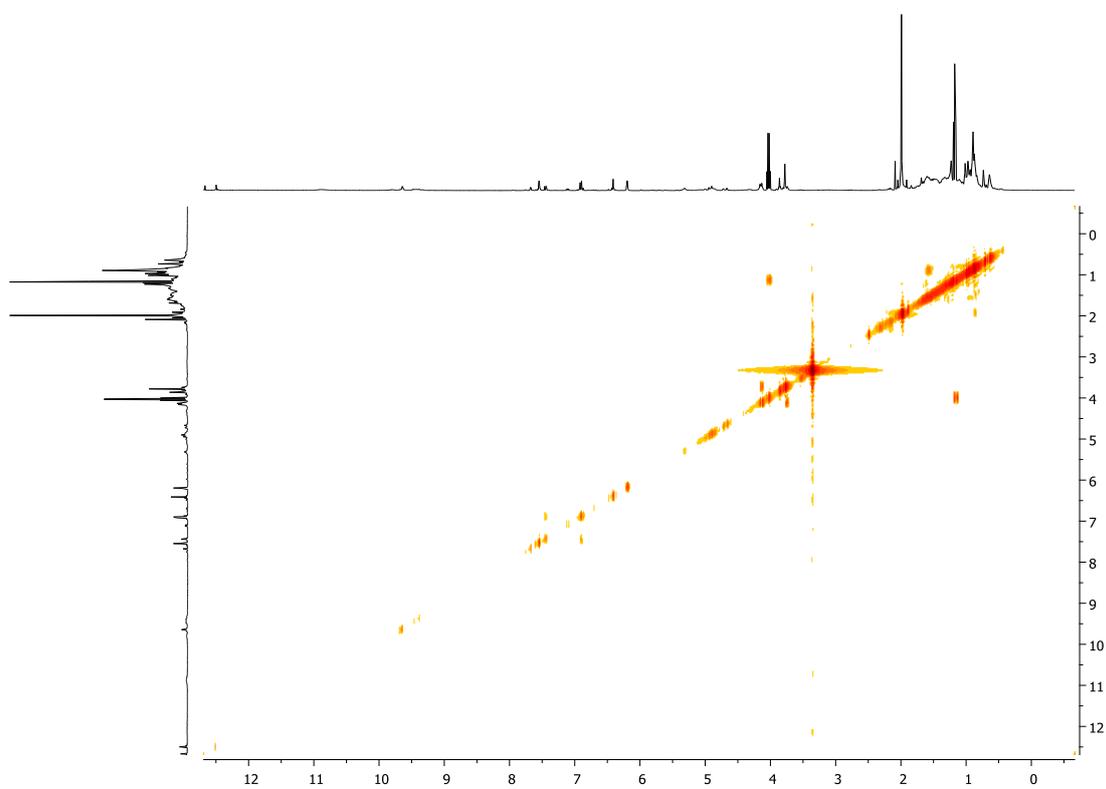
A.20 . Espectro HSQC de la fracción AcOEt correspondiente al período de junio disuelta en DMSO-d6 adquirido a 23 °C.



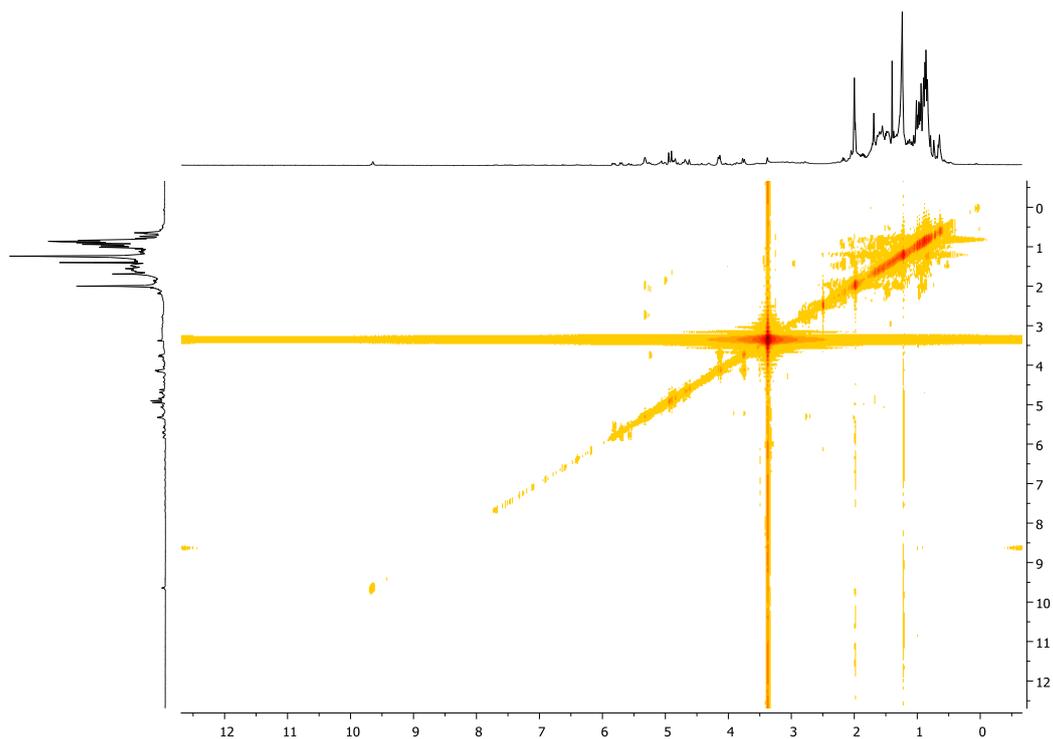
A.21 . Espectro HMBC de la fracción AcOEt correspondiente al período de junio disuelta en DMSO-d6 adquirido a 23 °C.



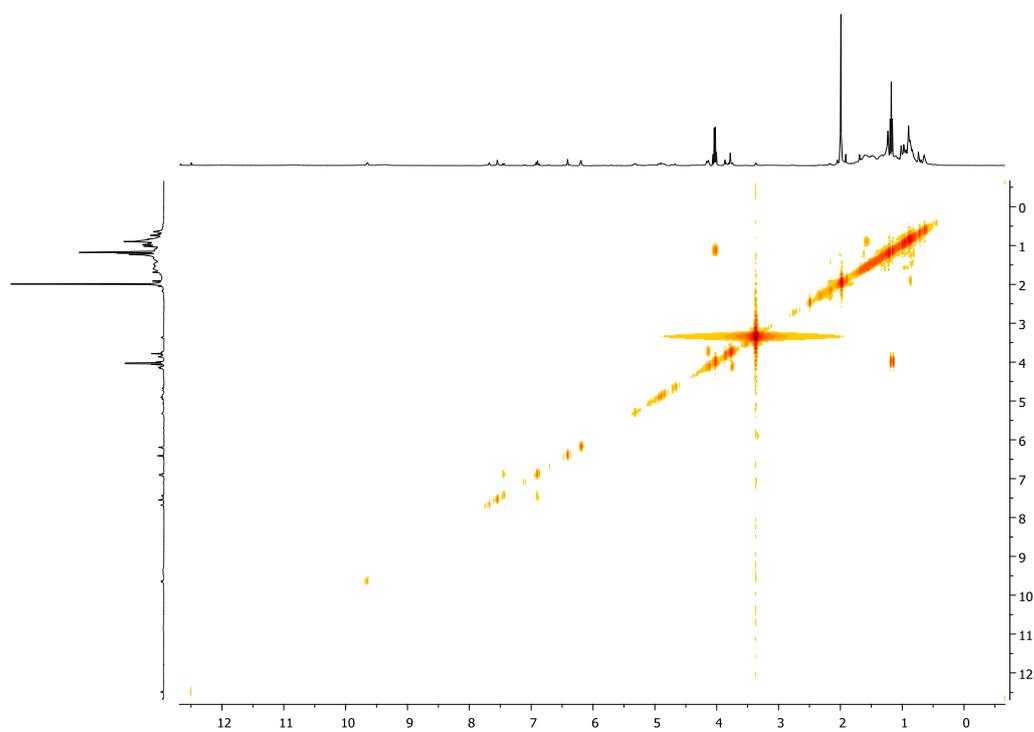
A.22. Espectro HMBC de quercetina disuelta en DMSO-d6 adquirido a 23 °C.



A.23. Espectro COSY de la fracción AcOEt correspondiente al período de febrero disuelta en DMSO-d6 adquirido a 23 °C.



A.24. Espectro COSY de la fracción hexano correspondiente al período de diciembre disuelta en DMSO-d6 adquirido a 23 °C.



A.25. Espectro COSY de la fracción AcOEt correspondiente al período de diciembre disuelta en DMSO-d6 adquirido a 23 °C.